รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และการสร้างฮอร์โมนเพศในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana* เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

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. จิรารัช กิตนะ

รองศาสตราจารย์ ผุสตี ปริยานนท์

นางสาว พิชชานิธิ์ แสงธาราทิพย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

แย้เป็นสัตว์เลื้อยคลานรูปร่างคล้ายกิ้งก่า ที่มีความสำคัญทั้งด้านการเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของคน โดยเฉพาะทางภาคอีสานของประเทศไทย และด้านการเป็นผู้ควบคุมประชากรของแมลงในระบบนิเวศ แต่ในปัจจุบันประชากรแย้ที่พบในธรรมชาติของประเทศไทยมีจำนวนลดลงไปมาก การเพาะเลี้ยงแย้เพื่อการอนุรักษ์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาขนาดประชากรแย้ไว้ ซึ่งในการดำเนินการดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักตัว (gonado-somatic index, GSI) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละช่วงฤดูกาล และการสร้างฮอร์โมนเพศในช่วงฤดูสืบพันธุ์ โดยเก็บตัวอย่างแย้ จากภาคสนามในจังหวัดชลบุรี ในช่วงฤดูแล้ง (ธันวาคม 2552-เมษายน และพฤศจิกายน 2553) และฤดูฝน (พฤษภาคม-ตุลาคม 2553) ให้ได้ตัวอย่างแย้ฤดูกาลละ 4-10 ตัว/เพศ แล้วผ่าตัดเก็บอัณฑะและรังไข่มาชั่งน้ำหนักเพื่อนำมาคำนวณหา GSI และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับฤดูกาล พบว่าในแย้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีค่า GSI สูงสุด ในเดือนธันวาคม (ต้นฤดูแล้ง) ซึ่งแสดงถึงความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงเวลาดังกล่าว และมีค่า GSI อยู่ในเกณฑ์ต่ำในช่วงเวลาอื่นของปี เมื่อนำตัวอย่างอัณฑะและรังไข่ไปผ่านขั้นตอน paraffin method และย้อมสี hematoxylin and eosin เพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรสำหรับศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และนำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนทาง histochemistry เพื่อตรวจสอบการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ พบว่า ในแย้เพศผู้ ช่วงที่มีค่า GSI สูงสุดจะพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์จนพบเซลล์อสุจิจำนวนมากภายในอัณฑะ ซึ่งสอดคล้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ ในขณะที่ช่วงที่มีค่า GSI ต่ำ จะยังไม่พบเซลล์อสุจิโดยจะเริ่มพบ spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ ในอัณฑะซึ่งแสดงถึงการเริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ส่วนแย้เพศเมีย ช่วงที่มีค่า GSI สูงสุดเกิดขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเต็มที่ของฟอลลิเคิล จากนั้นจะพบว่า GSI มีค่าลดต่ำลงอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงการตกไข่ โดยสามารถตรวจพบ corpus luteum ภายในรังไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคม ข้อมูลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแย้ *Leiolepis belliana belliana* ในพื้นที่จังหวัดชลบุรีมีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล โดยเพศผู้และเพศเมียมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในช่วงต้นฤดูแล้ง และคาดว่าจะมีการผสมพันธุ์และตกไข่ในช่วงเวลาต่อมา และจากนั้นจะมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่ำสุดในช่วงฤดูฝน

คำสำคัญ gonado-somatic index, อัณฑะ, รังไข่, จุลกายวิภาค, การสร้างสเตียรอยด์

Abstract

Butterfly lizard is a small reptile that plays important roles as a food source for human consumption especially in the northeastern part of Thailand, as well as a predator to control insect population in ecosystem. At present, natural population of the butterfly lizards in Thailand becomes dramatically decreased. Captive breeding program for species conservation is thus considered as one of the measures to maintain population size. To manage the program, basic information on reproductive biology is crucially required. Therefore this study aimed to determine the reproductive cycle of the butterfly lizard *Leiolepis belliana belliana* based on change in relative weight of gonad and body weight (gonado-somatic index, GSI), change in gonadal histology as well as steroidogenesis in relation to season. Male and female lizards were field collected from Chonburi province in dry season (December 2009-April and November 2010) and wet season (May-October 2010) in order to get sample size of 4-10 lizards per sex per season. Upon sacrificed, lizard gonads were removed, weighed and calculated to determine GSI, and then analyzed for correlation of GSI and season. It was found that, both male and female lizards showed the highest GSI, an indication of gonadal growth and development, in December (early dry season), and showed low level of GSI in other time of the year. Gonad samples were processed through standard paraffin method, stained with hematoxylin and eosin and prepared as permanent slides, as well as processed through histochemical technique to determine steroidogenesis of sex hormones, before subjected to examination under a light microscope. The study on histology of gonads showed that in male lizard, peak of GSI coincided with complete spermatogenesis with presence of spermatozoa in the testis and associated with steroidogenesis in testis, while the testis in low GSI period showed no sperm in the seminiferous tubules. Presence of early spermatogenic cell, an indication of spermatogenic activity, was resumed in May. For female, peak of GSI was found together with presence of fully developed follicles. A sharp drop of GSI was found in the later month and could indicate a sign of ovulation. This was confirmed by a presence of corpus luteum in the ovaries in May. The results from this study suggest that *Leiolepis belliana belliana* in Chonburi province is a seasonal breeder. Both male and female lizards showed peak of gonadal activity in early dry season, possibly followed by ovulation and mating in the later period, and minimal gonadal activity during wet season.

Keyword: gonado-somatic index, testis, ovary, microanatomy,

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	3
ผลการศึกษา	6
สรุปและวิจารณ์ผล	21
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	26
ประวัตินักวิจัยและคณะ	31

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ข้อมูลวันที่เก็บตัวอย่าง เพศ น้ำหนักตัว (BW) ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงรูเปิดทวาร (SVL) ตั้งแต่โคนหางถึงปลายหาง (TL) และน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (GW) ของแย้ *Leiolepis belliana belliana*..... 6
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศผู้..... 8
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศเมีย..... 9

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แย้ *Leiolepis belliana belliana*	3
ภาพที่ 2	อัณฑะในแย้เพศผู้	4
ภาพที่ 3	รังไข่ในแย้เพศเมีย	4
ภาพที่ 4	แผนภูมิสภาพภูมิอากาศ (climate diagram) ของพื้นที่เก็บตัวอย่างในอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	7
ภาพที่ 5	ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศผู้	8
ภาพที่ 6	ลักษณะสัณฐานภายนอกของอัณฑะแย้ *Leiolepis belliana belliana* ในแต่ละเดือน	9
ภาพที่ 7	ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศเมีย	9
ภาพที่ 8	ลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่แย้ *Leiolepis belliana belliana* ในแต่ละเดือน	10
ภาพที่ 9	เนื้อเยื่ออัณฑะของแย้ (A) โครงสร้างเนื้อเยื่ออัณฑะ *Bar = 200 μm* (B) เนื้อเยื่ออัณฑะประกอบด้วย seminiferous tubule (ST, วงกลม), spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) ซึ่งอยู่ในระยะ spermiogenesis, lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*	11
ภาพที่ 10	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนธันวาคม (Early Dec) พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้), lumen (L) *Bar = 100 μm H & E Stain*	11
ภาพที่ 11	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนธันวาคม (Late Dec) พบ spermatogonia (Sg), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*	12
ภาพที่ 12	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกุมภาพันธ์ พบ spermatogonia (Sg) และ lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*	12
ภาพที่ 13	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนพฤษภาคม พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้), lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*	13
ภาพที่ 14	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนมิถุนายน พบ spermatogonia (Sg), Leydig cells (LC), หลอดเลือด (blood vessels, BV) *Bar = 20 μm H & E Stain*	13
ภาพที่ 15	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกรกฎาคม พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), หลอดเลือด (blood vessels, BV), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 20 μm H & E Stain*	14
ภาพที่ 16	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกันยายน พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 50 μm H & E Stain*	14
ภาพที่ 17	เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนพฤศจิกายน พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 100 μm H & E Stain*	15

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อรังไข่ของแย้ (A) โครงสร้างเนื้อเยื่อรังไข่ *Bar = 300 μm* (B) เนื้อเยื่อรังไข่ ประกอบด้วย tunica albuginea (TA), pyriform cells (P), small granulosa cells (GC), zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), cytoplasm (C), nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 50 μm H & E Stain* 15

ภาพที่ 19 รังไข่เดือนธันวาคม (Early Dec) (A) ลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่ (B) เนื้อเยื่อรังไข่ *Bar = 50 μ m H & E Stain* 16

ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกุมภาพันธ์ พบ nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 100 μm H & E Stain* 16

ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนพฤษภาคม พบ corpus luteum (CL) *Bar = 200 μm H & E Stain*.... 17

ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนมิถุนายน พบ zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), corpus luteum (CL) *Bar = 200 μm H & E Stain* 17

ภาพที่ 23 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกรกฎาคม พบ **(A)** zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 100 μm* **(B)** corpus luteum (CL), atretic follicle (AF) *Bar = 200 μm H & E Stain* 18

ภาพที่ 24 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกันยายน พบ **(A)** corpus luteum (CL) **(B)** atretic follicle (AF) *Bar = 200 μm H & E Stain* 18

ภาพที่ 25 แผนผังแสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ (steroidogenic pathway) ในกรอบสีแดงแสดงเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3β-HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของการสังเคราะห์ 19

ภาพที่ 26 จุลกายวิภาคของอัณฑะแย้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (A: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแย้ *H & E Stain*, B: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแย้เมื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3β-HSD) Bar = 200 μm 20

ภาพที่ 27 จุลกายวิภาคของอัณฑะแย้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 แสดงตำแหน่งที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3β-HSD ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Leydig cell ที่อยู่รอบท่อ seminiferous tubule, Bar = 50 μm..... 20

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และการสร้างฮอร์โมนเพศ ในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana* เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

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

อ.ดร. นพดล กิตนะ, อ.ดร. จิรารัช กิตนะ, รศ. ผุสตี ปริยานนท์ และ น.ส. พิชชานิธิ์ แสงธาราทิพย์
Noppadon Kitana, Jirarach Kitana, Putsatee Pariyanonth and Pichani Saengtharatip

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แย้ หรือ Butterfly lizard จัดเป็นสัตว์ที่อยู่ในอันดับ Squamata อันดับย่อย Sauria ในวงศ์ Uromastycidae สกุล *Leiolepis* เป็นสัตว์เลื้อยคลานรูปร่างคล้ายกิ้งก่า ทั่วโลกมี 9 ชนิด พบในประเทศไทย 4 ชนิดคือ *Leiolepis belliana belliana*, *Leiolepis reevesii rubritaeniata*, *Leiolepis boehmei* และ *Leiolepis belliana ocellata* คนนิยมนำแย้มาบริโภคเป็นอาหารโดยเฉพาะทางภาคอีสานของประเทศไทย เนื่องจากมีประโยชน์ด้านคุณค่าทางโภชนาการโดยเป็นแหล่งอาหารโปรตีน นอกจากนี้แย้ยังมีความสำคัญในห่วงโซ่อาหารซึ่งทำหน้าที่ในการหมุนเวียนถ่ายเทพลังงานในระบบนิเวศที่ทำให้เกิดความสมดุลในธรรมชาติ (วชิรญาณ์ ปวงวัฒนา, 2544) เนื่องจากแย้เป็นสัตว์กินอาหารพวกพืชเช่น ใบอ่อนของต้นหญ้า วัชพืช และแมลงเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะในอันดับ Orthoptera, Coleoptera, Odonata, Hymenoptera และ Hemiptera เช่น ตั๊กแตน ด้วงขนาดเล็ก แมลงปอ มด ปลวก ผึ้ง ต่อ แตน หนอน หรือมวนต่าง ๆ แมลงเหล่านี้บางชนิดเป็นศัตรูพืชที่สำคัญต่อพืชไร่และพืชสวน อาจกล่าวได้ว่าแย้มีบทบาทสำคัญในการช่วยลดปริมาณแมลงศัตรูพืช (โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ ไพรัช ทาบสีแพร, 2525) และการเป็นผู้ควบคุมประชากรของแมลงในระบบนิเวศ

แย้ที่พบกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทยตั้งแต่ ภาคเหนือตอนล่าง ภาคตะวันตก ภาคตะวันออก และภาคใต้ (วชิรญาณ์ ปวงวัฒนา, 2544) รวมทั้งบนเกาะต่าง ๆ ในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน ได้แก่แย้ *Leiolepis belliana belliana* มีลักษณะสัณฐานวิทยาคือ ไม่มีแผงหนามที่สันหลัง ไม่มี gular pouch แต่มี transverse gular fold บริเวณใต้คอ มีช่องเปิดของหูขนาดใหญ่ เยื่อหูขนาดใหญ่อยู่ใต้ผิวหนัง เกล็ดบนหลังมีขนาดเล็ก มี femoral pores บริเวณข้างลำตัวทั้งสองด้านมีแถบสีดำสลับแถบสีส้มหรือแถบสีเหลืองขวางกับลำตัวตั้งแต่โคนขาหน้าจนถึงโคนขาหลัง ลวดลายบนหลังมีลักษณะเป็นจุดเล็ก ๆ สีเหลืองขอบดำ และมีแถบ 3 แถบลักษณะเป็นเส้นยาวตลอดกลางหลัง หางยาว บริเวณโคนหางมีสีเขียวมะกอกอมเหลือง (วรัญญา อรัญวาลัย, 2546) พบอาศัยอยู่ตามรูดินในบริเวณที่โล่งเป็นที่ราบ ตามบริเวณป่าโปร่ง ป่าเบญจพรรณ ป่าเต็ง ป่าแดง (โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ ไพรัช ทาบสีแพร, 2525) ไร่ร้าง สวน ดอกไม้ พื้นที่เพาะปลูกต่าง ๆ พื้นดินในบริเวณที่อาศัยประกอบด้วยทรายเป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้ไม่พบว่ามีพื้นที่ที่ประกอบด้วยแย้สองชนิดอาศัยอยู่ร่วมกัน (วรัญญา อรัญวาลัย, 2546) นอกจากนี้แย้จะผสมพันธุ์และวางไข่เพียงปีละหนึ่งถึงสองครั้งเท่านั้น (ผุสตี ปริยานนท์ และคณะ, 2552)

