โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ ภาวะเพศกำกวมในกบหนอง *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) เพศผู้ ในป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

Intersex condition in the male rice frog *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) living in CU Forest and Research Station, Saraburi province

ชื่อนิสิต นางสาวศดานันท์ สุ่มมาตย์ **เลขประจำตัว** 5832063023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2561

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของโครงงานทางวิชาการที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของโครงงานทางวิชาการที่ส่งผ่านทางคณะที่สังกัด
The abstract and full text of senior projects in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the senior project authors' files submitted through the faculty.

ชื่อโครงงานวิจัย : ภาวะเพศกำกวมในกบหนอง *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) เพศผู้ ในป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นางสาวศดานันท์ สุ่มมาตย์

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

อาจารย์ ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ

ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

กบมีลักษณะเหมาะสมต่อการเป็นสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังภัยในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากลักษณะของผิวหนังทำให้สารแปลกปลอมผ่านเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและมีผลต่อการเจริญของกบ จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่ากบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศผู้ตัวเต็มวัยในพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดน่าน ซึ่งมีการใช้สารฆ่าวัชพืชในระดับที่แตกต่างกัน แสดงภาวะเพศกำกวมหรือมี testicular ovarian follicle (TOFs) ในอัณฑะ แต่ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าเป็นผลมาจากการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชในพื้นที่เกษตรหรือเป็นกระบวนการเจริญตามปกติของอัณฑะกบหนอง ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของอัณฑะของกบหนองเพศผู้ในพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืช โดยเก็บตัวอย่างกบหนองที่พบจากวิธี visual encounter surveys ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ในปี พ.ศ.2561 หลังจากการุณยฆาตนำมาวัดความยาวและชั่งน้ำหนักตัวกบและอัณฑะ รักษาสภาพอัณฑะ นำเนื้อเยื่อมาทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method และย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin แล้วนำมาตรวจสอบ TOFs ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการศึกษาพบว่าค่าสุขภาวะและ gonadosomatic index ของกบในพื้นที่นี้มีค่าใกล้เคียงกับกบที่พบในพื้นที่อ้างอิงในจังหวัดน่าน และมีอัตราการพบ TOFs ในระยะตัวเต็มวัย ระยะก่อนเต็มวัย และ ระยะวัยอ่อน คือ 46/50 (ร้อยละ 92) 7/7 (ร้อยละ 100) และ 6/6 (ร้อยละ 100) ตามลำดับ การปรากฏของภาวะเพศกำกวมในกบหนองที่อาศัยในพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการใช้สารฆ่าวัชพืช สามารถนำไปใช้ประกอบการพิจารณาความเหมาะสมของการใช้ภาวะเพศกำกวมเป็นตัวบ่งชี้เชิงผลกระทบ และเชิงความไวต่อการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในกบหนอง

คำสำคัญ: จุลกายวิภาค, สัตว์เฝ้าระวัง, สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก, สารฆ่าวัชพืช, testicular ovarian follicle

Research title : Intersex condition in the male rice frog *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) living in CU Forest and Research Station, Saraburi province

Student name : Miss Sadanan Summat

Advisor : Assistant Professor Dr.Noppadon Kitana

Co-advisor : Dr.Jirarach Kitana

Dr.Panupong Thammachoti

Department : Biology

Abstract

Frogs have been used as sentinels for environmental health hazards since their skin is relatively permeable to xenobiotics and their development can be affected by an environmental contamination. Prior study in Nan province revealed that the rice frog, *Fejervarya limnocharis*, living in agricultural areas with different degree of herbicide utilization showed testicular ovarian follicles (TOFs) in adult male testis. It is unclear whether the presence of TOFs is linked to a background contamination of herbicide in the agricultural areas or a normal developmental process of the testis in this species. This study thus aims to examine histological structure of testis in the male rice frog living in areas with no background contamination of herbicide. In 2018, male frogs were field collected after visual encounter surveys from the Chulalongkorn University Forest and Research Station, Saraburi province. After euthanasia, frogs were measured for snout-to-vent length (SVL) and body weight. Testes were weighed, fixed, preserved and processed through paraffin method and subjected to hematoxylin and eosin staining. Histology of testis was examined under a light microscope and an incidence of TOFs was recorded. Results showed that condition factor (an indicative of overall health) and gonadosomatic index of frogs in this area are comparable to those of the rice frogs in reference areas in Nan province. Incidences of TOFs in adult, subadult and juvenile frogs are 46/50 (92%), 7/7 (100%) and 6/6 (100%), respectively. Presence of TOFs in the male rice frog living in area with no history of herbicide utilization could be further used to evaluate the proper use of the TOFs as a biomarker of effect and susceptibility for herbicide contamination in this frog species.

Keywords: amphibian, sentinel species, testicular ovarian follicle, herbicide, histology.

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาอย่างสูงจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ และ อาจารย์ ดร.ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาและให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ทั้งในด้านการนำเสนอผลงาน ตลอดจนตรวจรายงานวิจัยและปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องด้วยความเอาใจใส่อย่างดี ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ และทุนสนับสนุนกลุ่มวิจัยสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนทำให้การทำงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ นางสาวธฤษวรรธ ไตรจิตต์, นางสาวยุพาพร วิสูตร, นางสาวกัลยกร นามจันทรา, นายหฤษฎ์ จักราธิวัตริ, นายธงชัย ธิติภูรีและนายสุปัญญา อันเนตร์ รวมทั้งสมาชิก BioSentinel Laboratory ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำทั้งในด้านการออกภาคสนามและการทำงานในห้องปฏิบัติการตลอดจนให้กำลังใจในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ และบุคคลากรศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาคทุกท่านที่อำนวยความสะดวกด้านที่พัก และให้ความช่วยเหลือด้านการเก็บตัวอย่างภาคสนาม จังหวัดสระบุรี

ขอขอบคุณ นางสาวสาวิตรี เสือยอด, นางสาวสุจิตรา เพชรชนะ นายปัถย์ ปราณปรากุลณ์และนายชิฏิภัสร์ ณ ระนอง รวมถึงเพื่อน ๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้

และสุดท้ายขอขอบพระคุณสำหรับกำลังใจจากครอบครัวที่คอยห่วงใย สนับสนุนการศึกษาและเป็นแรงใจสำคัญที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	
2.1 สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง (sentinel species)	3
2.2 กบหนอง *Fejervarya limnocharis*	3
2.3 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก	6
2.4 Endocrine disrupting chemicals	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการ	
3.1 สัตว์ทดลอง	9
3.2 พื้นที่ศึกษา	9
3.3 การเก็บตัวอย่าง	10
3.4 การทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method	11
3.5 การตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและภาวะเพศกำกวม	14

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	**หน้า**
3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ	14
บทที่ 4 ผลและอภิปรายผลการทดลอง	
4.1 สุขภาวะของกบหนองเพศผู้	15
4.2 ค่ามอโฟเมตริกและกราวิเมตริกของกบหนองเพศผู้	15
4.3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และภาวะเพศกำกวมของกบหนองเพศผู้	17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก	25

สารบัญภาพ

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานของกบหนอง *F. limnocharis*	4
ภาพที่ 2.2 การจำแนกเพศกบหนองจากลักษณะแถบใต้คาง	5
ภาพที่ 2.3 การจำแนกกบหนองเพศผู้ระยะต่าง ๆ โดยพิจารณาจากแถบสีใต้คาง	5
ภาพที่ 2.4 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในภาวะปกติ	7
ภาพที่ 3.1 พื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	9
ภาพที่ 3.2 เก็บตัวอย่างกบหนองเพศผู้จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	10
ภาพที่ 3.3 พื้นที่เก็บตัวอย่างกบหนองในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	10
ภาพที่ 3.4 แผนภาพสรุปขั้นตอน paraffin method ที่ใช้ในการศึกษาจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง	11
ภาพที่ 3.5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจสอบจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง เพื่อตรวจสอบการปรากฏของ TOFs	12
ภาพที่ 3.6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการย้อมสี hematoxylin และ eosin เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง	13
ภาพที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยของ condition factor ของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	15
ภาพที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยของความยาวจากปลายจมูกถึงรูทวารของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	16
ภาพที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยของ Gonadosomatic index ของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี	17

สารบัญภาพ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ในภาวะการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ	18
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ที่ปรากฏ TOFs	18
ภาพที่ 4.6 ลักษณะ atretic follicle ของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้	20

สารบัญตาราง

เรื่อง **หน้า**

ตารางที่ 4.1 ข้อมูลการพบภาวะเพศกำกวมในเนื้อเยื่ออัณฑะของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 19

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีประชากรลดลงอย่างมาก โดยสาเหตุมาจากหลายปัจจัย หนึ่งในนั้นคือการใช้สารเคมีทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฆ่าวัชพืช (Beebee and Griffiths, 2005) เมื่อสารเหล่านี้ปนเปื้อนเข้าสู่สิ่งแวดล้อม อาจเกิดผลกระทบเชิงลบต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Hughes, 1996) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารฆ่าวัชพืชแอทราซีนในระดับความเข้มข้นที่พบได้ในสิ่งแวดล้อม มีรายงานสามารถส่งผลให้กบ *Xenopus laevis* ปรากฏ multiple gonad คือพบ gross morphology และ histology ทั้งของอัณฑะและรังไข่ในกบเพียงตัวเดียว อีกทั้งในระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ppb ทำให้กล่องเสียงของกบเพศผู้มีขนาดเล็กลง (Hayes *et al*., 2002)

ในประเทศไทยมีการใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดน่านจากการศึกษาของ Thammachoti ในปีค.ศ. 2012 เมื่อเปรียบเทียบ พื้นที่เกษตรในจังหวัดน่าน 2 พื้นที่ ได้แก่พื้นที่ที่ไม่มีใช้สารฆ่าวัชพืช (พื้นที่อ้างอิง) และพื้นที่ที่มีใช้สารฆ่าวัชพืช (พื้นที่ปนเปื้อน) พบว่ามีการตกค้างของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดได้แก่ แอทราซีน, ไกลโฟเสต และพาราควอตในกบจากทั้งสองพื้นที่ โดยที่พบพาราควอตในเนื้อเยื่อกบจากพื้นที่ปนเปื้อนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ morphometric และ gravimetric ของตับ ไต อวัยวะสืบพันธุ์ และตัวกบ จากพื้นที่ปนเปื้อน พบว่ามีค่าปัจจัยสุขภาวะต่ำกว่ากบหนองในพื้นที่อ้างอิงแสดงถึงอิทธิพลของสารฆ่าวัชพืชต่อสุขภาวะโดยรวมของกบ ดัชนีน้ำหนักตับและรังไข่จากพื้นที่ปนเปื้อนมีค่าสูงกว่าพื้นที่อ้างอิงแสดงถึงการรับสารแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายและการกระตุ้นให้เกิดการสร้างไข่เพิ่มขึ้นตามลำดับ และการศึกษาของ Jantawongsri ในปีค.ศ. 2014 เมื่อทำการตรวจสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่ากบหนองจาก 2 พื้นที่มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ยังพบว่าโครงสร้างจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนองในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดน่าน แสดงภาวะเพศกำกวม มีลักษณะทางจุลกายวิภาคที่ตรวจสอบได้คือพบการเจริญของ follicle ที่เป็นลักษณะสำคัญของรังไข่ในเนื้อเยื่ออัณฑะ โดยเรียกภาวะดังกล่าวว่าเป็นการเกิด testicular ovarian follicle (TOFs) (Coady *et al*., 2005) ในอัตราร้อยละ 45-47 ทั้งในพื้นที่ปนเปื้อน และพื้นที่ที่อ้างอิง (ฤดีมาศ บุตรศิริ, 2559) ซึ่งมีอัตราร้อยละที่ใกล้เคียงกัน

การปรากฏของ TOFs อาจเป็นเพราะการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช หรืออาจเป็นรูปแบบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่พบได้ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นปกติอยู่แล้ว ที่ผ่านมามีการรายงานเกี่ยวกับรูปแบบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใน *Rana curtipes* ที่พบ TOFs ในช่วงเปลี่ยนผ่านเพศจากเพศเมียเป็นเพศผู้เรียกรูปแบบการเจริญแบบนี้ว่า

“semidifferentiated type” (Gramapurohit *et al*., 2000) แสดงว่า TOFs อาจสามารถพบได้ในการเจริญปกติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในกบที่อาศัยในพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการใช้สารฆ่าวัชพืชมาก่อน ได้แก่พื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เพื่อตรวจสอบการเกิดภาวะเพศกำกวมในกบหนองเพศผู้ในสภาวะที่ไม่มีการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืช

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคและการเกิดภาวะเพศกำกวมในอัณฑะของกบหนอง *Fejervarya limnocharis* เพศผู้ ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

1. สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง (sentinel species)

สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง เป็นหนึ่งในแนวทางการติดตามตรวจสอบอนามัยสิ่งแวดล้อม เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีและการตอบสนองทางชีวภาพของสัตว์ที่อาศัยในพื้นที่ (National Research Council, 1991) โดยสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังต้องอาศัยในพื้นที่ที่ทำการศึกษา ไม่ควรอาศัยห่างออกไปหลายตารางกิโลเมตร และไม่ควรเป็นสัตว์ที่เข้ามาในพื้นที่เพียงชั่วคราว (NRC, 1991)

2. สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังต้องมีขนาดและความหนาแน่นของประชาการที่มากเพียงพอ หากใช้สิ่งมีชีวิตที่หาได้ยากอาจมีจำนวนไม่เพียงพอสำหรับการประเมินผลการทบต่อสัตว์ (NRC, 1991)

3. สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังต้องสามารถจับและนับจำนวนได้ง่าย และลักษณะของประชากรง่ายต่อการประเมินผลระทบในระยะเวลาอันสั้น (NRC, 1991)

4. สิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังต้องสามารถตอบสนองต่อสารเคมีต่าง ๆ ตามที่ผู้วิจัยต้องการตรวจสอบทั้งในด้านของการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา (NRC, 1991)

2. กบหนอง *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829)

การจำแนกกบหนองทางอนุกรมวิธาน สามารถจำแนกได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Amphibia

Order Anura

Family Dicroglossidae

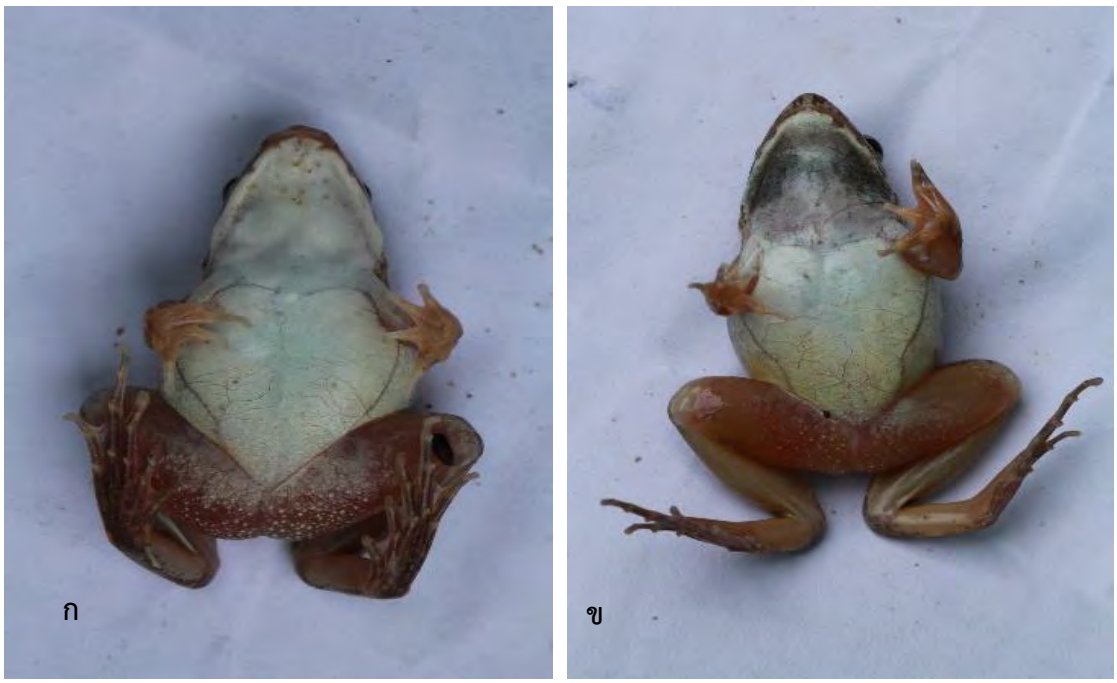
Genus *Fejervarya*

Species *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829)

กบหนอง มีขนาดลำตัวเล็กถึงปานกลาง (ความยาวจากรูจมูกถึงรูทวารประมาณ 35 – 60 มิลลิเมตร) ลำตัวเรียวและส่วนปลายหัวเรียว ผิวหนังลำตัวมีตุ่มเรียงตามความยาวลำตัวหลายแถว ด้านหลังมีสีเทาหรือสีน้ำตาลเหลือง ขอบปากบนและขอบปากล่างมีแถบสีเข้มพาดขวาง

ภาพที่ 2.1 ลักษณะสัณฐานของกบหนอง *Fejervarya limnocharis*

วิธีการจำแนกเพศกบหนอง สามารถดูได้จาก secondary sex characteristics คือแถบใต้คางสีดำ หากเป็นกบหนองเพศผู้จะมีคางสีดำซึ่งเป็นตำแหน่งของถุงเสียง (vocal sac) แต่กบหนองเพศเมียจะมีคางสีขาว (ภาพที่ 2.1) (Noble, 1931)



ภาพที่ 2.2 การจำแนกเพศกบหนองจากลักษณะแถบใต้คาง
(ก – กบหนองเพศเมีย, ข – กบหนองเพศผู้)

การจำแนกระยะกบหนองเพศผู้ ใช้การดูแถบสีดำใต้คาง ซึ่งกบหนองเพศผู้ระยะ adult จะเห็นการปรากฏของแถบดำเป็นสีดำรูปตัว M ชัดเจนดังภาพที่ 2.2 ก ซึ่งแสดงถึงการมีถุงเสียง (vocal sac) ที่เจริญเต็มที่ กบหนองเพศผู้ระยะ subadult จะเห็นการปรากฏของแถบดำที่ยังไม่เป็นรูปตัว M ชัดเจนดังภาพที่ 2.2 ข โดยแถบดำจะมาจากด้านข้างปากแล้วจึงมาชนกันตรงกลาง และกบหนองระยะ juvenile (ภาพที่ 2.3 ค) จะไม่สามารถใช้ secondary characteristics ในการจำแนกเพศได้ แต่อย่างไรก็ตามการยืนยันเพศจำเป็นต้องใช้การดู primary characteristics คือการผ่าเพื่อดูอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ภาพที่ 2.3 การจำแนกกบหนองเพศผู้ระยะต่าง ๆ โดยพิจารณาจากแถบสีใต้คาง
(ก – adult, ข – subadult และ ค – juvenile)

3. การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีขั้นตอนดังนี้

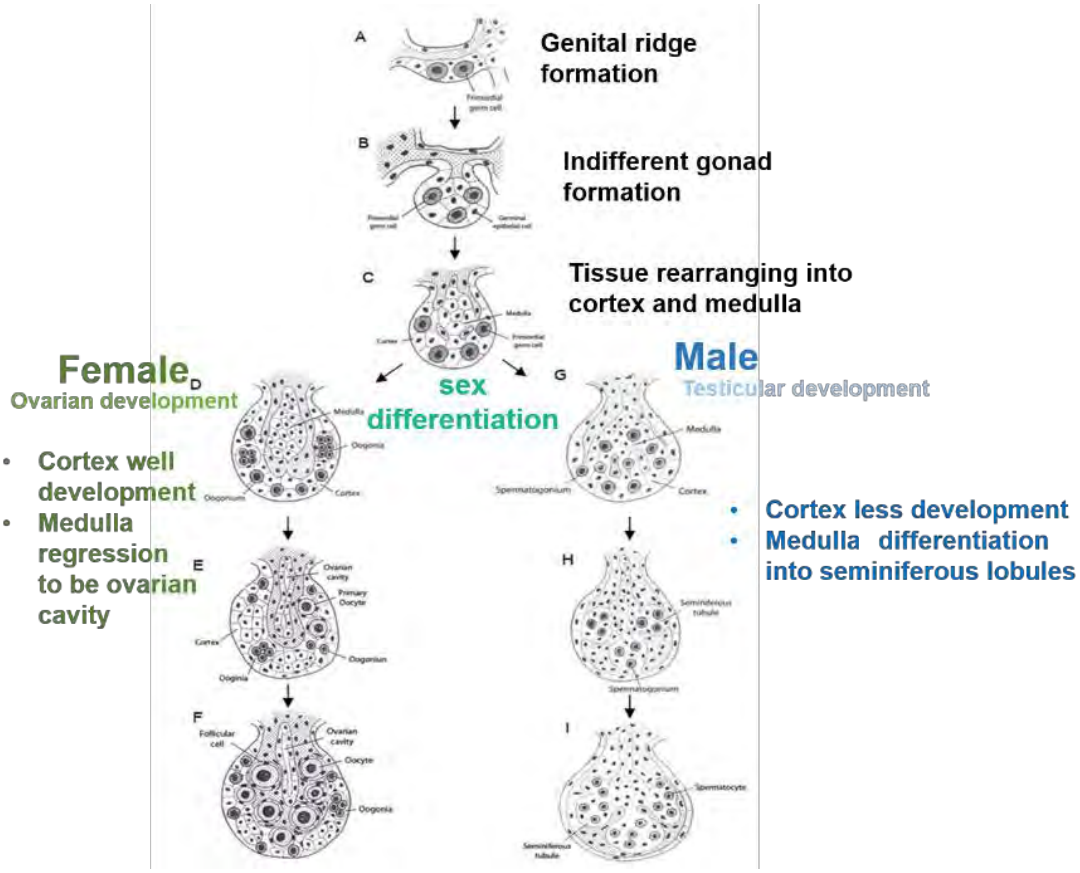
1. ในระยะเริ่มต้นจะมีการเจริญของเนื้อเยื่อที่เรียกว่า genital ridge ตรงกลางระหว่างไตทั้งสองข้าง (gut mesentery) primordial germ cell เคลื่อนย้ายมาอยู่ที่ genital ridge

2. primordial germ cell ที่อยู่ภายใน genital ridge มีการแบ่งเซลล์เพื่อขยายขนาดขึ้น กลายเป็น indifferent gonad

3. หลังจากนั้นจะมีการสร้างเนื้อเยื่อเป็น 2 ชั้นคือ cortex เนื้อเยื่อชั้นนอก และ medulla เนื้อเยื่อชั้นใน ต่อมาจึงเข้าสู่ระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ (sex differentiation)

4. gonad ที่จะเจริญไปเป็นเพศเมียจะมีการเจริญในชั้น cortex เป็นอย่างดีโดยพบกลุ่มของ germ cell ระยะต่าง ๆ เจริญอยู่ชั้นนี้ ส่วนชั้น medulla จะมีการเจริญน้อยลงและฝ่อสลายไป ในที่สุดเกิดเป็นช่อง ovarian cavity

5. gonad ที่จะเจริญไปเป็นเพศผู้จะมีการเจริญในชั้น cortex น้อยลงในขณะที่ชั้น medulla มีขยายขนาดและเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นโดยจะเห็นกลุ่มของ germ cell ในระยะต่าง ๆ ซึ่งจะพัฒนาไปเป็น seminiferous lobule



ภาพที่ 2.4 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในภาวะปกติ (ดัดแปลงจาก Viertel and Richter, 1984)

รูปแบบของการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศในกบมี 3 รูปแบบ ได้แก่

1. Differentiated type (Witschi, 1929)

เริ่มจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ยังไม่แยกเพศหรือ indifferent gonad แล้วเปลี่ยนแปลงโดยตรงไปเป็นอัณฑะและรังไข่อย่างใดอย่างหนึ่ง

2. Undifferentiated type (Phuge และ Gramapurohit, 2013)

เริ่มจาก indifferent gonad เปลี่ยนเป็นรังไข่ทั้งหมดก่อน หากตัวใดถูกกำหนดเป็นเพศผู้จะเกิดการสลาย (degenerate) ของรังไข่ไปเป็นเนื้อเยื่ออัณฑะ

3. Semi-differentiated type (Gramapurohit *et al*., 2000)

เริ่มจาก indifferent gonad เปลี่ยนเป็น intersex gonad ซึ่งจะพบ TOFs ปรากฏอยู่ หลังจากนั้นจะเปลี่ยนไปเป็นอัณฑะหรือรังไข่

4. Endocrine disrupting chemicals

สารแปลกปลอม (xenobiotics) ในสิ่งแวดล้อมเป็นสาเหตุหนึ่งที่ส่งผลกระทบเชิงลบต่อสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (AmphibiaWeb, 2017) เช่น สารฆ่าวัชพืช (แอทราซีน, ไกลโฟเสต และพาราควอต), สารฆ่าแมลง รวมถึงโลหะหนักบางชนิดอย่าง แคดเมียม (cadmium), ตะกั่ว (lead), สังกะสี (zinc) และสารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น (Lefcort *et al*., 1998)

สารฆ่าวัชพืชชนิดแอทราซีน, ไกลโฟเสต และพาราควอต เป็นสารฆ่าวัชพืชที่สังเคราะห์ขึ้น นิยมใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลกเพื่อกำจัดวัชพืชใบกว้างในไร่ผลไม้หลายชนิดอาทิ อ้อย, ข้าวโพด และสัปปะรด เป็นต้น เมื่อใช้สารฆ่าวัชพืชชนิดนี้จะตกค้างในสิ่งแวดล้อมอย่างบริเวณหน้าดิน เมื่อฝนตกจะสามารถชะล้างสารฆ่าวัชพืชสู่พื้นที่รอบ ๆ รวมไปถึงแอ่งน้ำ, ลำธาร และอ่างเก็บน้ำเป็นต้น แต่ก็ยังคงมีบางส่วนที่ตกค้างบริเวณหน้าดินไปจนถึงชั้นดิน ซึ่งมันสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลาที่ยาวนานและส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในพื้นที่ได้ (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2003)

จากการรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชสามารถออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ เช่น ปรับอัตราการทำงานของเอนไซม์ aromatase ที่เปลี่ยนฮอร์โมนเพศชาย (testosterone) เป็นฮอร์โมนเพศหญิง (estrogen) ทำให้สัตว์ที่ได้รับเกิดภาวะเพศกำกวม (intersex) หรือปรากฏการเกิด testicular ovarian follicle และยังสามารถก่อให้เกิดภาวะ hermaphrodism (multiple sex organs with a mixture of testes and ovaries) และกบเพศผู้มีอัณฑะได้หลายพู (multiple testes) (Yu *et al*., 1993; Hayes *et al*., 2006) มีรายงานพบภาวะนี้ในกบในพื้นที่เกษตรกรรมที่ปนเปื้อนโลหะหนักชนิดแคดเมียม ที่จังหวัดตาก ประเทศไทย เป็นสาเหตุมาจากเหมืองพบการปรากฏของภาวะเพศกำกวมเช่นเดียวกัน (Othman, 2009) และการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรกรรมทำให้คางคกเพศผู้ตัวเต็มวัยเกิดการลดรูปของอัณฑะ อีกทั้งพบการสะสมของ vitellogenin(s) ใน Bidder’s organ (McCoy et al., 2008)

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. สัตว์ทดลอง

ขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะวิทยาศาสตร์ ครั้งที่ 4/2561 โดยมีเลขรหัส Protocol Review Number 1923001

2. พื้นที่ศึกษา

พื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ตั้งอยู่ในอำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี (ภาพที่ 3.1) มีพื้นที่รวมทั้งสิ้น 3,362 ไร่ พื้นที่แบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 พื้นที่ป่าเสื่อมโทรมที่กรมป่าไม้อนุญาตให้ใช้ประโยชน์จำนวน 2,630 ไร่ และ ส่วนที่ 2 พื้นที่มูลนิธินิสิตเก่าจุฬาลงกรณ์มอบให้ใช้ประโยชน์ จำนวน 732 ไร่ ภายในพื้นที่มีอ่างเก็บน้ำ 1 แห่ง และมีสระเก็บน้ำ 2 สระ (สำนักงาน กปร., n.d.) ซึ่งพื้นที่จุฬาลงกรณ์มหาวิยาลัย จังหวัดสระบุรีเป็นพื้นที่ที่ไม่มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรมาเป็นระยะเวลายาวนานกว่า 10 ปี

ภาพที่ 3.1 พื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี (https://www.google.co.th/maps/place/ศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาค+จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย+จ.สระบุรี/)

3. การเก็บตัวอย่าง

เก็บกบหนองเพศผู้ระยะ adult, subadult และ juvenile จากบริเวณพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เก็บตัวอย่างด้วยมือหลังจากสำรวจแบบ visual encounter survey ในเวลากลางคืน ระหว่างเดือนตุลาคม - เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561 (ภาพที่ 3.2) โดยเก็บกบหนองใส่ในกล่องพลาสติก ซึ่งภายในกล่องบรรจุน้ำและใบไม้แห้งเพื่อไม่ให้กบเกิดความเครียด หลังจากนั้นขนกลับมายังห้องปฏิบัติการ แล้วการุณยฆาตโดยการใส่กบหนองใน 0.5% tricaine methane sulfonate (MS 222) (Torreilles *et al*., 2009) วัดความยาวลำตัวตั้งแต่จมูกถึงรูทวารร่วม (SVL; snout vent length) รวมทั้งชั่งน้ำหนัก หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเพื่อตรวจสอบเพศ ชั่งน้ำหนักและเก็บตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ อัณฑะและตับ นำไปรักษาสภาพ (fixation) ในสารละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาใน 70% ethanol เพื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีการ paraffin method เพื่อตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาค

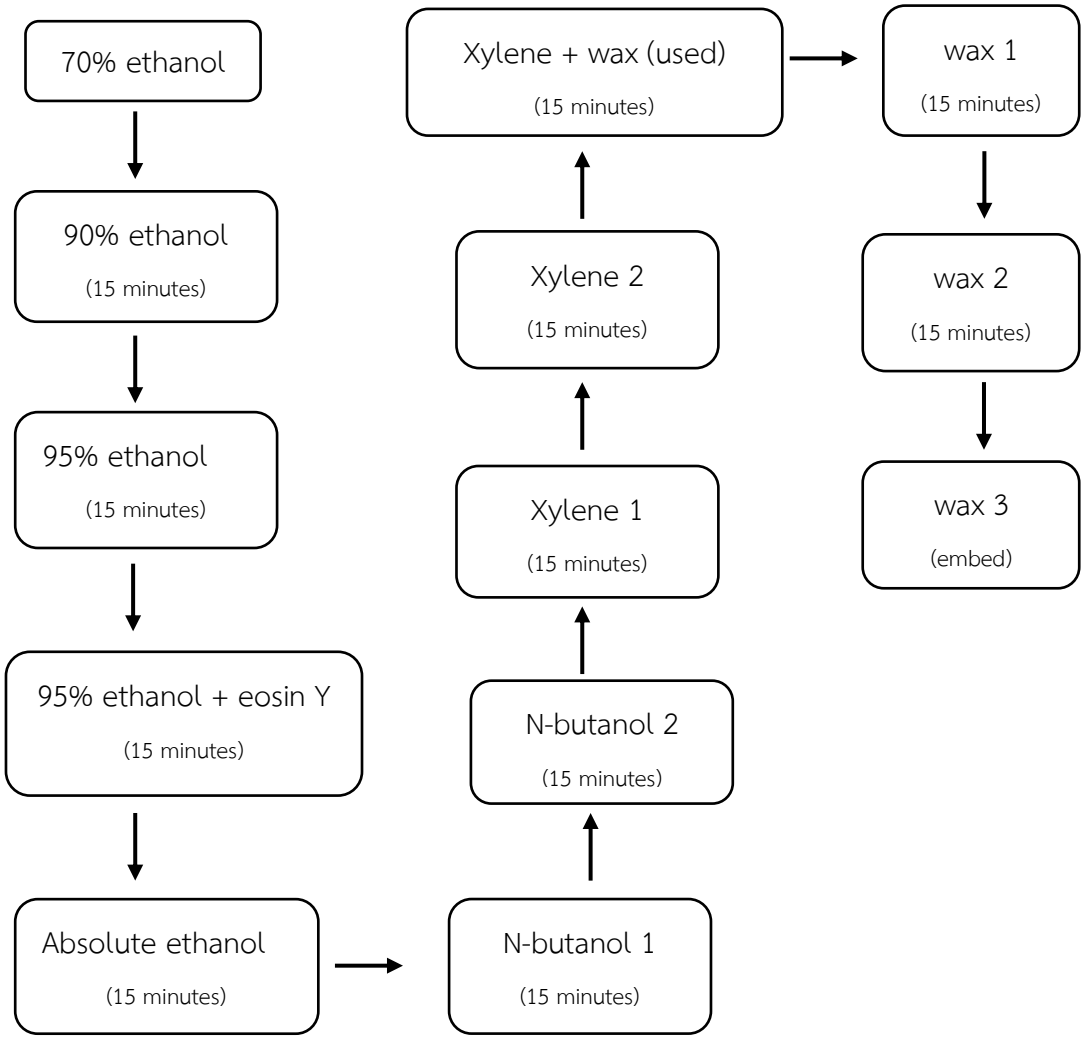
ภาพที่ 3.2 เก็บตัวอย่างกบหนองเพศผู้จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เก็บตัวอย่างด้วยมือหลังจากสำรวจแบบ visual encounter survey ในเวลากลางคืน ระหว่างเดือนตุลาคม - เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2561

ภาพที่ 3.3 ลักษณะพื้นที่ในการเก็บตัวอย่างกบหนองในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม – พฤศจิกายน พ.ศ. 2561

4. การทำสไลด์ถาวรวิธี paraffin method

4.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing)

นำเนื้อเยื่ออัณฑะมาผ่านกระบวนการ paraffin method ตามวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997) โดยนำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาอยู่ใน 70% ethanol มาผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง ดังนี้ 90% ethanol, 95% ethanol และ butanol ตามลำดับ เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) จากนั้นจึงนำมาทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย xylene (clearing) ก่อนนำไปแทรกซึมด้วยพาราฟิน (infiltration) โดยการแช่ใน paraplast เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งเท่าเทียมกันและสม่ำเสมอจนสามารถตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง ๆ ได้ (ภาพที่ 3.4)



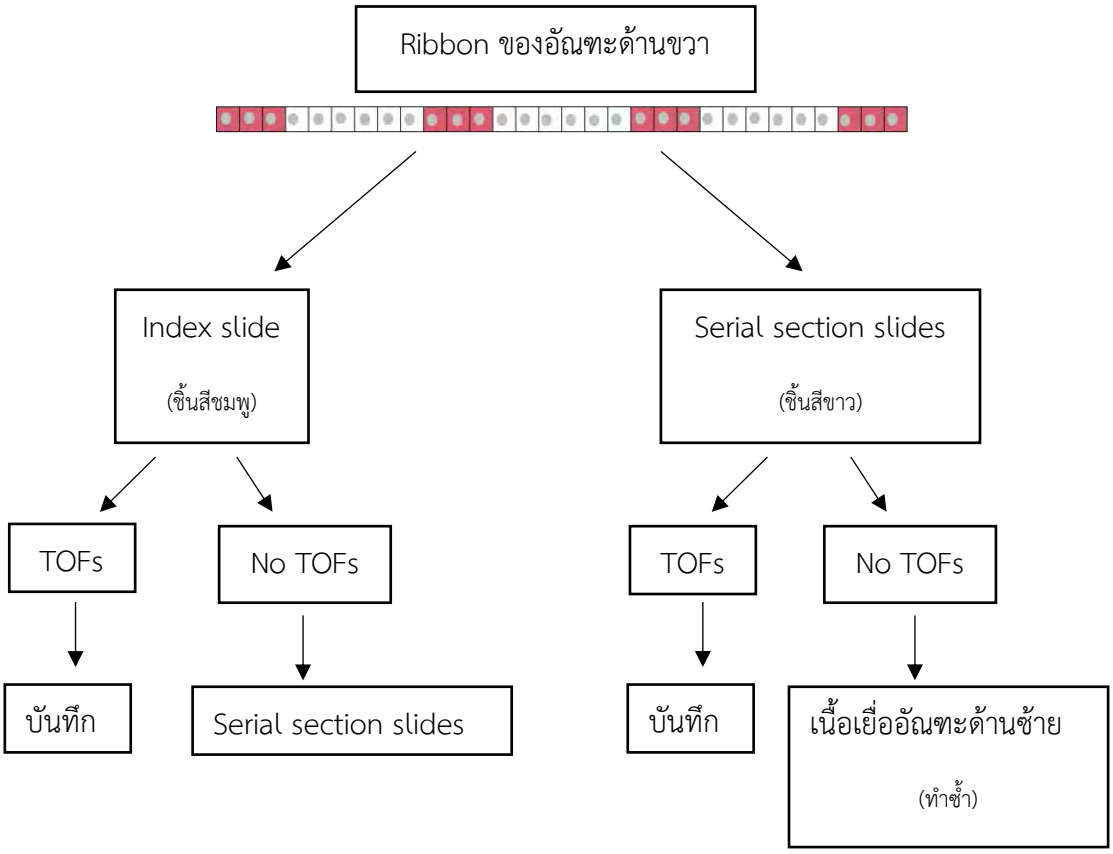
ภาพที่ 3.4 แผนภาพสรุปขั้นตอน paraffin method (Presnell and Schreibman, 1997) ที่ใช้ในการศึกษาจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง

4.2 การฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

ทำการฝังชิ้นเนื้อลงในพาราฟินโดยใช้แม่พิมพ์โลหะสี่เหลี่ยม โดยเท paraplast เหลวที่มีอุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส ลงในแม่พิมพ์โลหะจนเต็ม แล้วนำเนื้อเยื่อฝังลงใน paraplast เหลว จากนั้นจึงปล่อยให้เย็น แล้วทำการตัดแต่งหน้าบล็อก (trimming) ให้เหลือพาราฟินรอบเนื้อเยื่อน้อยที่สุด

4.3 การตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (sectioning)

นำเนื้อเยื่ออัณฑะที่ผ่าน infiltration และอยู่ในบล็อกพาราฟินแล้วมาตัดให้เป็นแผ่นที่ความหนาขนาด 6 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome; Leica RM2165) ให้เป็นแผ่นต่อกัน (ribbon) ตัดจนหมดชิ้นเนื้อเยื่อ แล้วเลือกเนื้อเยื่อ 3 แผ่นทำเป็น index slide เว้น 7 แผ่นทำเป็น serial slide แล้วทำซ้ำจนกว่าจะหมดชิ้น ribbon (ภาพที่ 3.5) จากนั้นนำมาติดบนสไลด์โดยใช้สารละลาย albumin solution เป็น adhesive agent