ในปัจจุบันพบว่าปริมาณของแย้ที่พบในประเทศไทยมีจำนวนลดลงไปมาก เนื่องจากถูกจับนำไปบริโภคเป็นอาหารและพื้นที่ที่อยู่อาศัยมีปริมาณลดลงไปเนื่องจากถูกเปลี่ยนไปเป็นพื้นที่ทำการเกษตรกรรมและที่อยู่อาศัยของคน (โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ ไพรัช ทาบสีแพร, 2525) หากไม่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน ในอนาคตแย้อาจสูญพันธุ์ ซึ่งจะส่งผลต่อห่วงโซ่อาหาร ประชากรแมลงเพิ่มขึ้นเนื่องจากผู้ล่ามีจำนวนลดลง ความหลากหลายทางชีวภาพลดลงจนนำไปสู่ การเสียความสมดุลของระบบนิเวศ ดังนั้นจึงมีหลายหน่วยงานในประเทศไทย (เช่น สวนสัตว์เปิดเขาเขียว) ที่เริ่มเพาะเลี้ยงแย้ เพื่อประโยชน์ด้านการเพิ่มจำนวนแย้ และนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์แย้ อย่างไรก็ดีในการจัดการด้านการเพาะเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ โดยมีการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและท่อนำอสุจิของจระเข้น้ำจืดพันธุ์ไทย ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย โดยสามารถนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเลี้ยงซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเศรษฐกิจไทย (Roomratanapun et al., 2000) ดังนั้นจึงได้จัดทำโครงการศึกษาวงสืบพันธุ์ของแย้ โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และพิจารณาจากน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์ กับน้ำหนักตัว เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาการสืบพันธุ์ ของสัตว์เลื้อยคลาน เนื่องจากข้อมูลทางด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์เลื้อยคลานมีน้อยและยังมีการศึกษาไม่มากนัก และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการค้นคว้าวิจัยและการอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาวงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* เนื่องจากพบได้ทั่วไป มีการกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จึงสะดวกต่อการนำมาศึกษา โดยในการเก็บตัวอย่างนั้นได้รับความร่วมมือจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่รอบ ๆ บริเวณสวนสัตว์ ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาวงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* เพศผู้ และเพศเมีย โดยพิจารณาจากน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์ กับน้ำหนักตัว (gonado-somatic index, GSI)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* เพศผู้ และเพศเมียในแต่ละช่วงฤดูกาล
3. เพื่อศึกษาการสร้างฮอร์โมนเพศกลุ่มสเตียรอยด์ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana* เพศผู้และเพศเมีย ในช่วงฤดูสืบพันธุ์

วิธีดำเนินการศึกษา

การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

การเก็บตัวอย่างแย้จากภาคสนามในบริเวณรอบ ๆ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว เขาเขียว-เขาชมภู่ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในช่วงฤดูแล้ง (ธันวาคม 2552-เมษายน และ พฤศจิกายน 2553) และฤดูฝน (พฤษภาคม-ตุลาคม 2553) ให้ได้ตัวอย่างแย้ฤดูกาลละ 4-10 ตัว/เพศ ก่อนนำมาศึกษาต่อในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 1 แย้ *Leiolepis belliana belliana*

การหาช่วงฤดูกาล

นำข้อมูลปริมาณน้ำฝนทั้งหมด และอุณหภูมิเฉลี่ย ตลอด 12 เดือน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 จากสถานีกรมอุตุนิยมวิทยาที่ตั้งอยู่ในบริเวณใกล้เคียงกับพื้นที่ที่เก็บตัวอย่าง เพื่อทำกราฟบรรยายสภาวะอากาศ หรือ Climate diagram โดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel สำหรับการสร้างกราฟ

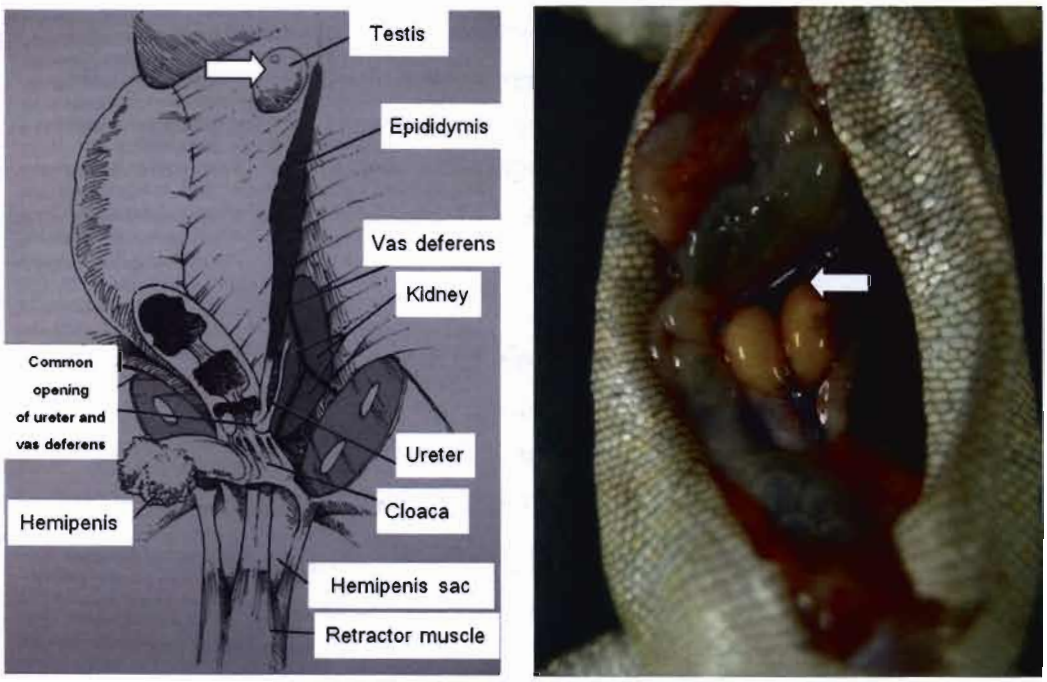
การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

1. การตรวจสอบทางสัณฐานและกายวิภาค

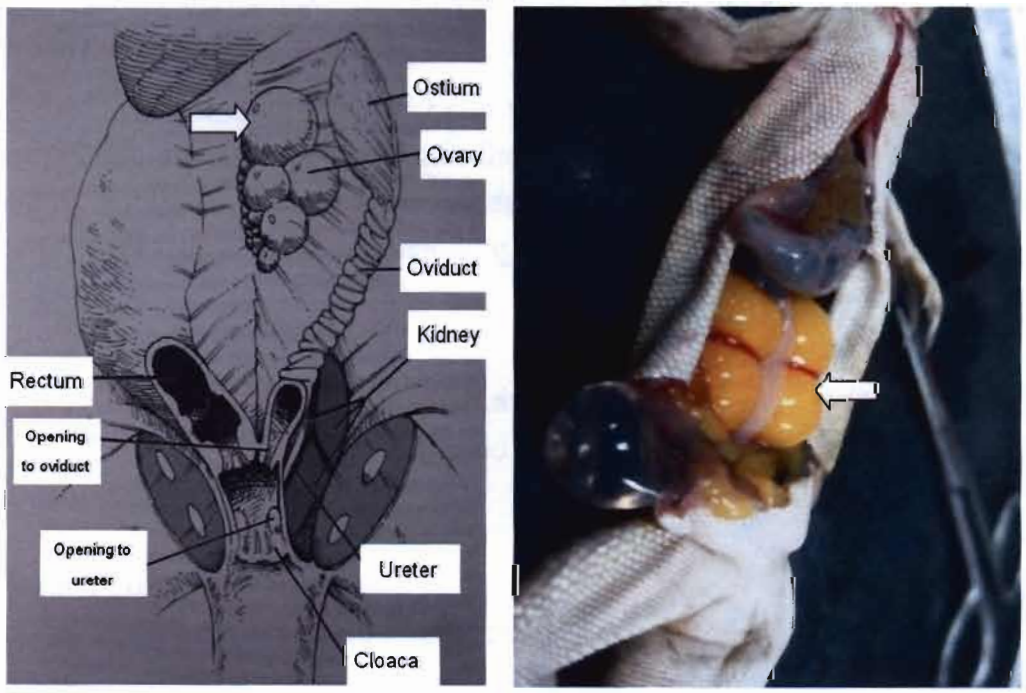
บันทึกข้อมูลเพศ และน้ำหนักตัว จากนั้นสลบแย้ด้วยเพนโทบาบิโทนโซเดียม (Pentobarbitone Sodium) ปริมาณ 30 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว กิโลกรัม (Timmermans et al., 1991) โดยการฉีดเข้าช่องท้อง จากนั้นวัดความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงรูเปิดทวาร (snout-vent length, SVL) และตั้งแต่โคนหางถึงปลายหาง (tail length, TL) และผ่าตัดนำอัณฑะและรังไข่ ชั่งน้ำหนัก เพื่อนำมาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักตัว (gonado-somatic index, GSI) โดยหาค่า GSI ได้จากสมการ

GSI = (น้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ / น้ำหนักตัว) x 100

เก็บรักษาตัวอย่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านหนึ่งด้วยวิธีการแช่แข็งเพื่อนำไปตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenic activity) และเก็บเนื้อเยื่อส่วนที่เหลือไว้ในสารละลาย Davidson เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพที่ 2 อัณฑะในแย้เพศผู้ (ซ้าย: รูปจาก Pough et al. 2003, ขวา: ภาพโดย รชตะ มณีอินทร์)



ภาพที่ 3 รังไข่ในแย้เพศเมีย (ซ้าย: รูปจาก Pough, et al. 2003, ขวา: ภาพโดย รชตะ มณีอินทร์)

2. การเตรียมตัวอย่างเป็นสไลด์ถาวรสำหรับศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างอัณฑะและรังไข่ที่เก็บไว้ในสารละลาย Davidson เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาเปลี่ยนถ่ายเก็บใน สารละลายเอทานอล 70% (สำหรับอัณฑะ) และเปลี่ยนถ่ายเก็บใน สารละลาย glycerine 10% ในสารละลายเอทานอล 70% (สำหรับรังไข่) ก่อนนำไปผ่านขั้นตอน paraffin method และย้อมสี hematoxylin and eosin เพื่อเตรียมเป็นสไลด์ถาวรสำหรับศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่แข็ง มาฝังใน tissue freezing medium แล้ววางบนแป้นสำหรับตัดเนื้อเยื่อ แล้วตัดเนื้อเยื่อแบบ frozen section ที่อุณหภูมิ -20 °C ด้วยเครื่อง cryostat ให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่มีความหนาเท่ากับ 20 ไมโครเมตร แล้วติดลงบนกระจกปิดสไลด์ที่เคลือบด้วยสาร poly-L-lysine

นำชิ้นเนื้อเยื่อจุ่มใน acetone เย็น เพื่อรักษาสภาพของเอ็นไซม์ ก่อนล้างด้วยสารละลายฟอสเฟต แล้วนำมาตรวจสอบการทำงานของเอ็นไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3β-HSD) โดย 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)

ล้างเนื้อเยื่อด้วยสารละลายฟอสเฟต ก่อนนำมารักษาสภาพเนื้อเยื่อ แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate), ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีความโปร่งแสง (clear) ก่อนนำไป mount บนกระจกสไลด์ โดยใช้ DPX เป็นตัวกลาง แล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อหาตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนจากบริเวณที่ปรากฏสีน้ำเงินเข้มของสาร formazan

การวิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ GSI ระหว่างเดือนต่าง ๆ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และหาความแตกต่างโดยวิธี Student-Newman-Keuls Method โดยใช้โปรแกรม SigmaStat 2.0 สำหรับการวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สถานที่ทำการศึกษาและเก็บข้อมูล

พื้นที่ในการเก็บตัวอย่าง คือ พื้นที่เกษตรกรรมบริเวณโดยรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว เขาเขียว-เขาชมภู่ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี และพื้นที่ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการ คือ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลพื้นฐานของแย้ที่ศึกษา

จากการเก็บตัวอย่างแย้ *Leiolepis belliana belliana* ในพื้นที่บริเวณรอบ ๆ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว เขาเขียว-เขาชมภู่ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ในเดือนธันวาคม 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 ได้ตัวอย่างแย้ทั้งหมด 42 ตัว โดยมีเพศผู้ 24 ตัว และเพศเมีย 18 ตัว โดยแสดงข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ดังตารางที่ 1

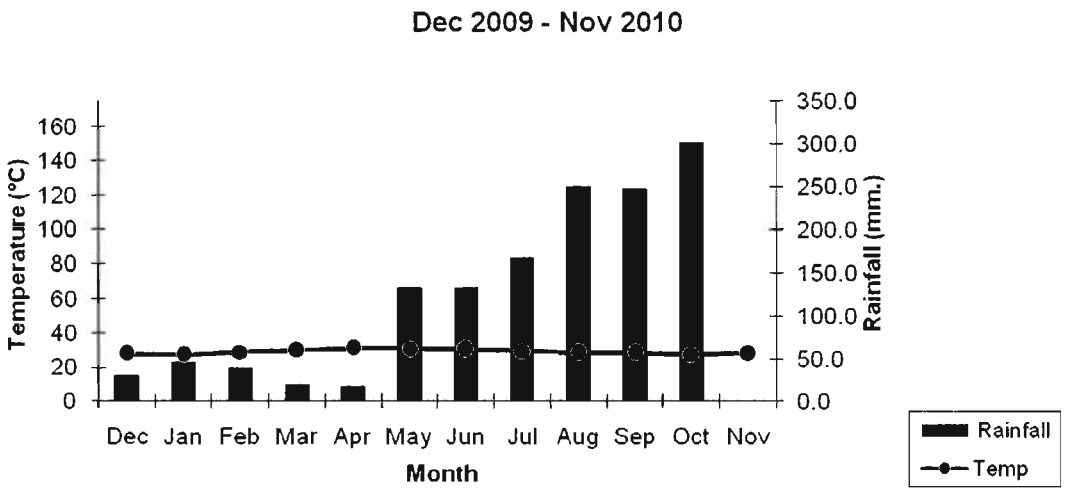
ตารางที่ 1 ข้อมูลวันที่เก็บตัวอย่าง เพศ น้ำหนักตัว (BW) ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกถึงรูเปิดทวาร (SVL) ตั้งแต่โคนหางถึงปลายหาง (TL) และน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (GW) ของแย้ *Leiolepis belliana belliana*

Date	Code	Sex	BW (g)	SVL (mm)	TL (mm)	GW (g)
2 Dec 09	K12M01	Male	41.4	119.22	237.03	0.3765
	K12M02	Male	40.44	116.42	209.52	0.4825
	K12M03	Male	39.02	114.28	205.3	0.3581
	K12M04	Male	56.53	124.29	261.55	0.5722
	K12M05	Male	54.42	123.19	256.68	0.5965
	K12F06	Female	26.84	99.65	202.03	2.3687
22 Dec 09	K12M07	Male	39.77	116.4	246.7	0.1007
	K12M08	Male	49.9	122.51	266.12	0.1651
	K12M09	Male	55.12	131.62	121.66	0.1262
	K12M10	Male	37.64	109.63	238.48	0.0484
	K12M11	Male	50.99	124.52	265.34	0.2332
	K12M12	Male	86.65	151.19	311.84	0.2117
	K12M13	Male	80.39	145.54	294.46	0.0866
	K12M14	Male	30.37	104.69	221.79	0.07
	K12M15	Male	74.25	146.5	313.26	0.0883
	K12M16	Male	82.79	143.9	305.76	0.0908
3 Feb 10	K02F17	Female	28.37	107.04	222.29	0.0184
	K02M18	Male	28.16	104.31	215.85	0.0171
	K02F19	Female	32.31	112.85	239.09	0.0307
	K02F20	Female	36.81	118.32	256.73	0.0438
10 May 10	K05-21M	Male	57.09	125.5	265.14	0.0754
	K05-22F	Female	44.89	120.62	251.25	0.054
	K05-23F	Female	42.67	116.45	154.05	0.0562
	K05-24F	Female	45.23	117.42	144.64	0.0595
	K05-25F	Female	47.12	119.67	238.78	0.0691
17 Jun 10	K06-26F	Female	45.57	117.51	228.55	0.0524
	K06-27M	Male	64.28	127.15	255.83	0.0373
	K06-28F	Female	43.2	114.61	243.82	0.0388
28 Jul 10	K07-29F	Female	32.7	102.49	215.31	0.0224
	K07-30M	Male	23.55	92.57	179.43	0.0237
	K07-31F	Female	25.89	101.31	85.75	0.0417
	K07-32F	Female	33.03	106.68	211.35	0.0424

Date	Code	Sex	BW (g)	SVL (mm)	TL (mm)	GW (g)
10 Sep 10	K09-33M	Male	53.47	124.29	245.01	0.0674
	K09-34M	Male	38.8	118.98	170.46	0.0533
	K09-35F	Female	38.66	121.53	191.24	0.0461
	K09-36F	Female	23.23	107	214	0.0617
	K09-37F	Female	30.78	126	225	0.0498
	K09-38F	Female	40.18	123	106	0.065
	K09-39F	Female	41.07	118	246	0.0475
13 Nov 10	K11-40M	Male	34.75	108.87	174.63	0.3495
	K11-41M	Male	44.75	114.32	234.52	0.3183
	K11-42M	Male	72.96	135.81	280.98	0.5066

2. การหาช่วงฤดูกาล

จากข้อมูลปริมาณน้ำฝนทั้งหมด และอุณหภูมิเฉลี่ย ตลอด 12 เดือน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 จากสถานีกรมอุตุนิยมวิทยา นำมาทำกราฟบรรยายสภาวะอากาศ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 แผนภูมิสภาพภูมิอากาศ (climate diagram) ของพื้นที่เก็บตัวอย่างในอำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

จากกราฟกำหนดให้แกน Y ด้านซ้ายคืออุณหภูมิเฉลี่ย (องศาเซลเซียส) แกน Y ด้านขวาคือปริมาณน้ำฝนทั้งหมด (มิลลิเมตร) แกน X คือ เดือน กราฟเส้นคืออุณหภูมิเฉลี่ย กราฟแท่งคือปริมาณน้ำฝนทั้งหมด หลักการคือปริมาณน้ำฝนทั้งหมดที่ได้มามีค่าเป็นสองเท่าของอุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละเดือน ดังนั้นช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนทั้งหมดสูงกว่าอุณหภูมิเฉลี่ย แสดงถึง ฤดูฝน ซึ่งตรงกับช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ในพื้นที่ศึกษา และ ช่วงที่มีปริมาณน้ำฝนทั้งหมดต่ำกว่าอุณหภูมิเฉลี่ย แสดงถึง ฤดูแล้ง ซึ่งตรงกับ พบในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนเมษายน

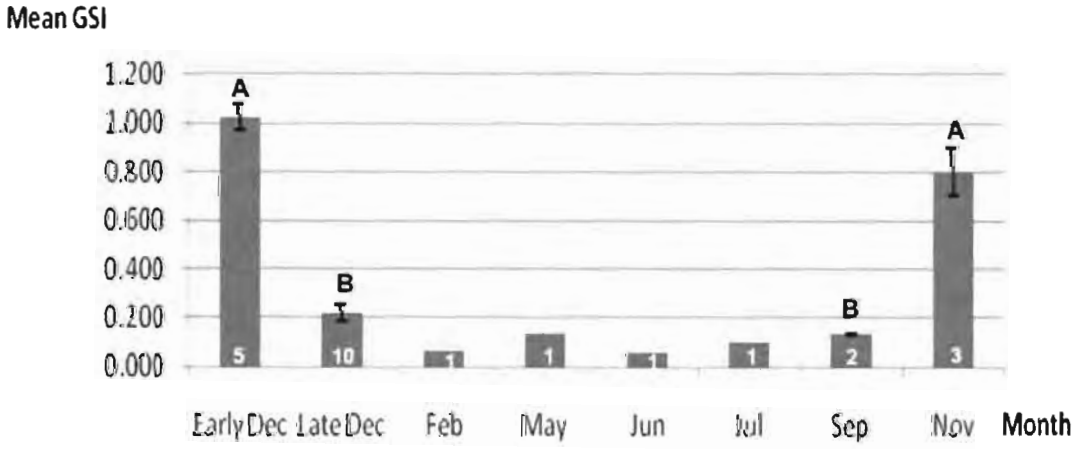
3. Gonado-somatic index (GSI) และลักษณะสัณฐานภายนอกของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการคำนวณน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์ กับน้ำหนักตัว (GSI) พบว่าในเพศผู้ ค่าเฉลี่ย GSI ในเดือนธันวาคม และเดือนพฤศจิกายนมีค่าสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าเฉลี่ยในช่วงอื่น ๆ ของปี (One-way ANOVA, $p<0.05$, Student-Newman-Keuls Method)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศผู้

	Mean GSI	SEM
Early Dec 09	1.0260	0.054
Late Dec 09	0.2210	0.0356
Feb 10	0.0607	0
May 10	0.1321	0
Jun 10	0.0580	0
Jul 10	0.1006	0
Sep 10	0.1320	0.00566
Nov 10	0.8040	0.101

<u>หมายเหตุ</u> กรณี SEM = 0 เนื่องจากตัวอย่าง n=1



ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ย และ Standard error of means (SEM) ของ GSI ในแย้เพศผู้ (ตัวอักษรเหนือกราฟที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p<0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย GSI ในแต่ละเดือน พบว่าในเดือนธันวาคมมีค่าเฉลี่ย GSI สูงสุดสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกของอัณฑะซึ่งมีขนาดใหญ่สุด หลังจากนั้นอัณฑะจะมีขนาดเล็กลงในช่วงเวลาต่อมา

ภาพที่ 8 ลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่แย้ *Leiolepis belliana belliana* ในแต่ละเดือน

4. โครงสร้างจุลกายวิภาค

4.1 จุลกายวิภาคของอัณฑะ

พบว่าเนื้อเยื่ออัณฑะ ประกอบด้วย seminiferous tubules จำนวนมากมาย ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Callard and Callard, 1998) และมี interstitial cells หรือ Leydig cells อยู่บริเวณโดยรอบ และอาจพบหลอดเลือดแทรก ส่วนภายใน seminiferous tubules ประกอบด้วย spermatogenic cell ต่างๆ ได้แก่ spermatogonia, spermatocytes, spermatids และตรงกลางท่อเป็นบริเวณที่อสุจิจะถูกปล่อยเข้าสู่ คือ lumen โดยลักษณะเนื้อเยื่ออัณฑะในแต่ละเดือนมีลักษณะแตกต่างกันไป ในการศึกษาครั้งนี้ได้อาศัยเกณฑ์ของ Radder et al. (2001) ที่ได้แบ่ง testicular activity ของกิ้งก่า *Calotes versicolor* ออกเป็น 6 stage โดยพิจารณาจากการปรากฏ และความหนาแน่นของเซลล์ต่าง ๆ ใน spermatogenesis ดังนี้

I. พบ spermatogonia ภายใน seminiferous tubules เท่านั้น

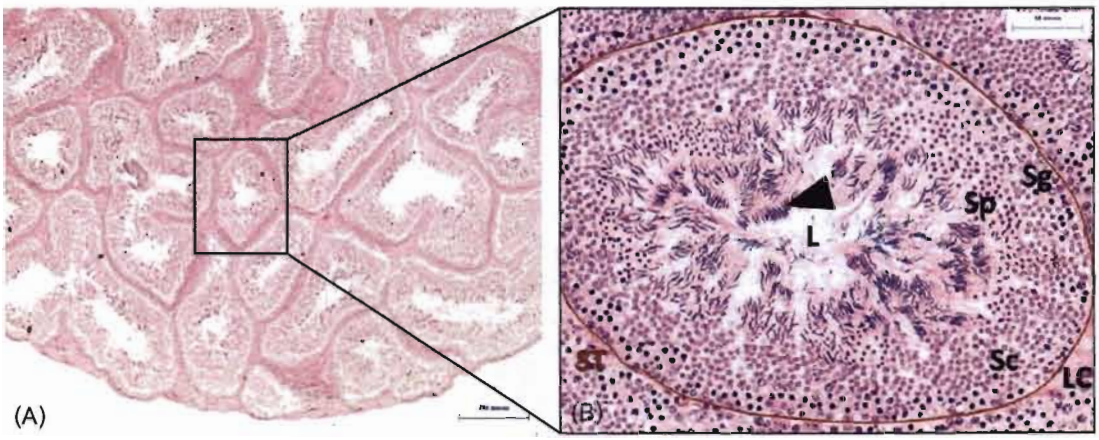
II. พบ spermatogonia, primary spermatocytes และ secondary spermatocytes

III.พบ spermatogonia, spermatocytes และ spermatids จำนวนปานกลาง

IV.พบ spermatogonia, spermatocytes, spermatids จำนวนมาก และ อสุจิ

V. พบ residual spermatids และอสุจิภายใน lumen

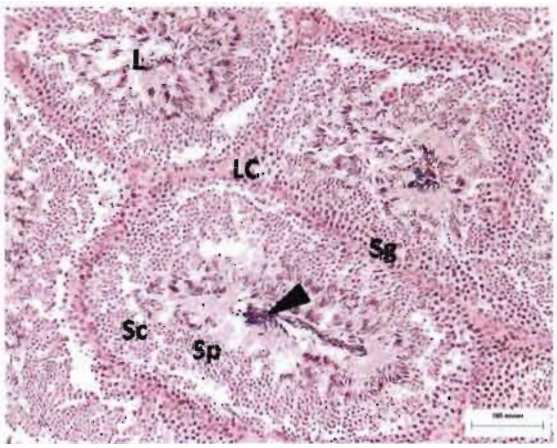
VI. พบชั้นของ spermatogonia และ Sertoli cells 1 ชั้นภายใน seminiferous tubules



ภาพที่ 9 เนื้อเยื่ออัณฑะของแย้ (A) โครงสร้างเนื้อเยื่ออัณฑะ *Bar = 200 μm* (B) เนื้อเยื่ออัณฑะประกอบด้วย seminiferous tubule (ST, วงกลม), spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) ซึ่งอยู่ในระยะ spermiogenesis, lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*

<u>เดือนธันวาคม (Early Dec)</u>

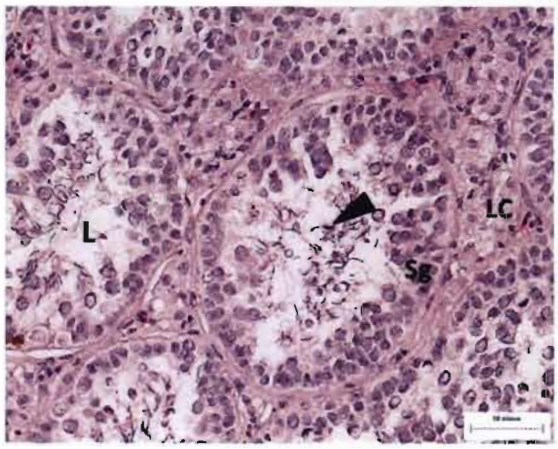
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดใหญ่ lumen มีขนาดแคบ เนื่องจากมี spermatogenic cell ในระยะต่าง ๆ จำนวนมาก ได้แก่ spermatogonia, spermatocytes และ spermatids พบหลอดเลือดแทรกอยู่ตาม Leydig cells ซึ่งพบเซลล์จำนวนประปราย โดยภายใน Leydig cells ประกอบด้วย lipid droplet ภายใน cytoplasm ทำให้เซลล์มีลักษณะบวม อ้วนกลม เรียกลักษณะดังกล่าวว่า spongiocyte นอกจากนี้พบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis และเจริญจนสมบูรณ์จะถูกปล่อยเข้าสู่ lumen จึงพบอสุจิจำนวนมากภายใน lumen (Hernandez-Gallegos, 2002) แสดงถึง stage IV



ภาพที่ 10 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนธันวาคม (Early Dec) พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้), lumen (L) *Bar = 100 μm H & E Stain*

เดือนธันวาคม (Late Dec)

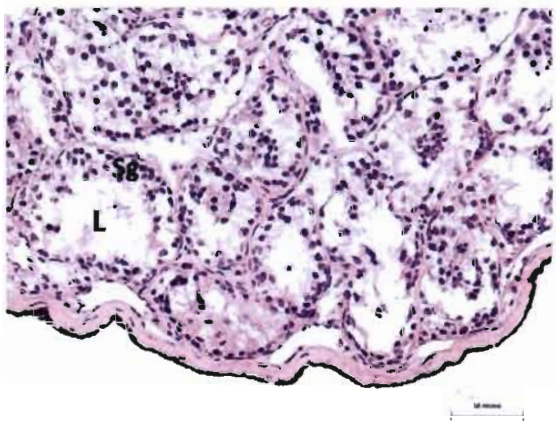
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็กลง lumen ส่วนใหญ่มีขนาดกว้าง ดูหลวม ๆ เนื่องจากภายใน seminiferous tubules พบ spermatogonia เป็นส่วนใหญ่ พบ Leydig cells มีลักษณะค่อนข้างกลม เซลล์เป็นแบบ spongiocyte และพบเซลล์จำนวนประปราย นอกจากนี้พบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis และเจริญจนสมบูรณ์เป็นอสุจิมีจำนวนค่อนข้างน้อยมาก แสดงถึง stage V



ภาพที่ 11 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนธันวาคม (Late Dec) พบ spermatogonia (Sg), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) lumen (L) *Bar = 50 µm H & E Stain*

เดือนกุมภาพันธ์

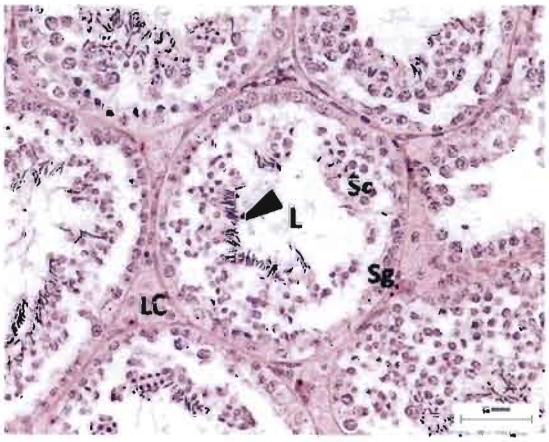
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็ก lumen มีขนาดกว้าง ดูหลวม ๆ พบเฉพาะ spermatogonia เรียงตัวชั้นเดียวบริเวณ basement membrane และไม่พบอสุจิ แสดงถึง stage VI