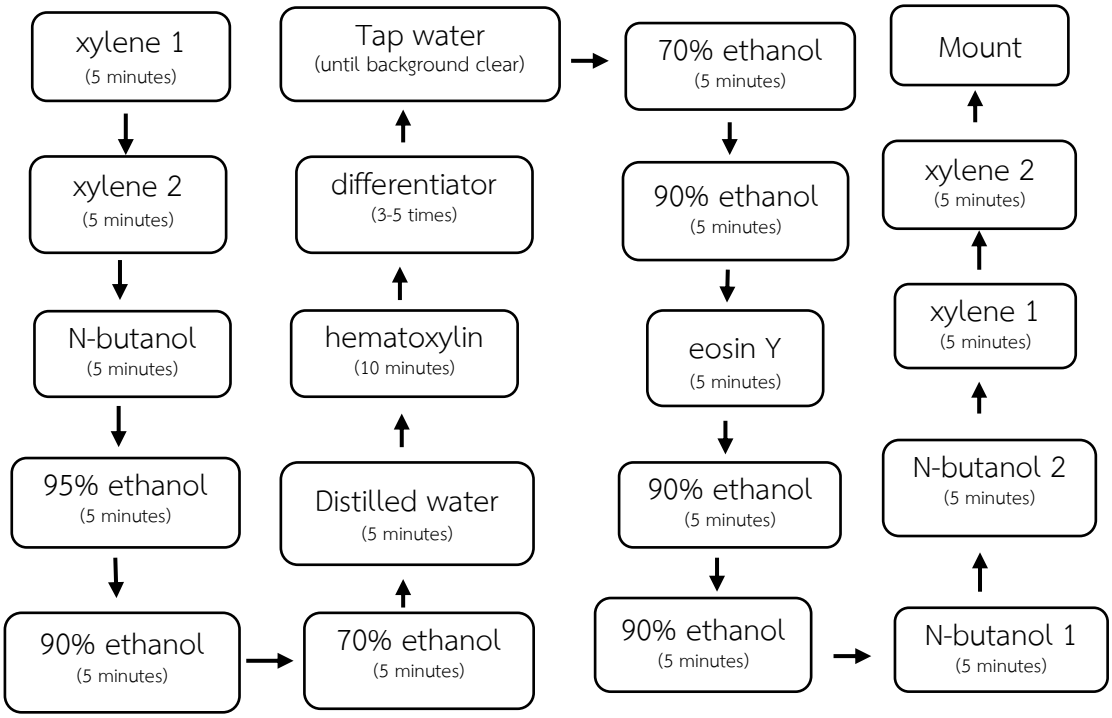


ภาพที่ 3.5 แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจสอบจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพื่อตรวจสอบการปรากฏของ TOFs

4.4 การย้อมสี hematoxylin และ eosin

นำ index slide ที่มีเนื้อเยื่ออัณฑะ มาย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ตามขั้นตอนดังนี้ ละลาย paraplast (dewaxing) ด้วย xylene จากนั้นดึงน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ (rehydration) ผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ เริ่มจาก butanol, 95% ethanol, 90% ethanol และ 70% ethanol ตามลำดับ จากนั้นแช่ในน้ำกลั่นก่อนนำมาแช่ใน picric acid เพื่อทำให้เนื้อเยื่อติดสีม่วงของ hematoxylin ที่มีคุณสมบัติเป็น acid dye ได้ดียิ่งขึ้น จากนั้นจึงย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นและจุ่มลงในสาร differentiator (1% HCl เข้มข้นใน 70% ethanol) 5 ครั้งหรือจนกว่าส่วนรอบนอกเนื้อเยื่อจะใส แล้วนำไปแช่ในน้ำประปาเป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 70% ethanol และ 90% ethanol ตามลำดับ ก่อนนำมาย้อมด้วย 0.5% eosin Y หลังจากนั้นจึงทำการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูง เริ่มจาก 70% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol และ butanol ตามลำดับ แล้วจึงนำมาทำให้เนื้อเยื่อใสอีกครั้งด้วย xylene จากนั้นใช้ permount หยดลงบนสไลด์ 2 – 3 หยด แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

ทำการตรวจสอบภาวะเพศกำกวมด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope) หากพบทำการบันทึกผล หากไม่พบจะนำ serial slide ที่เหลือมาทำข้อ 4.4 ซ้ำ หากไม่พบภาวะเพศกำกวมจะนำอัณฑะข้างซ้ายมาทำข้อ 4.1 – 4.4 ซ้ำ



ภาพที่ 3.6 แผนภาพแสดงขั้นตอนการย้อมสี hematoxylin และ eosin เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคของอัณฑะกบหนอง

5. การตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและภาวะเพศกำกวม

ตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะของกบหนอง *F. limnocharis* หากมีการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ จะเกิดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) ภายใน seminiferous lobule โดยสังเกตจากการย้อมติดสีม่วงของ hematoxylin ที่บริเวณหัวของ spermatozoa แต่หากเกิดภาวะเพศกำกวมจะพบว่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะกบจะมีการสร้างทั้งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย โดยปรากฏลักษณะการเจริญของ follicle ภายในเนื้อเยื่ออัณฑะ เรียกภาวะดังกล่าวว่า TOFs (Coady *et al*., 200

6. การวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ

คำนวณอัตราส่วนของอัณฑะที่ปกติต่ออัตราส่วนของอัณฑะที่ผิดปกติโดยใช้ Microsoft excel 2016

ตรวจสอบ Health status โดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึม (logarithm) ของน้ำหนักตัว (BW) และ logarithm ของ SVL (Othman, 2009) โดยใช้ Microsoft excel 2016 ดังแสดงในสมการดังนี้

$$\log BW = b \log SVL + \log a$$

และคำนวณค่า condition factor โดยใช้สมการ $(BW \times 100) / (a \times SVL^{b})$

Gravimetric analysis ดังนี้ gonadosomatic index (GSI) (Goodwin *et al*., 1992) ซึ่งเป็นอัตราส่วนของอวัยวะนั้น ๆ ต่อน้ำหนักตัวตามสูตรดังนี้

$$GSI = \text{น้ำหนักอัณฑะ} \times 100 / \text{น้ำหนักตัว}$$

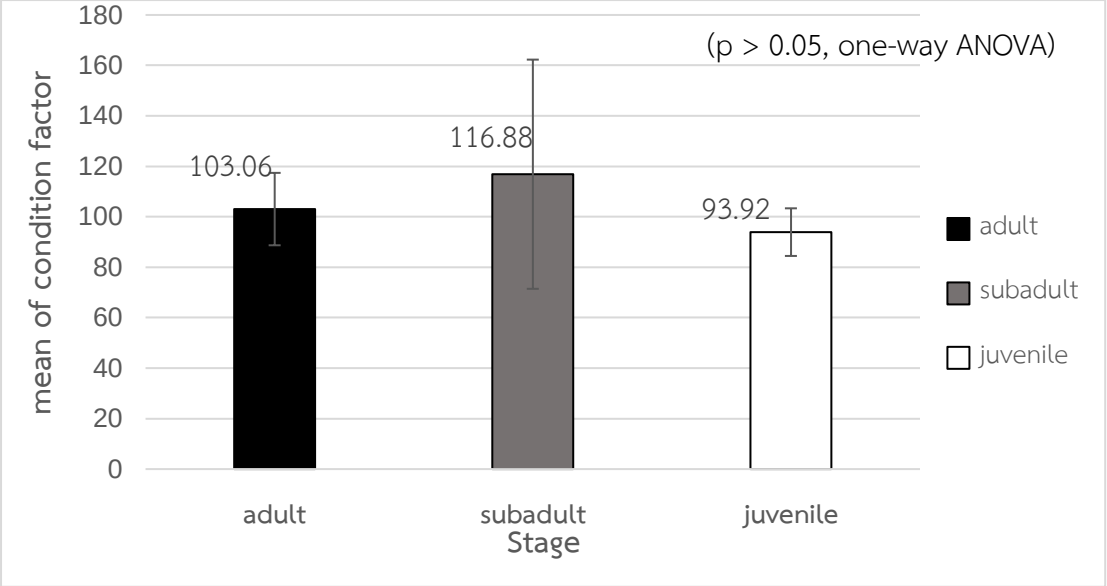
เปรียบเทียบ condition factor และ morphometric parameters ของกบหนองระยะ adult, subadult และ juvenile ด้วย one-way ANOVA, Tukey HSD post hoc และเปรียบเทียบ GSI ของกบหนองระยะ adult และ subadult ด้วย independent sample t-test

บทที่ 4

ผลการศึกษาและอภิปรายผลการศึกษา

1. สุขภาวะของกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

ค่าสุขภาวะโดยรวม หรือ Condition factor (CF) ของกบหนองเพศผู้ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ adult, subadult และ juvenile มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 103.06±14.35, 116.88±45.42 และ 93.92±9.44 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบพบว่าทั้ง 3 ระยะมีค่าเฉลี่ยของ CF ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value > 0.05) เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า CF ของกบหนองเพศผู้ระยะ adult จากพื้นที่จุฬาฯ สระบุรีกับกบหนองจาก จังหวัดน่านมีค่าเท่ากับ 102.16±11.696 และ 101.87±1.47 (Thammachoti, 2012 และ Jantawongsri, 2014) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่ากบหนองจากพื้นที่จุฬาฯ สระบุรีมี condition factor ใกล้เคียงกับจังหวัดน่าน