ภาพที่ 12 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกุมภาพันธ์ พบ spermatogonia (Sg) และ lumen (L) *Bar = 50 µm H & E Stain*

เดือนพฤษภาคม

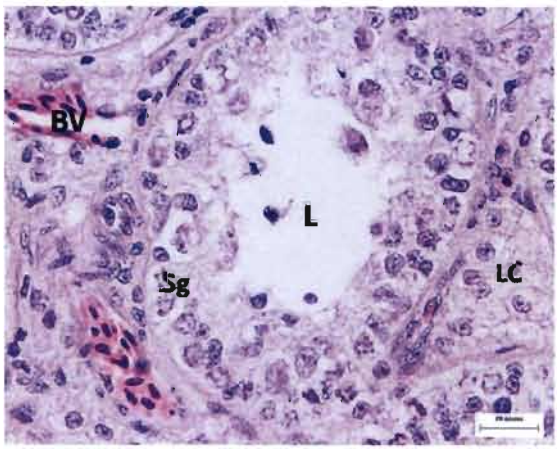
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็ก lumen มีขนาดกว้าง ดูหลวมๆ พบ spermatogonia, spermatocyte และ อสุจิ ซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis แต่ยังไม่เจริญจนสมบูรณ์ Leydig cells มีลักษณะค่อนข้างกลม พบเซลล์จำนวนค่อนข้างมากขึ้น แสดงถึง stage II



ภาพที่ 13 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนพฤษภาคม พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้), lumen (L) *Bar = 50 μm H & E Stain*

เดือนมิถุนายน

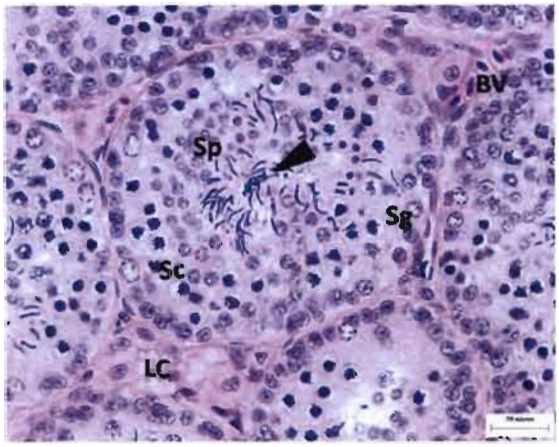
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็ก lumen มีขนาดไม่กว้างเท่าเดือนพฤษภาคม พบ spermatogonia จำนวนน้อย และไม่พบอสุจิ Leydig cells มีลักษณะอ้วนกลม พบเซลล์จำนวนค่อนข้างมากขึ้น และพบหลอดเลือดแทรก แสดงถึง stage I



ภาพที่ 14 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนมิถุนายน พบ spermatogonia (Sg), Leydig cells (LC), หลอดเลือด (blood vessels, BV) *Bar = 20 μm H & E Stain*

เดือนกรกฎาคม

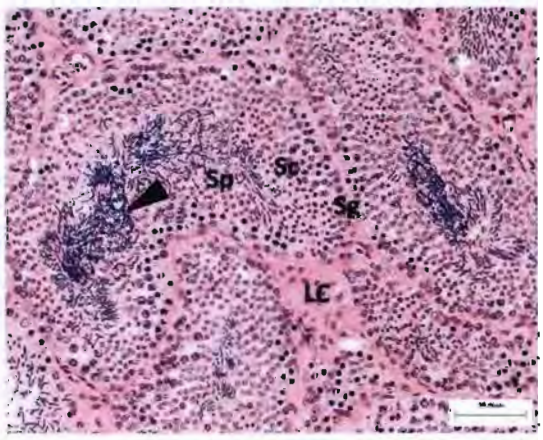
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็กแต่ lumen มีขนาดแคบ มี spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ จำนวนมากขึ้นได้แก่ spermatogonia, spermatocytes และ spermatids พบหลอดเลือดแทรกอยู่ตาม Leydig cells ซึ่งพบเซลล์เป็นจำนวนมาก โดยภายใน Leydig cells เต็มไปด้วย lipid droplet ภายใน cytoplasm ทำให้เซลล์มีลักษณะบวม อ้วนกลม เซลล์เป็นแบบ spongiocyte นอกจากนี้พบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis จำนวนเล็กน้อย แสดงถึง stage IV



ภาพที่ 15 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกรกฎาคม พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), หลอดเลือด (blood vessels, BV), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 20 μm H & E Stain*

<u>เดือนกันยายน</u>

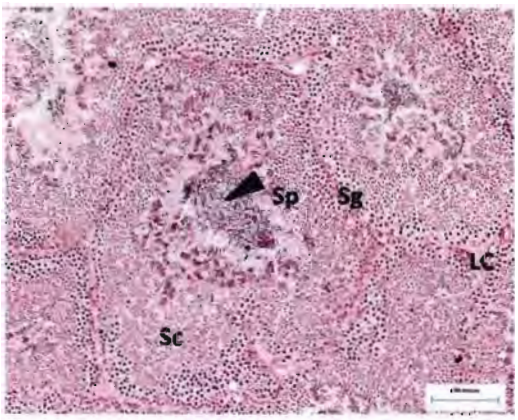
พบว่า seminiferous tubules เริ่มมีขนาดใหญ่ lumen มีขนาดแคบ มี spermatogenic cell ทุกระยะจำนวนมาก พบ Leydig cells เป็นจำนวนมาก เซลล์มีลักษณะอ้วนกลม ภายใน cytoplasm เต็มไปด้วย lipid droplet เซลล์เป็นแบบ spongiocyte ชัดเจน นอกจากนี้พบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis และเจริญเป็นอสุจิจนสมบูรณ์จำนวนมาก แสดงถึง stage IV



ภาพที่ 16 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนกันยายน พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 50 μm H & E Stain*

<u>เดือนพฤศจิกายน</u>

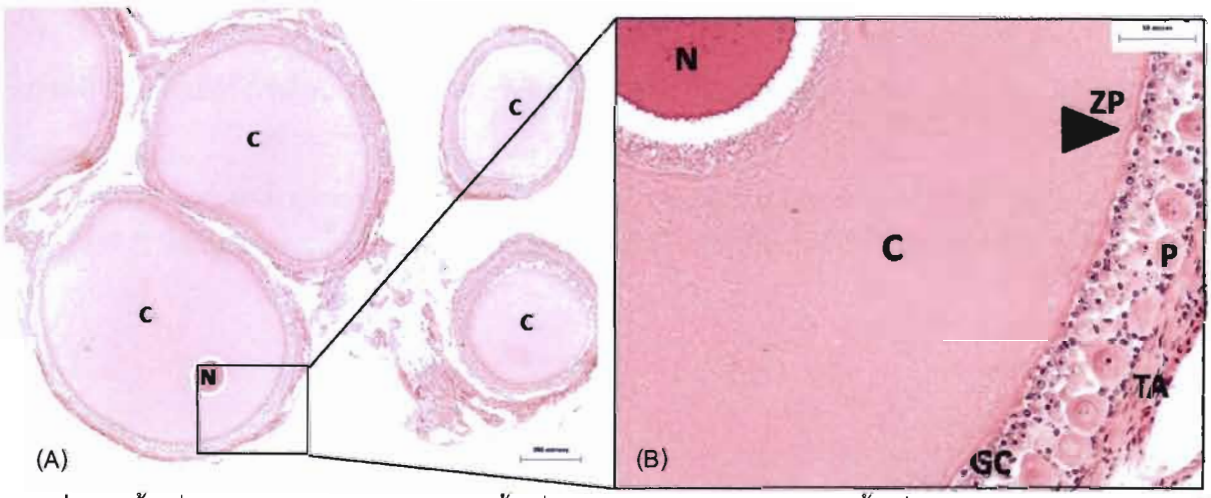
พบว่า seminiferous tubules มีขนาดใหญ่ lumen มีขนาดแคบ มี spermatogenic cell ทุกระยะเป็นจำนวนมากกว่าในเดือนอื่น ๆ พบ Leydig cells จำนวนเล็กน้อย พบประปราย เซลล์มีลักษณะเล็กลง นอกจากนี้พบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis และเจริญเป็นอสุจิจนสมบูรณ์จำนวนมากกว่าในเดือนอื่น ๆ แสดงถึง stage V



ภาพที่ 17 เนื้อเยื่ออัณฑะ เดือนพฤศจิกายน พบ spermatogonia (Sg), spermatocytes (Sc), spermatids (Sp), Leydig cells (LC), sperm (ลูกศรชี้) *Bar = 100 μm H & E Stain*

4.2 จุลกายวิภาคของรังไข่

พบว่าเนื้อเยื่อรังไข่ ถูกห่อหุ้มด้วย tunica albuginea ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่ง ภายในรังไข่ ประกอบด้วย oocyte โดยภายใน oocyte มี นิวเคลียส, cytoplasm, zona pellucida, granulosa cells พบ 2 รูปแบบคือ small granulosa cells ลักษณะเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาดเล็ก และ pyriform cells ลักษณะเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาดใหญ่ (Wilhoft, 1963a; Lessman, 1999) และอาจพบ atretic follicle หรือ corpus luteum ในบางช่วงเวลา โดยลักษณะเนื้อเยื่อรังไข่ ในแต่ละเดือนมีลักษณะแตกต่างกันไป แต่พบ granulosa cells ทั้ง 2 รูปแบบทุกเดือน

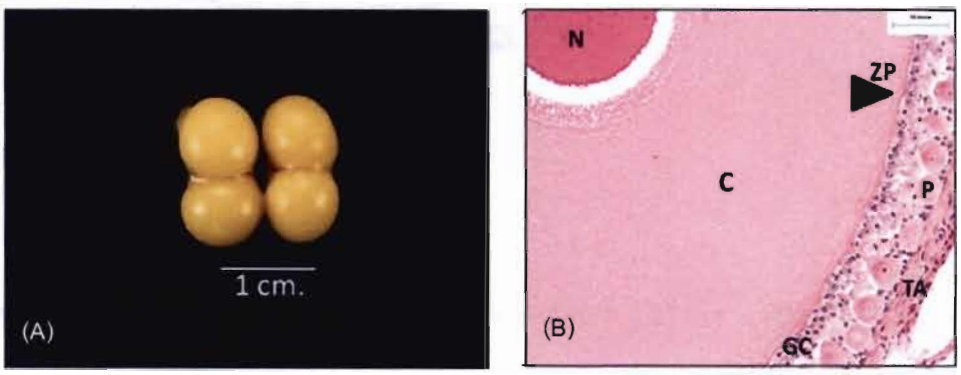


ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อรังไข่ของแย้ (A) โครงสร้างเนื้อเยื่อรังไข่ *Bar = 300 μm* (B) เนื้อเยื่อรังไข่ ประกอบด้วย tunica albuginea (TA), pyriform cells (P), small granulosa cells (GC), zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), cytoplasm (C), nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 50 μm H & E Stain*

I28855785

เดือนธันวาคม (Early Dec)

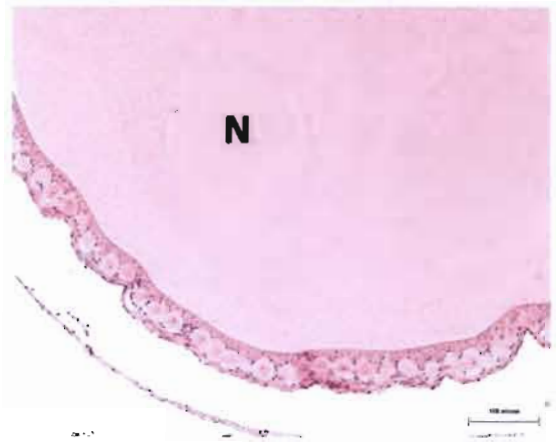
พบว่ารังไข่เจริญเต็มที่ภายในเต็มไปด้วย yolk ลักษณะเนื้อเยื่อรังไข่ มีลักษณะดังรายละเอียดในภาพที่ 18



ภาพที่ 19 รังไข่เดือนธันวาคม (Early Dec) (A) ลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่ (B) เนื้อเยื่อรังไข่ *Bar = 50 µm H & E Stain*

เดือนกุมภาพันธ์

พบว่า oocyte มี excentri nucleus คือ นิวเคลียสที่เคลื่อนออกมาบริเวณริม oocyte



ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกุมภาพันธ์ พบ nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 100 µmH & E Stain*

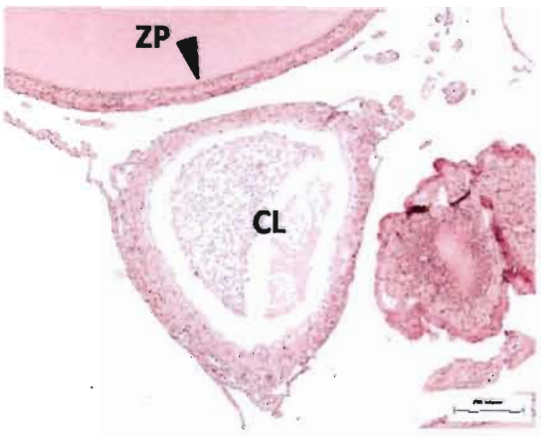
เดือนพฤษภาคม

พบว่า oocyte มี excentri nucleus นอกจากนี้ยังพบ corpus luteum (Wilhoft, 1963a; Zug et al., 1982) มีลักษณะของเนื้อเยื่อที่กำลังสลาย สามารถเห็นชั้นของเนื้อเยื่อซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันได้

ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนพฤษภาคม พบ corpus luteum (CL) *Bar = 200 µm H & E Stain*

<u>เดือนมิถุนายน</u>

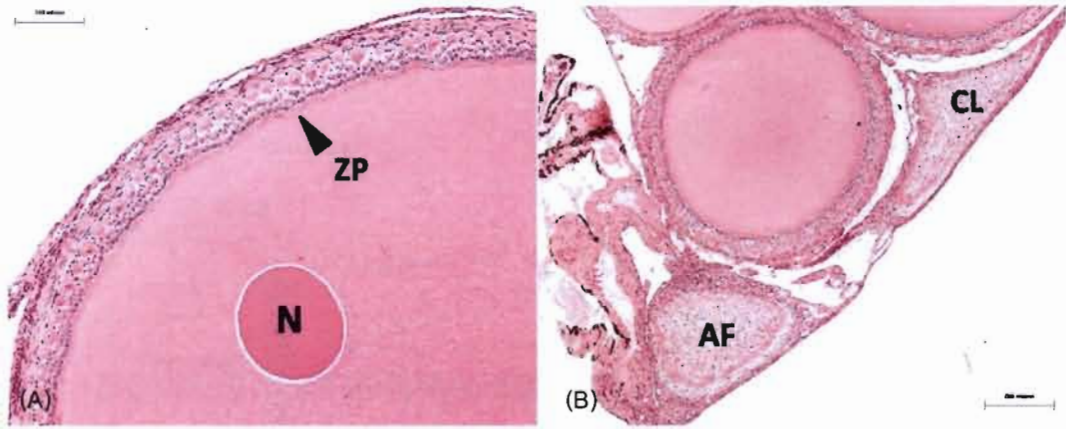
พบว่า oocyte มี excentri nucleus และ zona pellucida ซึ่งมีขนาดใหญ่ นอกจากนี้พบ corpus luteum อีกด้วย



ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนมิถุนายน พบ zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), corpus luteum (CL) *Bar = 200 µm H & E Stain*

<u>เดือนกรกฎาคม</u>

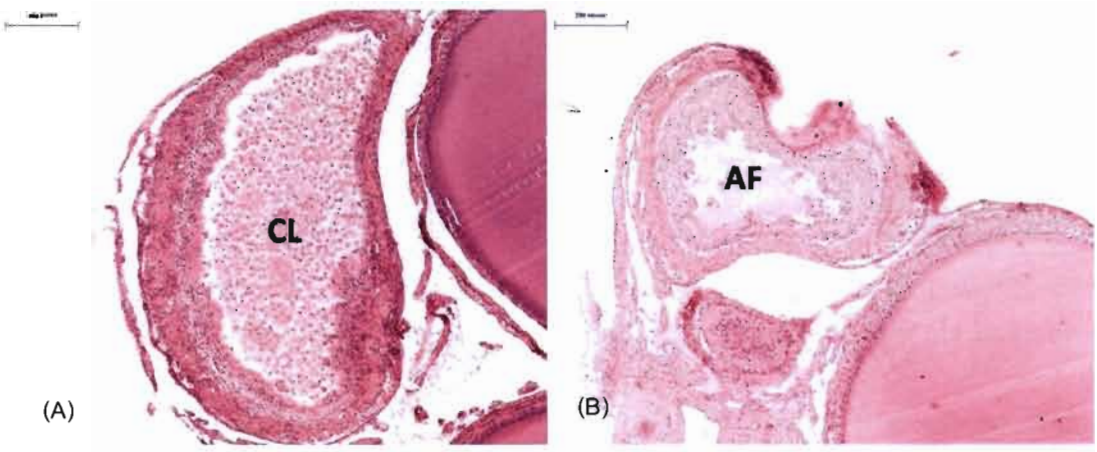
พบว่ามีลักษณะคล้ายกับเดือนมิถุนายนคือ oocyte มี excentri nucleus และ zona pellucida มีขนาดใหญ่ และพบ corpus luteum นอกจากนี้พบ atretic follicle ซึ่งมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่กำลังสลายแต่จะไม่เห็นลักษณะของชั้นเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 23 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกรกฎาคม พบ **(A)** zona pellucida (ZP, ลูกศรชี้), nucleus (N) ของ oocyte *Bar = 100 μm* **(B)** corpus luteum (CL), atretic follicle (AF) *Bar = 200 μm H & E Stain*

<u>เดือนกันยายน</u>

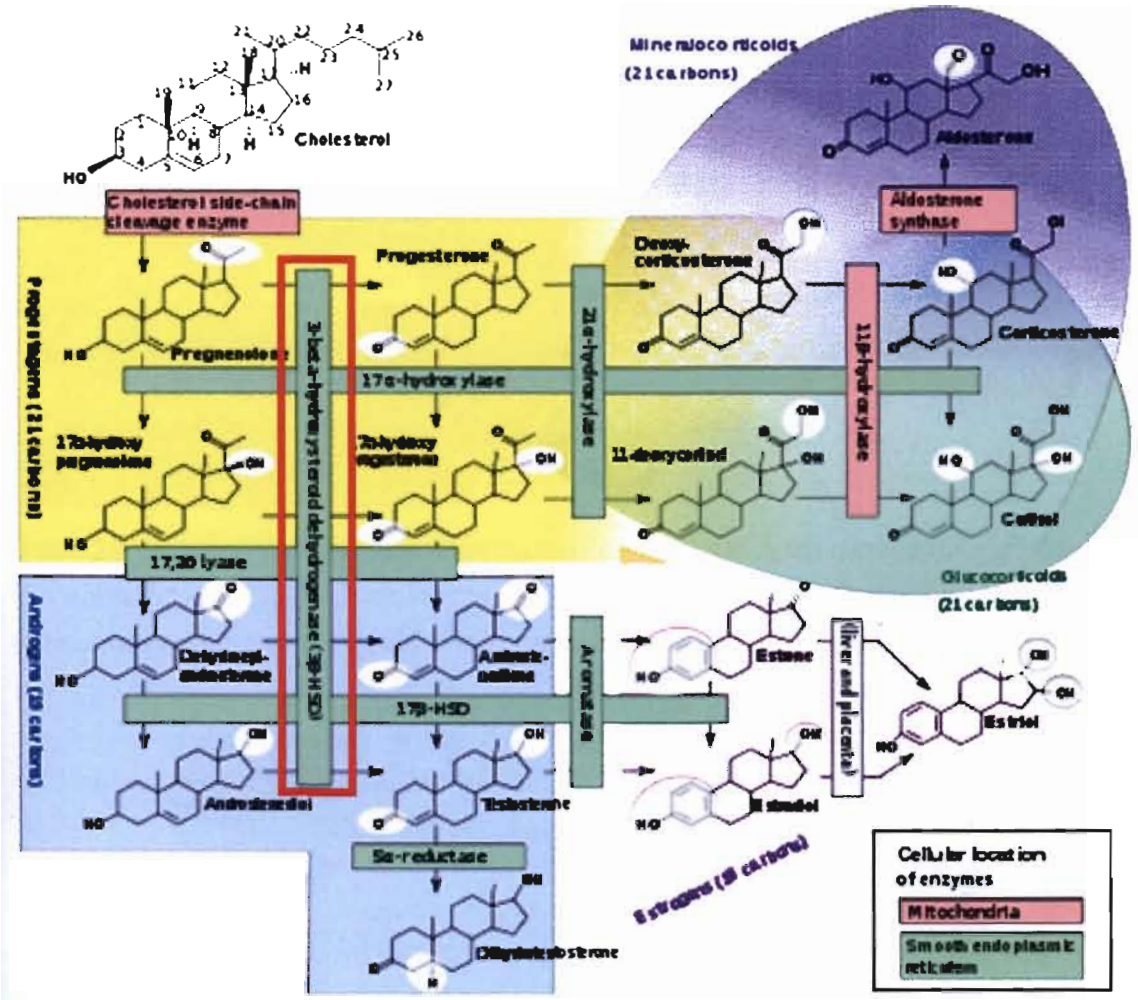
พบว่ามีลักษณะคล้ายกับเดือนกรกฎาคมคือ excentri nucleus, zona pellucida, corpus luteum และ atretic follicle



ภาพที่ 24 เนื้อเยื่อรังไข่เดือนกันยายน พบ **(A)** corpus luteum (CL) **(B)** atretic follicle (AF) *Bar = 200 μm H & E Stain*

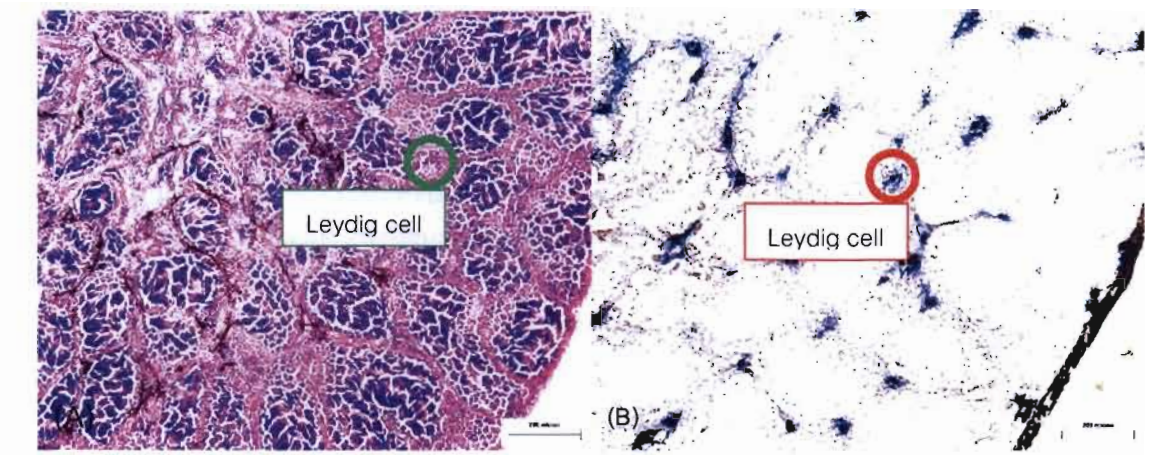
5. การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ในอัณฑะของแย้

การทำงานของเอ็นไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3β-HSD) เป็นเอ็นไซม์ตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการสร้างฮอร์โมนเพศที่เป็นสเตียรอยด์ทุกชนิด (ภาพที่ 25; Johnson and Everitt, 2000) การพบตำแหน่งที่มีเอนไซม์ 3β-HSD ทำงานอยู่จึงแสดงให้เห็นว่าเป็นตำแหน่งที่สามารถสร้างฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ได้ (Doddamani, 1994)

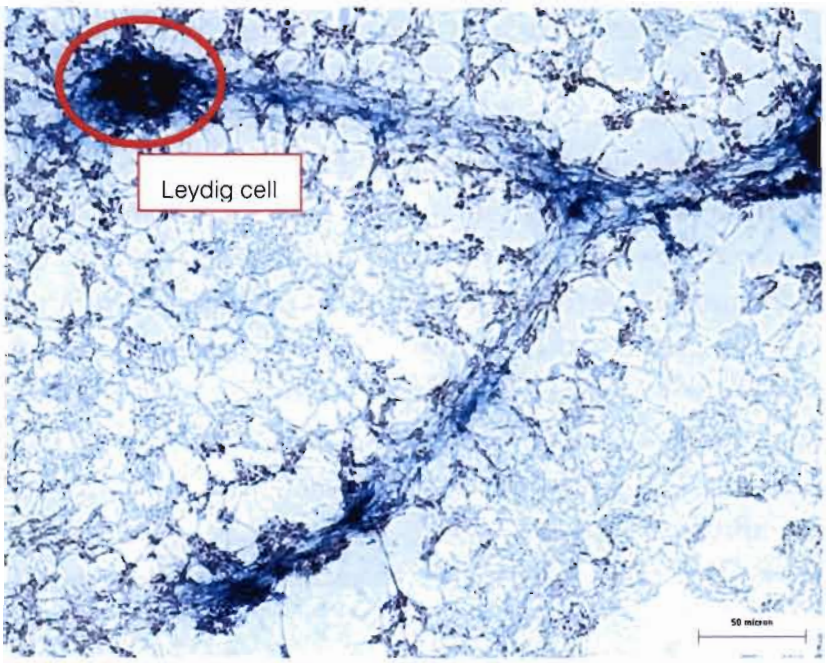


ภาพที่ 25 แผนผังแสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ (steroidogenic pathway) ในกรอบสีแดงแสดงเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3□-HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของการสังเคราะห์

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่ออัณฑะของแย้เพศผู้ในช่วงที่มีค่า GSI สูงสุด (ธันวาคม) มาตรวจสอบหา บริเวณที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3⇦-HSD ตามวิธีการของ Levy et al. (1959) พบว่าเนื้อเยื่ออัณฑะของแย้มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3⇦-HSD ที่ชัดเจน (ตำแหน่งที่ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มในภาพที่ 26 A) ในบริเวณรอบท่อ seminiferous tubule และเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งทางจุลกายวิภาค พบว่าเป็นตำแหน่งของ Leydig cells (ภาพที่ 26-27)



ภาพที่ 26 จุลกายวิภาคของอัณฑะแย้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (A: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแย้ *H & E Stain*, B: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแย้เมื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3β-HSD) *Bar = 200 μm*



ภาพที่ 27 จุลกายวิภาคของอัณฑะแย้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 แสดงตำแหน่งที่มีการทำงานของเอ็นไซม์ 3β-HSD ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Leydig cell ที่อยู่รอบท่อ seminiferous tubule, *Bar = 50 μm*

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการศึกษาน้ำหนักอวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์ กับน้ำหนักตัว (GSI) ของแย้ พบว่าในเพศผู้ ค่าเฉลี่ย GSI ในเดือนธันวาคม และเดือนพฤศจิกายนมีค่าสูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากค่าเฉลี่ยในช่วงอื่น ของปี (One-way ANOVA, $p<0.05$, Student-Newman-Keuls Method) และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย GSI ในแต่ละเดือน พบว่าในเดือนธันวาคมมีค่าเฉลี่ย GSI สูงสุดสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกของอัณฑะซึ่งมีขนาดใหญ่สุด หลังจากนั้นอัณฑะจะมีค่าเฉลี่ย GSI ลดลงและขนาดเล็กลงในช่วงเวลาต่อมา

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ ในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นช่วงที่มีค่าเฉลี่ย GSI สูงสุด พบว่ามีกระบวนการสร้างอสุจิ หรือ spermatogenesis โดยจะพบ spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ จำนวนมาก และจะพบอสุจิที่เจริญจนสมบูรณ์ภายใน lumen ซึ่งแสดงถึงการมี reproductive activity นอกจากนี้พบว่า seminiferous tubules มีขนาดใหญ่และ lumen มีขนาดแคบเนื่องจากมี spermatogenic cell จำนวนมาก Leydig cells ประกอบด้วย lipid droplet ภายใน cytoplasm ทำให้เซลล์มีลักษณะบวม อ้วนกลม เรียกลักษณะดังกล่าวว่า spongiocyte อีกทั้งยังมีหลอดเลือด capillary แทรกอีกด้วย ลักษณะดังกล่าวแสดงถึง Leydig cells ที่ active ซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างฮอร์โมน ใช้เป็นตัวบ่งชี้ androgenic activity (Wilhoft, 1963b) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทาง histochemistry ที่พบการทำงานของเอนไซม์ 3β-HSD มากในช่วงเวลาดังกล่าว