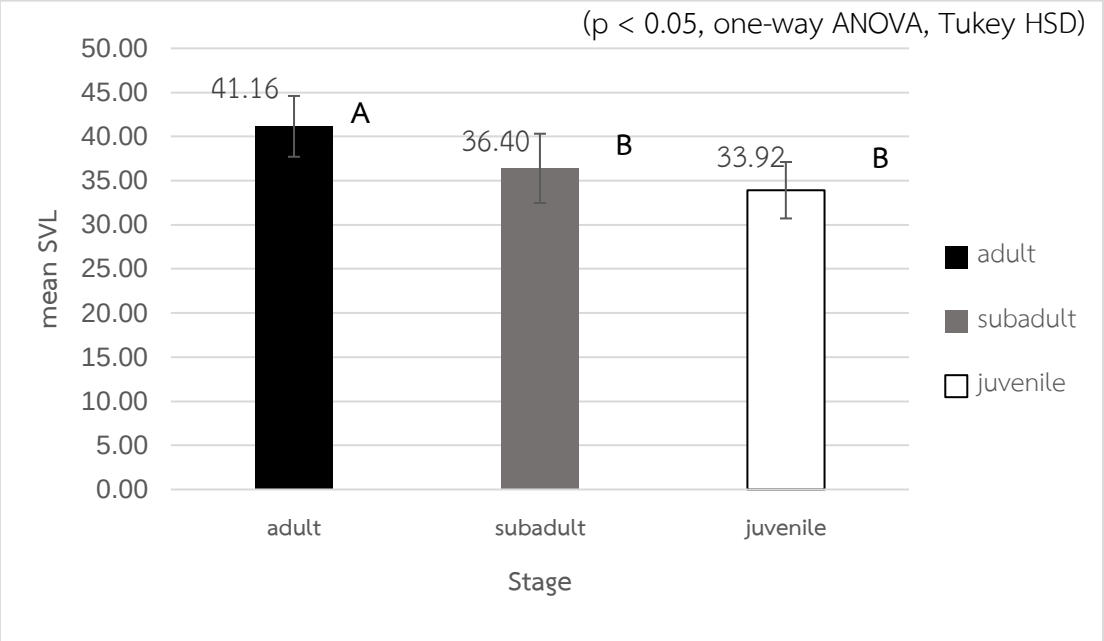


ภาพที่ 4.1 ค่าเฉลี่ย condition factor ของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เดือนตุลาคม - พฤศจิกายน 2561

2. ค่ามอโฟเมตริกและกราวิเมตริกของกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

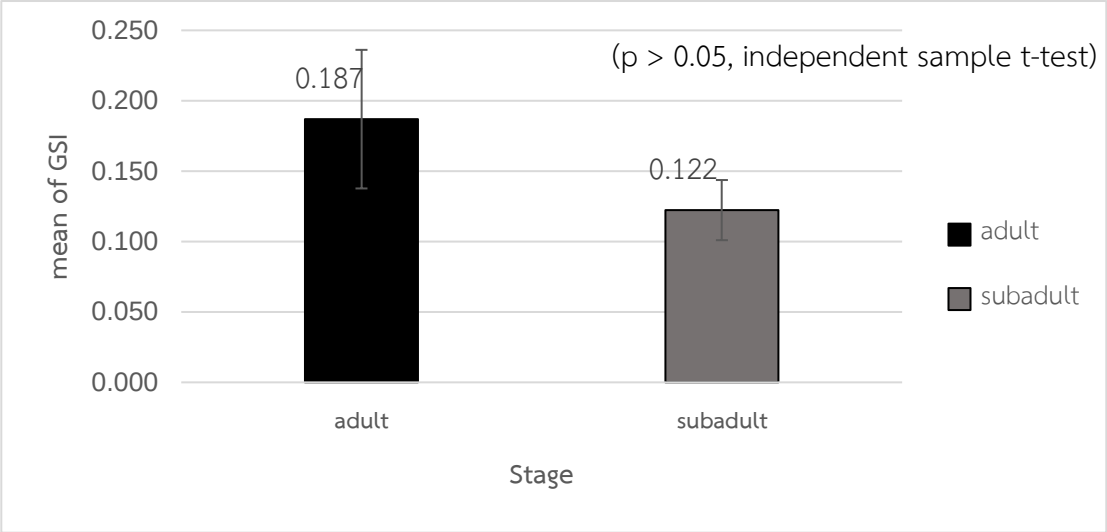
จากการศึกษาค่ามอโฟเมตริกของกบหนองเพศผู้ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ adult, subadult และ juvenile พบว่าความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวารหรือ SVL มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 41.16 ± 3.45,

36.40 ± 3.93 และ 33.92 ± 3.20 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) ใน adult มีความแตกต่างกับ subadult และ juvenile อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value = 0.000) แต่ใน subadult และ juvenile ไม่มีความแตกต่างกัน



ภาพที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยความยาวจากปลายจมูกถึงรูทวารของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เดือนตุลาคม - พฤศจิกายน 2561

ค่ากราวิเมตริก ได้แก่ GSI คืออัตราส่วนระหว่างอัณฑะต่อน้ำหนักตัวทั้งหมดของกบหนองเพศผู้ แบ่งเป็น 2 ระยะการเจริญได้แก่ adult และsubadult พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.187 ± 0.049 และ 0.122 ± 0.021 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) ค่า GSI ของกบหนองทั้งสองระยะไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value > 0.05) เมื่อเปรียบเทียบค่า GSI ของกบหนองเพศผู้ระยะ adult จากพื้นที่จุฬาฯ สระบุรีกับพื้นที่ จังหวัดน่านมีค่าเท่ากับ 0.23 ± 0.01 และ 0.17 ± 0.01 (Thammachoti, 2012 และ Jantawongsri, 2014) และ จังหวัดตากมีค่าเท่ากับ 0.1 – 3 (Othman, 2011) พบว่ามีค่าอยู่ในช่วงเดียวกันแสดงให้เห็นว่ากบหนองจากพื้นที่จุฬาฯ สระบุรี อยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์



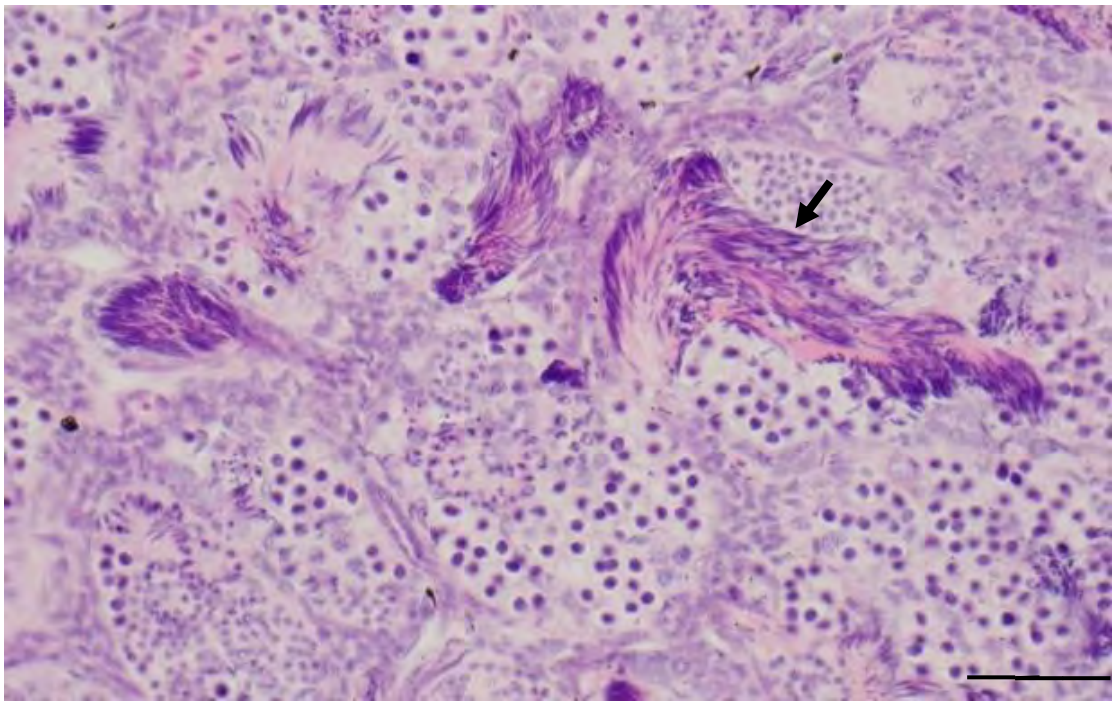
ภาพที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย GSI ของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เดือนตุลาคม - พฤศจิกายน 2561

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และภาวะเพศกำกวมของกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี

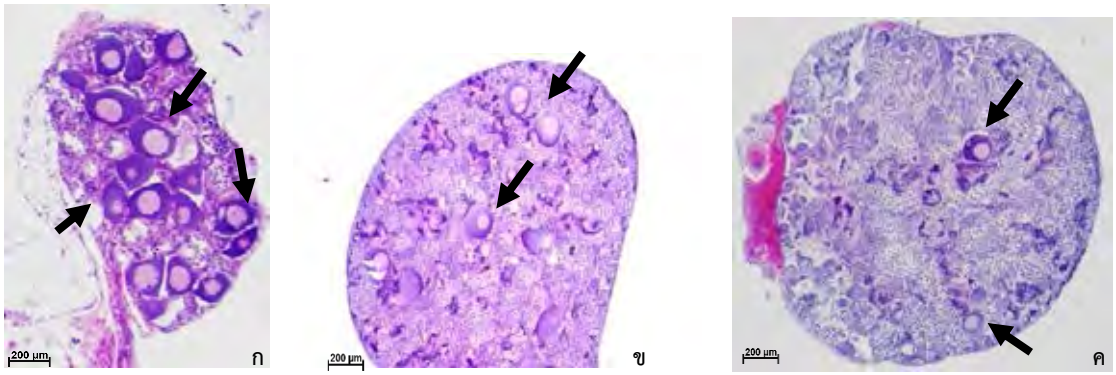
ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* ในภาวะการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (ภาพที่ 4.4) เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อที่ตัดในแนว cross section พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) ภายใน seminiferous lobule ซึ่งภายในจะประกอบไปด้วยกลุ่มการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะเดียวกันในโครงสร้างที่เรียกว่า cysts เมื่อ primary spermatocyte เริ่มมีการเจริญขึ้นเรื่อย ๆ จนเปลี่ยนแปลงไปเป็น spermatozoa จะสังเกตจากการย้อมติดสีม่วงของ hematoxylin ที่บริเวณหัวของสเปิร์ม โครงสร้างของ cyst จึงเปิดออก ปลดปล่อยเข้าสู่ช่องว่าง (lumen) ของ seminiferous lobule (Ogielska and Bartmanska, 2009)

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* ในภาวะเพศกำกวม (ภาพที่ 4.5) เมื่อศึกษาเนื้อเยื่อที่ตัดในแนว cross section พบโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เหมือนกับภาวะการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (ภาพที่ 4.4) แต่มีการปรากฏของเซลล์ไข่ (oocyte) อยู่ภายในเนื้อเยื่ออัณฑะ จากการตรวจสอบการเกิดภาวะเพศกำกวมหรือ TOFs ในกบหนองเพศผู้ที่อาศัยในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี จำนวน 63 ตัว แบ่งเป็น adult 50 ตัว, subadult 7 ตัว และ juvenile 6 ตัว โดยการ

ตัด serial section ตรวจสอบทั้งอวัยวะพบว่ากบหนองเพศผู้ที่มี TOFs จำนวน 46/50 (92%), 7/7 (100%) และ 6/6 (100%) ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ในภาวะการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปกติ; ลูกศรสีดำแสดงถึง mature sperm; bar = 50 µm

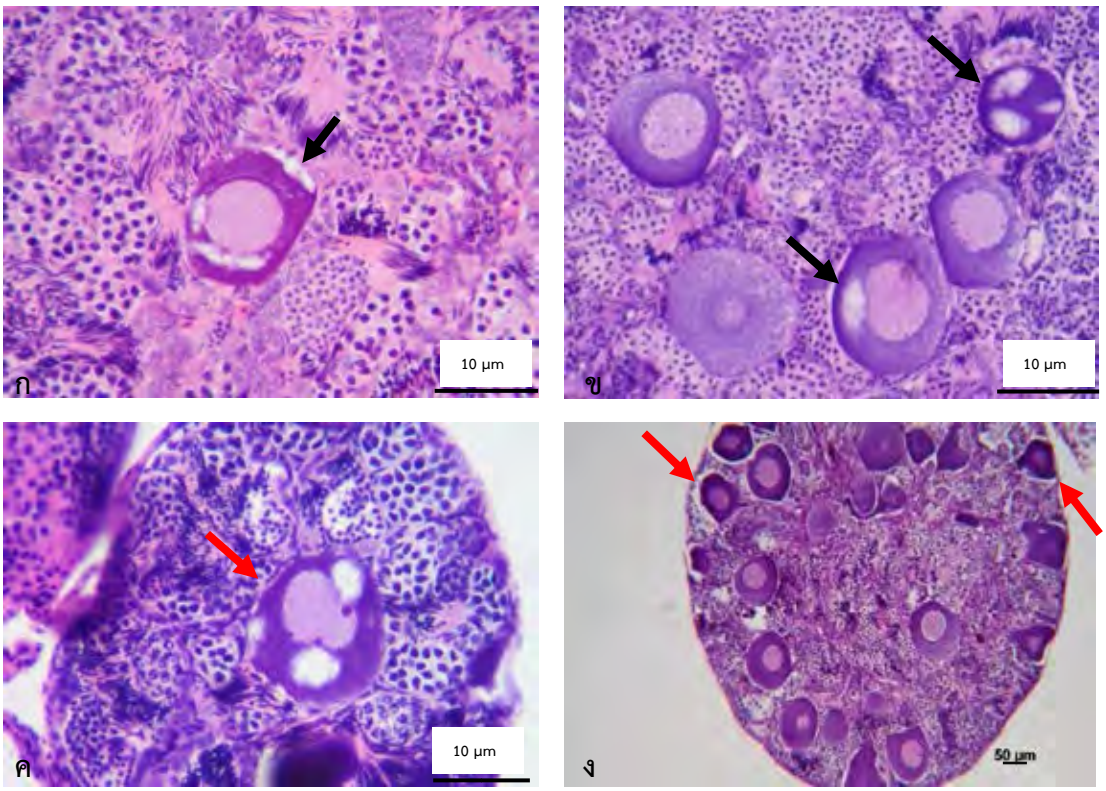


ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ) ใน ก - ระยะ juvenile, ข - ระยะ subadult, ค - ระยะ adult ที่เก็บจากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน 2561

ตารางที่ 4.1 ภาวะเพศกำกวมหรือการปรากฏ TOFs ในเนื้อเยื่ออัณฑะของกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้จากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2561

ระยะการเจริญของกบหนอง	กบหนองเพศผู้ที่พบ TOFs (ตัว)	กบหนองเพศผู้ที่ไม่พบ TOFs (ตัว)
adult	46	4
subadult	7	0
juvenile	6	0

การปรากฏของ follicle ในเนื้อเยื่ออัณฑะมีลักษณะเป็น atretic follicle โดยพบการเกิด vacuole ใน cytoplasm (vacuolation), hyperbasophilic cytoplasm และ การฝ่อ (atrophy) ซึ่ง atretic follicle เหล่านี้จะเกิดการสลายในระยะเวลาต่อมา (Saidapur และ Nadkarni, 1973) ดังนั้นการปรากฏของ TOFs ในอัณฑะกบหนองเพศผู้มีแนวโน้มที่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ (gonadal sex differentiation) รูปแบบหนึ่งในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก



ภาพที่ 4.6 ลักษณะ atretic follicle ภายในเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนองเพศผู้ *F. limnocharis* ก, ข - vacuolation (ลูกศรสีดำ) ค, ง - Hyperbasophilic cytoplasm (ลูกศรสีแดง)

แม้ว่าการปรากฏของภาวะเพศกำกวมในกบหนองเพศผู้ทั้งสามระยะอาจมีแนวโน้มที่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ แต่เนื่องจากการพบภาวะเพศกำกวมอาจเกี่ยวข้องกับการได้รับสารแปลกปลอมที่ออกฤทธิ์รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (McCoy *et al*., 2008) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในตัวกบหนองจากพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี เพื่อยืนยันว่าไม่มีการตกค้างของสารแปลกปลอมที่ออกฤทธิ์รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ adult, subadult และ juvenile ในพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ซึ่งเป็นพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการใช้สารฆ่าวัชพืชนานกว่า 10 ปี โดยเก็บตัวอย่างกบหนอง ระหว่างเดือนตุลาคม - พฤศจิกายน พ.ศ. 2561 พบการปรากฏของ TOFs เท่ากับ 59/63 ตัว (93.65%) แบ่งเป็นกบหนองเพศผู้ระยะตัวเต็มวัย ระยะก่อนเต็มวัย และระยะวัยอ่อน 46/50 ตัว (92%), 7/7 ตัว (100%) และ 6/6 ตัว (100%) ตามลำดับ จากการศึกษากายวิภาคเนื้อเยื่อของอัณฑะที่มีภาวะเพศกำกวมของกบหนองเหล่านี้พบว่ามีแนวโน้มที่จะเป็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศรูปแบบหนึ่งซึ่งเป็นภาวะปกติ ดังนั้นการปรากฏ TOFs ในอัณฑะอาจไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็น biomarker ที่ดีในการประเมินผลกระทบของการได้รับสารเคมีที่เป็น endocrine disrupting chemical ในกบหนอง *F. limnocharis*

เอกสารอ้างอิง

สำนักงาน กปร. ไม่ระบุปี. โครงการ พัฒนาที่ดินของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. [ออนไลน์] แหล่งที่มา: http://km.rdpb.go.th/Project/View/6075 [9 พฤษภาคม 2562].

ฤดีมาศ บุตรศิริ. 2559. ภาวะเพศกำกวมในกบหนอง *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) เพศผู้ที่อาศัยในพื้นที่เกษตรกรรม จังหวัดน่าน. โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Public Health Statement for Atrazine. [online]. แหล่งที่มา: https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=336&tid=59 [9 พฤษภาคม 2562].

AmphibiaWeb. 2017. Worldwide Amphibian Declines: What is the Scope of the Problem, What are the Causes, and What can be Done? [online]. แหล่งที่มา: https://amphibiaweb.org/declines/declines.html [9 พฤษภาคม 2562].

Beebee T.J.C. and Griffiths R.A. 2005. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? Biological Conservation 125: 271-285.

Viertel B. and Richter S. 1984. Tadpole: The Biology of Anuran Larvae. 1999: 24-51.

Coady K.K., Murphy M.B., Villeneuve D.L., Hecker M., Jones P.D., Carr J.A., Solomon K.R., Smith E.E., Van Der Kraak G., Kendall R.J. and Giesy J.P. 2005. Effect of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. Ecotoxicology and Environmental Safety 62: 160-173.

Goodwin A.E., Gizzle J.M., Bradley J.T. and Estridge B.H. 1992. Monoclonal antibody-based immunoassay of vitellogenin in the blood of male channel catfish (*Ictalurus puntatus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B 101(3): 441-446.

Gramapurohit N., Shanbhag B., and Saidapur S. 2000. Pattern of gonadal sex differentiation, development, and onset of steroidogenesis in the frog, *Rana curtipes*. General and Comparative Endocrinology 119: 256-264.

Hayes T.B., Collins A., Lee M., Mendoza M., Noriega N., Stuart A.A., and Vonk A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 99: 5476-5480.

Hayes T. B., Stuart A.A., Mendoza M., Collins A., Noriega N., Vonk A., Johnston G., Liu R., and Kpodzo D. 2006. Characterization of atrazine-Induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17β-estradiol): Support for the demasculinization/feminization hypothesis. Environmental Health Perspectives. 114: 134-141.

Jantawongsri K. 2014. Immune Response of Rice Frog *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) in Herbicide Utilized Agricultural Area at Wiang Aa District, Nan Province. Master's Thesis, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Lefcort H., Meguire R.A., Wilson L.H., and Ettinger W.F. 1998. Heavy metals alter the survival, growth, metamorphosis, and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35: 447-456.

McCoy Krista A., Bortnick Lauriel J., Campbell Chelsey M., Hamlin Heather J., Guillette Louis J., and St. Mary Colette M. 2008. Agriculture Alters Gonadal Form and Function in the Toad *Bufo marinus*. Environmental Health Perspectives. 116: 1526-1532.