ในช่วงเวลาต่อมา พบว่าค่าเฉลี่ย GSI ลดลงสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกของอัณฑะซึ่งมีขนาดเล็กลงและเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ พบว่า seminiferous tubules มีขนาดเล็กลงและ lumen ส่วนใหญ่มีขนาดกว้าง ดูหลวม ๆ เนื่องจากภายใน seminiferous tubules จำนวน spermatogenic cell ลดลงโดยพบ spermatogonia เป็นส่วนใหญ่ และอาจพบ spermatocyte บ้าง พบ Leydig cells มีลักษณะเล็กลง นอกจากนี้พบอสุจิภายใน lumen มีจำนวนค่อนข้างน้อยมากซึ่งแสดงถึงช่วง regression โดยในเดือนกุมภาพันธ์จะไม่พบอสุจิเลย ต่อมาในเดือนพฤษภาคม จะเริ่มพบ spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ จำนวนมากขึ้น และพบอสุจิซึ่งอยู่ระหว่าง spermiogenesis ลักษณะดังกล่าวแสดงถึงการเริ่มสร้างเชลล์สืบพันธุ์ และใช้ระยะเวลาจนล่วงเข้าสู่เดือนมิถุนายนและ กันยายน Leydig cells จะ proliferate เต็มไปด้วย lipid droplet ภายใน cytoplasm เซลล์มีลักษณะอ้วนกลม มีนิวเคลียสลักษณะกลม ขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังมีหลอดเลือด capillary แทรก ลักษณะดังกล่าวแสดงถึง Leydig cells ที่ active มาก ต่อมาในเดือนพฤศจิกายน พบว่า spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ และอสุจิภายใน lumen มีจำนวนมากกว่าทุก ๆ เดือนที่ผ่านมาซึ่งแสดงถึงช่วง breeding peak

จากผลการศึกษาน้ำหนักอวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักตัว (GSI) ของเพศเมีย พบว่าค่าเฉลี่ย GSI ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (One-way ANOVA, $p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย GSI ในแต่ละเดือน พบว่าในเดือนธันวาคมมีค่าเฉลี่ย GSI สูงสุดสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่ซึ่งมีขนาดใหญ่สุด

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเชลล์สืบพันธุ์ ในเดือนธันวาคมซึ่งเป็นช่วงที่มีค่าเฉลี่ย GSI สูงสุด พบว่า รังไข่และฟอลลิเคิลเจริญเต็มที่มีขนาดใหญ่ ภายในเต็มไปด้วย yolk ในช่วงเวลาต่อมาหลังจากนั้น พบว่าค่าเฉลี่ย GSI ลดลงอย่างรวดเร็วสอดคล้องกับลักษณะสัณฐานภายนอกของรังไข่ซึ่งมีขนาดเล็กลงมาก ซึ่งแสดงถึงการตกไข่หรือการเกิด ovulation เนื่องจากสามารถตรวจสอบได้โดยศึกษา

เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จะพบ corpus luteum ซึ่งแสดงถึงการมี reproductive activity โดยเริ่มพบ corpus luteum ในเดือน พฤษภาคม นอกจากนี้ยังพบ excentri nucleus ซึ่งแสดงถึง mature oocyte โดยเมื่อไข่เริ่มสุกจะปล่อยนิวเคลียสที่เคลื่อนออกมาบริเวณริม oocyte ออกมานอกรังไข่ ในเดือนกรกฎาคมและกันยายน ยังคงมีค่าเฉลี่ย GSI ต่ำ พบ atretic follicle คือ degenerate granulosa cell เป็นการเสื่อมของ growing follicle ซึ่งฝ่อก่อนเวลาอันควร ทำให้เกิด scar โดยในการศึกษาครั้งนี้พบ granulosa cells 2 รูปแบบคือ small granulosa cells และ pyriform cells ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสัตว์กลุ่มนี้รวมถึงสัตว์จำพวกงูอีกด้วย และยังไม่สามารถระบุหน้าที่ที่แน่ชัดได้ (Lessman, 1998)

เมื่อพิจารณาแผนภูมิสภาพภูมิอากาศ (climate diagram) พบว่า ในพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี มีฤดูแล้ง ในช่วงเดือนพฤศจิกายน ถึงเดือนเมษายน และ ฤดูฝน ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม

ข้อมูลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แย้ *Leiolepis belliana belliana* ในพื้นที่จังหวัดชลบุรีมีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล โดยเพศผู้และเพศเมียมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในช่วงต้นฤดูแล้ง โดยในเพศผู้ ขนาดของอัณฑะจะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล และจะมีขนาดโตที่สุดในฤดูผสมพันธุ์ (โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ สุวคนธ์ พลกนิษฐ์, 2532) นอกจากนี้ยังพบอสุจิ ซึ่งแสดงถึง reproductive activity ส่วนในเพศเมียคาดว่าจะมีการตกไข่ในช่วงเวลาต่อมา สามารถตรวจสอบได้จากการพบ corpus luteum ซึ่งแสดงถึง reproductive activity และจากนั้นทั้งสองเพศจะมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่ำสุดในช่วงฤดูฝน ซึ่งแนวโน้มฤดูกาลสืบพันธุ์ดังกล่าวค่อนข้างตรงกับการศึกษาของ โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ สุวคนธ์ พลกนิษฐ์ ในปี พ.ศ. 2532 ซึ่งทำการศึกษากายวิภาคระบบสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis reevesii rubritaeniata* ซึ่งเป็นแย้ทางภาคอีสาน โดยพิจารณาจากการเจริญของรังไข่จากไข่ระยะต่าง ๆ และดูการเจริญของอัณฑะจากขนาด พบว่าในเดือนมีนาคม แย้เพศผู้มีอัณฑะขนาดค่อนข้างใหญ่กว่าในช่วงอื่น ๆ และพบอสุจิเป็นจำนวนมาก ส่วนในแย้เพศเมีย พบว่ามีไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้วและมีหนังหุ้มไข่พร้อมที่จะถูกวาง มากที่สุดในเดือนมีนาคม และสิงหาคม และในเดือนตุลาคมจะไม่พบแย้เพศผู้ที่มีอัณฑะขนาดใหญ่ และแย้เพศเมียที่มีไข่ที่ได้รับการผสมเชื้อแล้ว จากการศึกษานี้พบว่า แย้ *L. reevesii rubritaeniata* มีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล ในระหว่างช่วงฤดูแล้ง (กุมภาพันธ์–เมษายน) ไปจนถึงช่วงฤดูฝน (กรกฎาคม–สิงหาคม) โดยในเดือนมีนาคมเป็นช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์ ส่วนในเดือนอื่น ๆ เป็นระยะพัก นอกจากนี้มีการศึกษาของ Sherbrooke (1975) ได้แบ่งรูปแบบวงสืบพันธุ์ของ lizard ไว้ 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ

1. continuous reproduction, no variation in reproductive activity
2. continuous with seasonal variation in reproductive activity
3. non-continuous, with distinct periods of reproductive inactivity

โดยทั้งเพศผู้และเพศเมียอาจมีรูปแบบวงสืบพันธุ์ต่างกัน หากมีรูปแบบวงสืบพันธุ์ต่างกัน มักพบว่าเพศผู้จะมีรูปแบบวงสืบพันธุ์แบบ continuous reproductive activity (Vial and Stewart, 1985) ซึ่งสาเหตุที่ต่างกันคาดการณ์ว่าเป็นเพราะ reproductive activity ของเพศเมียมีความเกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม เช่น ปริมาณน้ำฝน ช่วงเวลาที่มีแสงในแต่ละวัน อุณหภูมิ ซึ่งไม่พบในเพศผู้ (Licht and Gorman, 1970) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ซึ่งมีผลต่อวงสืบพันธุ์ของสัตว์เลื้อยคลาน เช่น การจำศีล การแปรผันของช่วงเวลาที่มีแสงในแต่ละวัน หยาดน้ำฟ้า ปฏิสัมพันธ์กับผู้ล่า หรือแหล่งอาหารในธรรมชาติ เป็นต้น (Simmons, 1975) ซึ่งรูปแบบวงสืบพันธุ์ของแย้น่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม non-continuous

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาในเบื้องต้นโดยเน้นการเก็บตัวอย่างในช่วงฤดูสืบพันธุ์ที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ และเน้นการศึกษาด้านจุลกายวิภาค จึงมีตัวอย่างในแต่ละเดือนไม่มากนัก แม้ว่าผลการศึกษาที่ได้จะสามารถแสดงแนวโน้มรูปแบบวงสืบพันธุ์ได้ในเบื้องต้น แต่การสรุปรูปแบบวงสืบพันธุ์ที่ชัดเจนจำเป็นต้องพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาการสืบพันธุ์อื่น ๆ ประกอบ ได้แก่ ด้านกายวิภาค (เช่น การเปลี่ยนแปลงขนาด epididymis/ท่อนำไข่ การเปลี่ยนแปลงจำนวนอสุจิ การเปลี่ยนแปลงขนาดไข่ในท่อนำไข่) ด้านพฤติกรรม (เช่น พฤติกรรมสืบพันธุ์) ด้านสรีรวิทยา (เช่น การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเพศในเลือด) เป็นต้น ซึ่งควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

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

เอกสารอ้างอิง

ผุสตี ปริยานนท์, กรภัทร แก้วเนิน และ รัฐเขตต์ มุสิกภัทร. 2552. *จากยอดเขาถึงใต้ทะเล 3 ทรัพยากรไทย ภูมิปัญญาไทย ผันสู่วิถีใหม่ในฐานไทย สู่เศรษฐกิจพอเพียง*. กรุงเทพมหานคร: เวิร์ค สแควร์.

โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ ไพรัช ทาบสีแพร. 2525. รายงานการวิจัยเรื่องนิเวศน์วิทยาและวงชีพของแย้ *Leiolepis belliana rubritaeniata* (Mertens). *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 14: 22-24.

โรจน์ชัย ศัตรวาหา และ สุวคนธ์ พลกนิษฐ์. 2532. กายวิภาคระบบสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana rubritaeniata* (Mertens).*วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น* 17: 96-102.

วชิรญาณ์ ปวงวัฒนา. 2544. *การศึกษาคาริโอไทป์ Leiolepis belliana belliana ในเกาะแสมสารและเกาะข้างเคียง จังหวัดชลบุรี*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรัญญา อรัญวาลัย. 2546. *ความหลากหลายของชนิดและลักษณะพื้นที่อาศัยของแย้ (Leiolepis spp.) ในประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Callard, G.V. and Callard, I.P. 1998. Spermatogenesis, in non mammals. In Knobil, E. and Neill, J.D. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press.

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.

Hernandez-Gallegos, O., Mendez-de la Cruz, F.R., Villagran-Santa Cruz, M. and Andrews, R.M. 2002. Continuous spermatogenesis in the lizard *Sceloporus bicanthalis* (sauria: Phrynosomatidae) from high elevation habitat of central Mexico. *Herpetologica* 58: 415-421.

Johnson, M.H. and Everitt, B.J. 2000. *Essential Reproduction, 5th edition*. Oxford: Blackwell Science.

Lessman, C.A. 1998. Oogenesis, in non-mammalian vertebrates. In Knobil, E. and Neill, J.D. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press.

Levy, H., Deane, H.W. and Rubin, B.L. 1959. Visualization of steroid-3□-ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 65: 932-943.

Licht, P. and Gorman, G.C. 1970. Reproductive and fat cycles in Caribbean *Anolis* lizards. *University of California Publications in Zoology* 95: 1-52.

Mayhew, W.W. and Wright, S.J. 1970. Seasonal changes in testicular histology of three species of the lizard genus *Uma*. *Journal of Morphology* 130: 163-186.

Pough, H.F., Andrews, R.M., Cadle, J.E., Crump, M.L., Savitsky, A.H. and Wells, K.D. 2003. *Herpetology* (3rd edition). San Francisco: Benjamin Cummings.

Radder, R.S., Shanbhag, B.A. and Saidapur, S.K. 2001. Pattern of plasma sex steroid hormone levels during reproductive cycles of male and female tropical lizard, *Calotes versicolor*. *General and Comparative Endocrinology* 124: 285-292.

Roomratanapun, S., Navephap, S. and Makmee, N. 2000. The histological structure of testicular and male genital ducts in Siamese crocodiles (*Crocodylus siamensis*). *Thai Journal of Veterinary Medicine* 30: 51-63.

Sherbrooke, W.C. 1975. Reproductive cycle of a tropical Teiid lizard, *Neusticurus ecpleopus* Cope in Peru. *Biotropica* 7: 194-207.

Simmons, J.E. 1975. The female reproductive cycle of the Teiid lizard *Ameiva Ameiva* petersii Cope. *Herpetologica* 31: 279-282.

Timmermans, J.P., Scheuermann, D.W., Gabriel, R., Adriaensen, D., Fekete, E., De Groodt-Lasseel, M.H. 1991. The innervations of the gastrointestinal tract of a chelonian reptile, *Pseudemys scripta elegans*. I. Structure and topography of the enteric nerve plexuses using neuron specific enolase immunohistochemistry. *Histochemistry* 95: 397-402.

Vial, J.L. and Stewart, J.R. 1985. The reproductive cycle of *Barisia monticola*: a unique variation among viviparous lizards. *Herpetologica* 41: 51-57.

Wilhoft, D.C. 1963a. Gonadal histology and seasonal changes in the tropical Australian lizard, *Leiolopisma rhomboidalis*. *Journal of Morphology* 113: 185-204.

Wilhoft, D.C. 1963b. Reproduction in the tropical Australian skink, *Leiolopisma rhomboidalis*. *American Midland Naturalist* 70: 442-461.

Zug, G.R., Barber, M.M. and Dudley, J.C. 1982. Gonadal histology and reproduction in *Carlia bicarinata* (Scincidae, Sauria, Reptilia) of the Port Moresby area, Papua New Guinea. *Herpetologica* 38: 418-425.

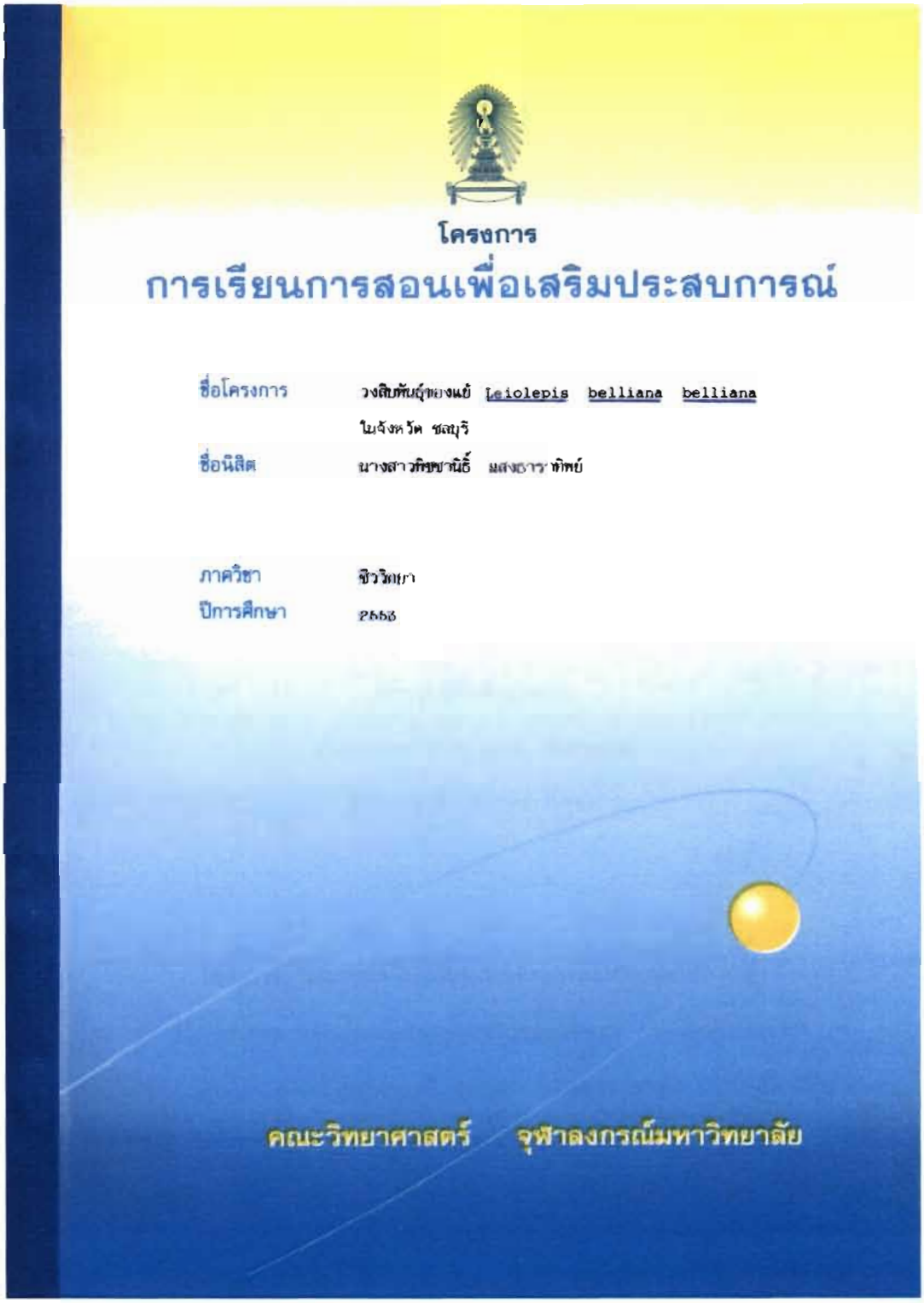
ผลผลิต / ผลลัพธ์ของโครงการ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ (senior project) จำนวน 1 เรื่อง

พิชชานิธิ์ แสงธาราทิพย์. 2553. *วงสืบพันธุ์ของแย้ Leiolepis belliana belliana ในจังหวัดชลบุรี*. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ (senior project) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 35 หน้า.

ภาคผนวก

ผลผลิต / ผลลัพธ์ของโครงการ



วงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* ในจังหวัดชลบุรี

นางสาวพิชชานิธ์ แสงธาราทิพย์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ

โครงการวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

โครงการวิจัย	วงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* ในจังหวัดชลบุรี
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	นางสาวพิชชานิธิ์ แสงธาราทิพย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รศ. ผุสดี ปริยานนท์
	อาจารย์ ดร. จิราภัช กิตนะ
ภาควิชา	ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แย้เป็นสัตว์เลื้อยคลานรูปร่างคล้ายกิ้งก่า ที่มีความสำคัญทั้งด้านการเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของคน โดยเฉพาะทางภาคอีสานของประเทศไทย และด้านการเป็นผู้ควบคุมประชากรของแมลงในระบบนิเวศ แต่ในปัจจุบันประชากรแย้ที่พบในธรรมชาติของประเทศไทยมีจำนวนลดลงไปมาก การเพาะเลี้ยงแย้เพื่อการอนุรักษ์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาขนาดประชากรแย้ไว้ ซึ่งในการดำเนินการดังกล่าวจำเป็นต้องอาศัยข้อมูลด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana belliana* โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สัมพันธ์กับน้ำหนักตัว (gonado-somatic index, GSI) และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละช่วงฤดูกาล โดยเก็บตัวอย่างแย้ จากภาคสนามในจังหวัดชลบุรี ในช่วงฤดูแล้ง (ธันวาคม 2552-เมษายน และพฤศจิกายน 2553) และฤดูฝน (พฤษภาคม-ตุลาคม 2553) ให้ได้ตัวอย่างแย้ฤดูกาลละ 4-10 ตัว/เพศ แล้วผ่าตัดเก็บอัณฑะและรังไข่มาชั่งน้ำหนักเพื่อนำมาคำนวณหา GSI และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับฤดูกาล พบว่าในแย้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีค่า GSI สูงสุด ในเดือนธันวาคม (ต้นฤดูแล้ง) ซึ่งแสดงถึงความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงเวลาดังกล่าว และมีค่า GSI อยู่ในเกณฑ์ต่ำในช่วงเวลาอื่นของปี เมื่อนำตัวอย่างอัณฑะและรังไข่ผ่านขั้นตอน paraffin method และย้อมสี hematoxylin and eosin เพื่อเตรียมเป็นสไลด์การสำหรับศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า ในแย้เพศผู้ ช่วงที่มีค่า GSI สูงสุดจะพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์จนพบเซลล์อสุจิจำนวนมากภายในอัณฑะ ในขณะที่ช่วงที่มีค่า GSI ต่ำจะยังไม่พบเซลล์อสุจิโดยจะเริ่มพบ spermatogenic cell ระยะต่าง ๆ ในอัณฑะซึ่งแสดงถึงการเริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ส่วนแย้เพศเมีย ช่วงที่มีค่า GSI สูงสุดเกิดขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเต็มที่ของฟอลลิเคิล จากนั้นจะพบว่า GSI มีค่าลดต่ำลงอย่างชัดเจน แสดงให้เห็นถึงการตกไข่ โดยสามารถตรวจพบ corpus luteum ภายในรังไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคม ข้อมูลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า แย้ *Leiolepis belliana belliana* ในพื้นที่จังหวัดชลบุรีมีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล โดยเพศผู้และเพศเมียมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในช่วงต้นฤดูแล้ง และคาดว่าจะมีการผสมพันธุ์และตกไข่ในช่วงเวลาต่อมา และจากนั้นจะมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต่ำสุดในช่วงฤดูฝน

คำสำคัญ: แย้, ฤดูกาลสืบพันธุ์, gonado-somatic index, อัณฑะ, รังไข่, จุลกายวิภาค

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์ และ อาจารย์ ดร. จิราวัช กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ถ่ายทอดวิชาความรู้ ให้คำแนะนำ สั่งสอน และให้คำปรึกษา ตลอดจนความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน รวมทั้งถ่ายทอดประสบการณ์ต่าง ๆ เพื่อให้โครงการในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จด้วยดี ขอขอบพระคุณด้วยความเคารพยิ่ง

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กำธร ธีรคุปต์ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ และคณาจารย์ ภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ช่วยให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ พี่รัชต โปษยะวณิช พี่ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ พี่องอาจ ฐิติภูรี พี่รชตะ มณีอินทร์ พี่ณัฐชิต ลิมปัจรรยางค์ พิศราวุธ กิมุทธพงษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในด้านข้อมูลและรูปภาพต่าง ๆ ที่ใช้ประกอบการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อวิทยาและไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับสถานที่ในการปฏิบัติงาน รวมทั้งอุปกรณ์และเครื่องมือ เครื่องใช้ต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ นางสาวปิยรัตน์ เมธาวัฒน์ นายสุวิชา ธงพานิช นางสาวทัศนธร ภูมิยุทธิ์ นางสาวผดุงขวัญ ศรีสุวรรณกาฬ นายกิตติภูมิ จันทร์ศรี นางสาวชนานันท์ ชื่นอุรา และเพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ในการทำงานเสมอมา

ขอขอบคุณ พี่ๆ ที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ที่ให้ความช่วยเหลือเก็บตัวอย่างเม็ดในภาคสนาม

ขอขอบคุณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว สำหรับเยื่อเพื่อสถานที่ในการเก็บตัวอย่างเม็ดในภาคสนาม

ขอขอบคุณกรมอุตุนิยมวิทยา ที่เยื่อเพื่อข้อมูลสภาพอากาศ

ขอขอบคุณศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

ขอขอบพระคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้การสนับสนุนโครงการ

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่คอยดูแลและให้กำลังใจ รวมทั้งสนับสนุนการศึกษาของผู้เขียนมาโดยตลอด จนทำโครงการวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และสุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนในการจัดทำโครงการ

ประวัตินักวิจัย

อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
Dr.Noppadon Kitana
Lecturer, Department of Biology
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Phyathai Road, Bangkok 10330 THAILAND
Phone: 02-218-5370; Fax: 02-218-5386
e-mail: nkitana@hotmail.com

- Place of Birth: Chanthaburi, Thailand (May 22, 1972)

EDUCATION

- B.Sc. (Zoology) 1994, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- M.Sc. (Zoology) 1998, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
- M.A. (Biology) 2002, Boston University, Boston, USA
- Ph.D. (Biology) 2005, Boston University, Boston, USA

RESEARCH AND PROFESSIONAL EXPERIENCE

- 1995-1996: Teaching Assistant, Department of Biology, Chulalongkorn University (General Biology Lab, Histology Lab)
- 1997: Master's thesis directed by Dr.Vithaya Yodyingyuad and Dr.Kumthorn Thirakhupt, entitled "Sexual dimorphism and annual reproductive cycle of the common Asiatic softshell turtle *Amyda cartilaginea*"
- 1998-present: Lecturer, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University
- 1999-2005: Ph.D. candidate (Physiology, Endocrinology and Reproduction), Department of Biology, Boston University, USA, dissertation directed by Professor Ian P Callard, entitled "Potential environmental impacts on endocrine responses and gonadal development in freshwater turtles"
- 2001-2004: Teaching Fellow, Department of Biology, Boston University (Introductory Biology II, Systems Physiology)

RESEARCH INTERESTS

- Reproductive biology
- Comparative endocrinology
- Conservation biology

- Ecotoxicology

PUBLICATIONS

JOURNAL ARTICLES:

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2003. Environmental and hormonal impacts on reproduction and development of the freshwater turtles. *Integrative and Comparative Biology* 43: 1009. [IF 2003=1.083]

Rie, MT, **Kitana, N,** Lendas, KA, Won, SJ and Callard, IP. 2005. Reproductive endocrine disruption in a sentinel species (*Chrysemys picta*) on Cape Cod, Massachusetts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 217-224. [IF 2005=1.408]

Kitana, N, Khonsue, W, Won, SJ and Callard, IP. 2006. Gonadotropin and estrogen responses in freshwater turtle (*Chrysemys picta*) from Cape Cod, Massachusetts. *General and Comparative Endocrinology* 149: 49-57. [IF 2005=2.290]

Kitana, N, Srijunngam, J, Won, SJ and Callard, IP. 2006. Environmental impact on gonadal development in freshwater turtles. *Journal of Experimental Zoology* 305A: 143. [IF 2005=1.111]

Srijunngam, J, **Kitana, N,** Cherdshewasart, W, Callard, IP and Wattanasirmkit, K. 2006. Subchronic effects of *Mucuna macrocarpa* on the tilapia testis. *Journal of Experimental Zoology* 305A: 180. [IF 2005=1.111]

Won, SJ, **Kitana, N** and Callard, IP. 2006. Vitellogenesis in the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Journal of Experimental Zoology* 305A: 193. [IF 2005=1.111]

Keithmaleesatti, S, Thirakhupt, K, Pradatsundarasar, A, Varanusupakul, P, **Kitana, N** and Robson, M. 2006. Organochlorine concentration in egg yolk and reproductive success of *Egretta garzetta* at Wat Tan-En Thailand Wildlife Reserve. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (in press) [IF 2005=2.022]

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2006. Reproductive deficits in male freshwater turtle *Chrysemys picta* from Cape Cod, Massachusetts. *Biology of Reproduction* (in press) [IF 2005=3.583]

BOOK CHAPTERS:

Novillo, A, **Kitana, N,** Marquez, E and Callard, IP. 2006. Reptilian genotoxicity. In Gardner, SC and Oberdörster, E (eds). *New Perspectives: Toxicology and the Environment, Volume: Toxicology of Reptiles*. Taylor & Francis, Boca Raton. pp 241-265.

PROCEEDINGS:

Kitana, N, Yodyingyuad, V and Thirakhupt, K. 1999. Annual reproductive cycle of vulnerable softshell turtle, *Amyda cartilaginea*. In Kwon, HB, Joss, JMP and Ishii, S (eds). *Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology*. Hormone Research Center, Kwangju, Republic of Korea. pp 425-435.

Novillo, A, **Kitana, N**, Won, SJ and Callard, IP. 2006. Comparative environmental endocrinology, genomics and endocrine disruption. In Tangpraprutgul, P, Malaivijitnond, S, Chanchao, C and Kitana, N (eds). *Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania*. Chulalongkorn University Press: Bangkok, Thailand. Pp. 77-82.

ABSTRACTS:

Kitana, N, Yodyingyuad, V and Thirakhupt, K. 1997. Annual sex steroids cycle of vulnerable softshell turtle, *Amyda cartilaginea*. *Abstracts, XIII International Congress of Comparative Endocrinology, Yokohama, Japan*. p 53.

Kitana, N. 1998. Sexual dimorphism and annual reproductive cycle of the common Asiatic softshell turtle *Amyda cartilaginea*. *Abstracts, 2nd Annual Conference of the Biodiversity Research and Training Programme, Khonkaen, Thailand*. p 58.

Kitana, N and Callard, IP. 2001. Effect of cadmium chloride on early stage of the germ cell lineage in *Trachemys scripta* embryos. *Abstracts, Environmental hormone 2001 (e.hormone 2001), Tulane University Health Science Center, New Orleans, USA* (Abstract #50) and *28th New England Endocrinology Conference, University of Connecticut, Storr, USA* (p 17).

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2002. Gonadotropin and estrogen responses in wild caught turtles (*Chrysemys picta*) from Cape Cod, Massachusetts. *Abstracts, Environmental hormone 2002 (e.hormone 2002), Tulane University Health Science Center, New Orleans, USA* (Abstract #27); *29th New England Endocrinology Conference, University of Massachusetts, Amherst, USA* (p 17) and *Superfund Basic Research Program Annual Meeting, University of Arizona, Tucson, USA* (Abstract#42).

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2003. Potential endocrine and reproductive disruption by xenobiotics in freshwater turtles (*Chrysemys picta*) from Cape Cod, Massachusetts. *Abstracts, 30th New England Endocrinology Conference, Dartmouth College, Lebanon, USA* and *Superfund Basic Research Program Annual Meeting, Dartmouth College, Hanover, USA*.

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2004. Environmental and hormonal impacts on reproduction and development in the freshwater turtles. *Abstract, Society for Integrative and Comparative Biology 2004 Annual Meeting, New Orleans, USA* (Abstract #53.6).

Kitana, N, Won, SJ and Callard, IP. 2004. Environmental impact on reproduction and endocrine responses in freshwater turtles (*Chrysemys picta*) from Cape Cod, Massachusetts. *Abstract, 19th Annual EPA Regional Risk Assessors Conference, Boston, USA.*

Kitana, N, Srijunngam, J, Won, SJ and Callard, IP. 2004. Environmental impact on reproduction and development in freshwater turtles. *Abstract, 9th Biological Science Graduate Congress, Bangkok, Thailand* (p 18).

Kitana, N and Callard, IP. 2006. Effect of cadmium on gonadal development in freshwater turtle (*Chrysemys picta*, *Trachemys scripta*) embryos. *Abstracts, SETAC Asia/Pacific 2006, Beijing, China* (Oral E1-5).

Srijunngam, J, **Kitana, N** and Wattanasirmkit, K. 2006. Reproductive effects of pesticide from neem (*Azadirachta indica*) on male tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Abstracts, SETAC Asia/Pacific 2006, Beijing, China* (Poster E4-14).

OTHERS:

Kitana, N. 1993. *Effect of ethanol on fertility of male mice*. Senior project, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. 42 pp. (in Thai)

Kitana, N. 1997. *Sexual dimorphism and annual reproductive cycle of the common Asiatic softshell turtle Amyda cartilaginea*. Master's thesis, Department of Biology, Graduate School, Chulalongkorn University. 105 pp.

Kitana, N. 2005. *Potential environmental impacts on endocrine responses and gonadal development in freshwater turtles.* Doctoral dissertation, Department of Biology, Graduate School of Arts and Sciences, Boston University. 234 pp.

AWARDS OR SCIENTIFIC RECOGNITIONS

- 1987-1991: Scholarship, the Development and Promotion of Science and Technology Talents Project (DPST), Ministry of Science, Technology and Environment, Thailand
- 1996-1997: Scholarship, the University Development Committee, Ministry of University Affairs, Thailand
- 1997: Travel award, the XIII International Congress for Comparative Endocrinology, Yokohama, Japan
- 1998: Travel award, the 3rd International Symposium of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Kwangju, Republic of Korea
- 1998: Best poster presentation, the 3rd International Symposium of Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, Kwangju, Republic of Korea
- 1999-2004: Advanced degree scholarship, Chulalongkorn University, Thailand
- 2002-2003: Travel award, Superfund Basic Research Program (SBRP) Annual Meetings

- 2004: Best oral presentation, the 9th Biological Graduate Congress, Bangkok, Thailand

SOCIETY MEMBERSHIPS

- The Science Society of Thailand under the Patronage of H.M. The King
- Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE)
- Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)

ชื่อ-นามสกุล (ไทย) ผุสตี ปริยานนท์
(อังกฤษ) Pusatee Pariyanonth
ตำแหน่งทางวิชาการ รองศาสตราจารย์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พญาไท
ปทุมวัน กทม 10330
โทรศัพท์ 02-218-5372
โทรสาร 02-218-5386
E-mail: Putsatee.p@chula.ac.th

ประวัติการศึกษา:

ปริญญา	ปีที่จบ	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ประเทศ
B.Sc.	1976	Animal Science	Khon Kean University	Thailand
M.Sc.	1982	Biology	Creighton University	U.S.A.

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

สาขาความหลากลายของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก และสัตว์เลื้อยคลาน, การเพาะเลี้ยงกบ

ผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ

1. Pariyanonth, P., Israngura, K., Jayasavasti, S., Nootprapan, T and Pradatsundarasar, A. 1985. Non Complete Cycle of Frog-farming. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 1(1): 46-55.
2. Pariyanonth, P., Chanpong, N., Watanasermkit, K., Meakwichai, V. and Rasmitta, A. 1985. Complete Cycle of Frog-farming. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 10(1):56-77.
3. Israngura, K., Chanpong, N., Nootprapan, T. and Pariyanonth, P. 1989. General Morphology and Anatomy of Frog (*Rana tigerina*). **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 14(2): 91-98.
4. Rasmittad, A., Watanasermkit , K and Pariyanonth, P. 1989. Comparative Study of ProtoZoan in Frogs (*Rana tigerina*) in Farms and Natural habitats. **J. Sci. Res.Chula. Univ.** 14(2): 99-104.
5. Nootprapan, T. and Pariyanonth, P. 1991. Induction of Ovulation and Spermiation in the bullfrog *(Rana catesbeiana)* outside of the normal breeding season by GnRH analogue. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 16(2): 97-101.
6. Tangpraprutgul, P., Pariyanonth, P. and Chaitiamwong, R. 1996. Seasonal Changes in Plasma Gonadal Steriods in *Rana tigerina rugulosa* and *Rana catesbeiana*. **Thai J.Physiol. Sci.** 9(1): 35-44.
7. Chulaluksananukul, W,. Suwanakerd A. and Pariyanonth, P. 1998. Karyoypic Study of *Kaloula mediolineata* (Amphibia:Microhylidae). **J. Sci. Res. Chula.Unvi.**, 23(2): 129-134.
8. Tangpraprutgul, P and Pariyanonth, P. 1999. The Influence of Transportation on Plasma Gonadal Steroid Concentration in Adult Frogs, *Rana tigerina rugulosa* and

Rana catesbeiana. **Recent Progress in Molecular and Comparative Endocrinology**. Pp477-481.

9. Puangwatana, V., Chulaluksananukul, W., Pariyanonth, P. and Suwattana, D. 2002. Karyological studied of the lizard *Leiolepis belliana belliana* at Samaesarn island and nearby islands in Chonburi Provinces. **J. Sci.Res.Chula. Unvi., (Section T)**. 1(1): 45-67.
10. Chockchaichomnankit, P., Chulaluksananukul, W. and Pariyanonth, P. 2002. Sex Chromosome Identification of the frog *Hoplobatrachus rugulosus* by chromosome Banding Technique. J. **Sci. Res.Chula. Unvi., (Section T)**. 1(1): 154-166.
11. Chairat, A., Tangpraprutgul, P., Pariyanonth, P. and Watanasirmkit, K. 2003. Effect of Methylparathion on the Repreductive System in Male Frogs, *Hoplobatrachus sugulosus*. **J. Sci. Res.Chula. Unvi.** Special Issue (NRC EHWM): 29-38.
12. Aranyavalai, V., Thirakhupt, K., Pariyanonth, P. and Chulalaksananukul, W. 2004. Karyotype and Unisexuality of *Leiolepis boehmei* Darevsky and Kupriyanova, 1993 (Sauria: Agamidae) from southern Thailand. The Natural History Journal of Chulalongkorn University 4(1): pp15-

Proceeding

1. Pariyanonth, P. and Daorerk, V. 1994. Frog farming in Thailand. **The Proceedings of Infofish-Aquatech ' 94, International conference on Aquaculture**. 29-31 August 1994, Colombo, Srilanka
2. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1996. Stock Selection and Growth Rate of *Rana tigerina* and *Rana catesbeiana.* **Proc. of the 3rd Congress of the AOSCE.** 22-26 January 1996, Sydney, Australia.
3. Tangpraprutgul, P., Chaitiamwong, R. and Pariyanonth, P. 1996. Anual Sex Steriod Profiles in Female *Rana tigerina* and *Rana catesbeiana.* **Proc. of the 3rd congress AOSCE.** 22-26 January 1996, Sydney, Australia.
4. Chulalaksananukul, W., Suwanakerd, W. and Pariyanonth, P.1996. Karyotypic study of *Kaloula mediolineata*. **Proceeding of the Third Asia-Pasific Conferences on Agricultural Biotechnology**: 10-15 November, 1996, Prachuapkirikhan, Thailand.
5. Nootprapan, T., Pariyanonth, P., Werawatgoompa, S. and Krogstad, A. 1997. The effect of different GnRH analogues in inducing spawning in *Rana rugulosa*. **The proceeding of 13th International Congress of Comparative Endocrinology**, 17-21 November 1997, Yokohama, Japan.
6. Tangpraprutgul, P., Chanchoa, C and Pariyanonth, P. 2004. Effect of Methylparathion on Liver Vitellogenin gene in female frogs, *Rana rugulosa* . **Fifth Congress of AOSCE for Comparative Endocrinology in Conjunction with the**

Annual Meeting of Japan Society for Comparative Endocrinology. 26-30 March 2004, Nara, Japan

7. Chutmongkonkul, M., Khonsue, W. and Pariyanonth. P. 2006. Blood parasites of six species of wild amphibians from Khun Mae Kuang forest area, Thailand. **Proceeding of *AZWAP* 2006**. 26-29 October, 2006.
8. Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. Hematozoa of amphibians in Thailand. **Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians**.14-18 April 2007, New Orleans, Louisiana.

Congress

1. พจนีย์ เจริญพงษ์สกุล มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ผุสตี ปริยานนท์. 2545. ผลของ Levamisole ต่อพยาธิตัวกลมในเต่าเหลือง *Indotestudo elongata* ณ สวนสัตว์ดุสิต **การประชุมวิชาการครั้งที่ 10 (20-22 มีนาคม 2545) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**: หน้า 148.
2. วิถี เหมือนวอน, ลลิตา เรียบร้อยเจริญ, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ผุสตี ปริยานนท์. 2546. หนอนพยาธิที่พบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อันดับแอนูรา ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี **การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 11 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**: หน้า 8.
3. มาลินี ฉัตรมงคลกุล, ผุสตี ปริยานนท์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2548. ปรสิตของกิ้งก่าบิน (*Draco* spp.) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี. **การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา**: หน้า 124-125.
4. ปรวีร์ พรหมโชติ, วิเชฏฐ์ คนซื่อ, และผุสตี ปริยานนท์. 2549. วงศ์วานวิวัฒนาการของกะท่างน้ำในประเทศไทยโดยใช้ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ. **การประชุมวิชาการประจำปีโครงการ BRT** ครั้งที่ 10: หน้า 88.
5. อนุสรณ์ ปานสุข ศานิต ปิยพัฒนากร และ ผุสตี ปริยานนท์. 2550. ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแย้สกุล *Leiolepis* ที่พบในประเทศไทย จากลำดับเบสของยีน12S rRNA ในไมโตคอนเดรีย . **การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 15 "พันธุศาสตร์กับการพัฒนาประเทศตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง"**: หน้า 213.
6. ศานิต ปิยพัฒนากร อนุสรณ์ ปานสุข สุริยา แสงพงค์ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรแย้ *Leiolepis belliana belliana* บริเวณชายฝั่งตะวันออกและแย้บนเกาะในทะเลอ่าวไทย. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 38-42.
7. พัชร ดนัยสวัสดิ์ อนุสรณ์ ปานสุข วิเชฏฐ์ คนซื่อ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายของชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์เลื้อยคลานของเกาะกูด. **การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 207-212.
8. วิเชฏฐ์ คนซื่อ อนุสรณ์ ปานสุข พัชร ดนัยสวัสดิ์ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2550. ความหลากหลายของชนิดและสถานภาพด้านการอนุรักษ์สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกของเกาะกูด. **การประชุมวิชาการ**

ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี: หน้า 213-217.

9. มาลินี ฉัตรมงคลกุล วิเชฎฐ์ คนซื่อ พงชัย หาญยุทธนากร และ ผุสตี ปริยานนท์. 2550. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. **การประชุมวิชาการ ทรัพยากรไทย: ประโยชน์แท้แก่มหาชน การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 จ. ชลบุรี**: หน้า 300-309.
10. Patinawin, S. and Pariyanonth, P. 1988. The karyotpic study of *Rana tigerina*. **14th Congress on Science and Technology of Thailand**. 19-21 October 1988.
11. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1990. Preliminary Study of the Hormones Induced Spawning in Tiger-frog (*Rana tigerina)* and Metamorphosis of the tadpoles. **28th Congress on Agricultural Science and Technology of Thailand**. 29-31 January 1990.
12. Pariyanonth, P., Nootprapan, T. and Chanpong, N. 1991. Use of GnRh analogue in induced Reproduction of Frog (*Rana tigerina*). **17th Congress on Science and Technology of Thailand**. 24-27 October 1991.
13. Nootprapan, T. Pariyanonth, P. and Chanpong, N. 1991. Induction of Ovulation and Spermiation in Common low land Frog (*Rana rugulosa*) by gonadotropin releasing hormone (GnRH analogue). **17th Congress on Science and Technology of Thailand**. 24-27 October 1991.
14. Chulalaksananukul, W., Pariyanonth, P. and Chockchaichomnankit, P. 1997. Sex chromosome study of *Rana catesbeiana*. **Chulalongkorn University 80th Aniversary Research Conference**. 15-17 October 1997, Bangkok, Thailand.
15. Chairat, A., Tangpraprutgul, P., Pariyanonth, P.2002. Effect of Methylparathion on Plasmatestosterone levels in Male Frogs, *Ranarugulosa*. **Fourth Intercongress Symposium of AOSCE**. Guanzhou, China.
16. Chutmongkonkul, M and Pariyanonth, P. 2005. Endoparasites of five species of anurans in Thailand. **5th World Congress of Herpetology**. 19-24 June 2005, Stellenbosch, South Africa: 125.
17. Chutmongkonkul, M., Pariyanonth, P., Tangtrongpiros, J. and Sailasuta, A. 2005. *Lankesterella* in *Hoplobatrachus rugulosus* in Thailand. **31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005.** Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
18. Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2005. Helminths and Blood Parasites of Butterfly Lizards, *Leiolepis* spp., in Thailand. **31st Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2005.** Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.
19. Pariyanonth, P., Singh-asa, P. and Pansook, A.2005. Investigation for genetic markers in Rugose Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* by isozyme data. **31st**

Congress on science and technology of Thailand.18-20 October 2005. Technopolis, Suranaree University of technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

20. Pansook, A., Pariyanonth P. and Chulalanksananukul, W. 2005. Relationship between isozyme heterozygosity and morphological characters of white lined frog *Fejervarya limnocharis*. **14th Genetic Congress.** 11-13 March 2005, Bangkok, Thailand.
21. Pariyanonth, P., Chutmongkonkul M. and Pansook, A. 2005. The remonitoring amphibian species in Plant Genetics Conservation Project under the Royal Initiative of her Royal Highness Princess Mahachakri Sirindhon, Tablan National Park, Kornburi District, Nakhon Ratchasima Province. **The Royal Initiative of her Royal Highness Princess Mahachakri Sirindhon Congress,** 17-22 October 2005., Nakhon Ratchasima, Thailand.
22. Sungsirin, N., Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. Lankesterella in Rice-field frog, *Hoprobatrachus rugulosus* and its infection in Glossiphoniid leech. **32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32).** 10-16 October 2006, Bangkok, Thailand.
23. Sungsirin, N., Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. Breeding of Glossiphonid Leech, *Placobdelloides siamensis* (oka, 1997) in Laboratory. **The 11th Biological Science Graduate Congress.** 15-17 December 2006, Bangkok, Thailand.