National Research Council. 1991. Animal as Sentinel of Environmental Health Hazard. Washington D.C.: National Academy Press.

Noble G.K. 1931. The biology of the amphibia. 1st ed. New York : : McGraw-Hill. 108-129 p.

Ogielska M. and Bartmanska J. 2009. Spermatogenesis and Male Reproductive System in Amphibia-Anura. 34-99 p.

Othman, M.S.B. 2009. Using the Rice Frog (*Fejervarya limnocharis*) as a Sentinel Species for Cadmium Contamination in Tak Province, Thailand. Doctoral Dissertation Program in Environmental Management, Graduate School, Chulalongkorn University.

Othman M.S., Khonsue W., Kitana J., Thirakhupt K., Robson M.G., and Kitana N. 2011. Reproductive mode of *Fejervarya limnocharis* (Anura: Ranidae) caught from

Mae Sot, Thailand based on its gonadosomatic indices. Asian Herpetological Research 2: 41-45.

Phuge S.K., and Gramapurohit N.P. 2013. Gonadal sex differentiation, development up to sexual maturity and steroidogenesis in the skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*. General and Comparative Endocrinology 181: 65-71.

Presnell J.K. and Schreibman M.P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5th ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.

Saidapur S.K., and Nadkarni V.B. 1973. Follicular atresia in the ovary of the frog *Rana cyanophlyctis* (Schneider). Cells Tissues Organs 86: 559-564.

Torreilles S.L., McClure D.E., and Green S.L. 2009. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 48: 512-516.

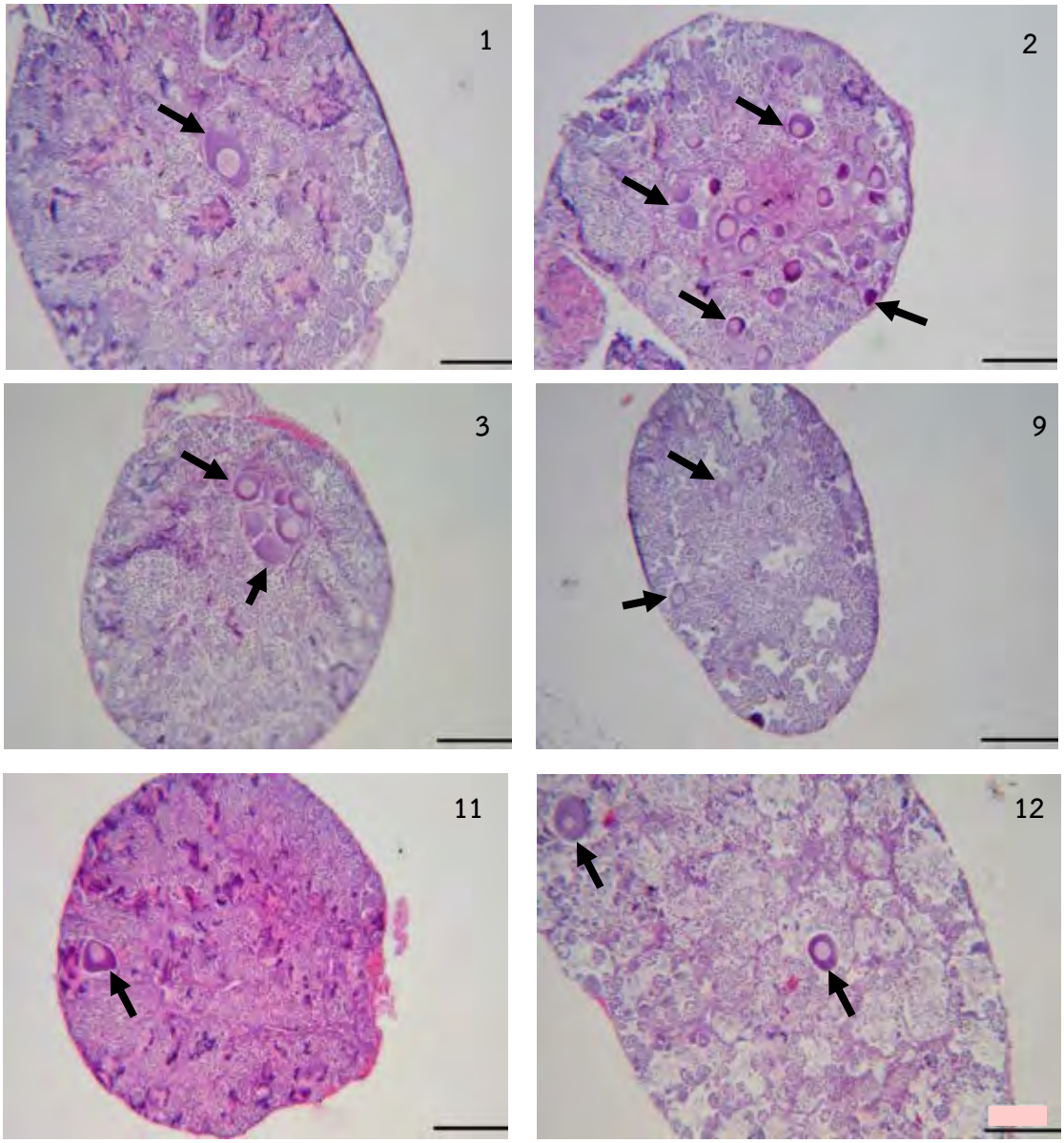
Thammachoti P. 2012. Influence of Herbicides on Morphology and Population of Rice Frog *Fejervarya limnocharis* (Gravenhorst, 1829) in Paddy Fields, Nan Province. Master's Thesis, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Witschi E. 1929. Studies on sex differentiation and sex determination in amphibians. I. Development and sexual differentiation of the gonads of *Rana sylvatica*. Journal of Experimental Zoology 52: 235-265.

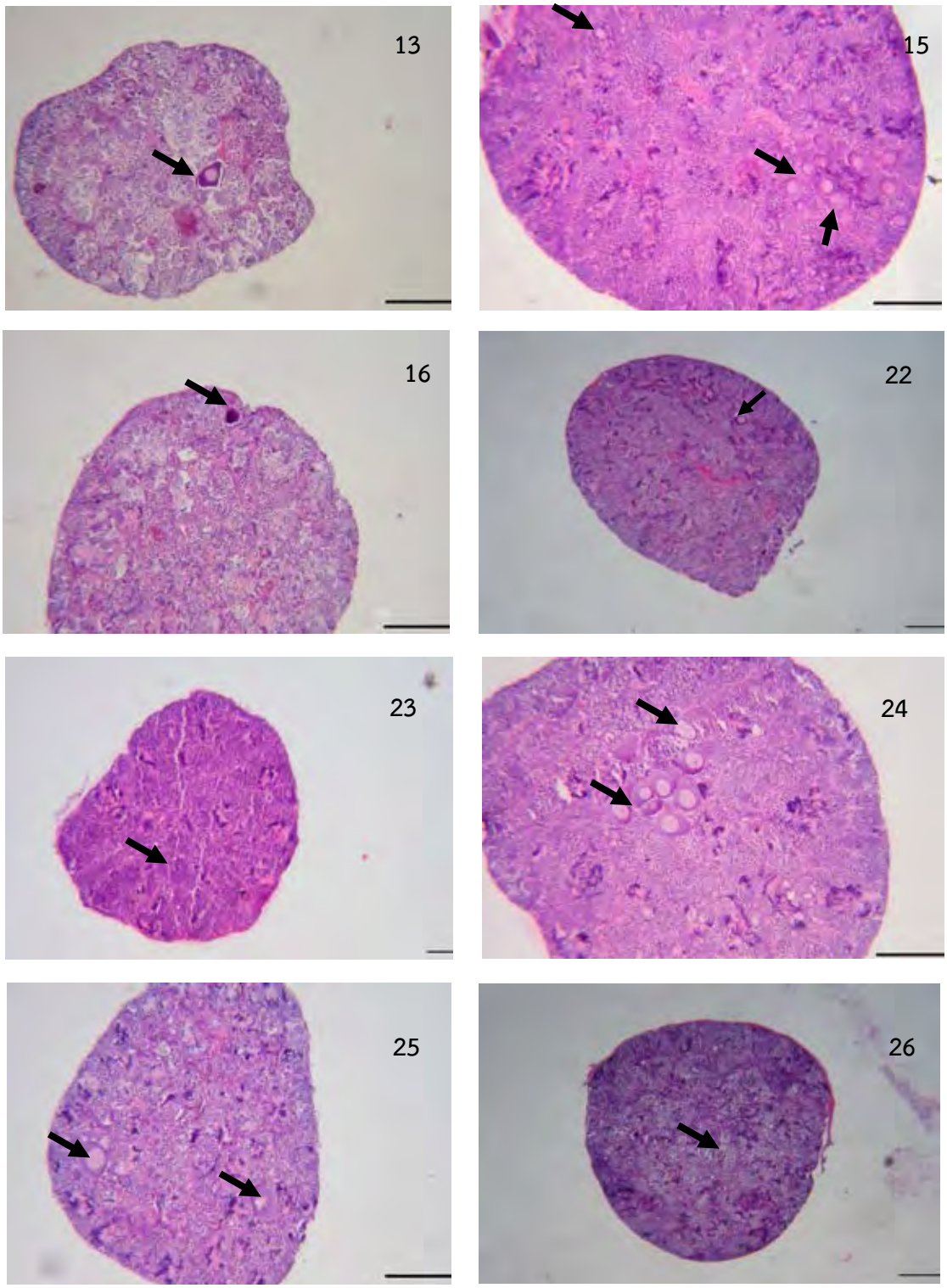
Yu N.W., Hsu C.Y., Ku H.H., Chang L.T. and Liu H.W. 1993. Gonadal differentiation and secretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpole treated with 4-hydroxyandrostenedione. Journal of Experimental Zoology 256(3): 252-257.

ภาคผนวก

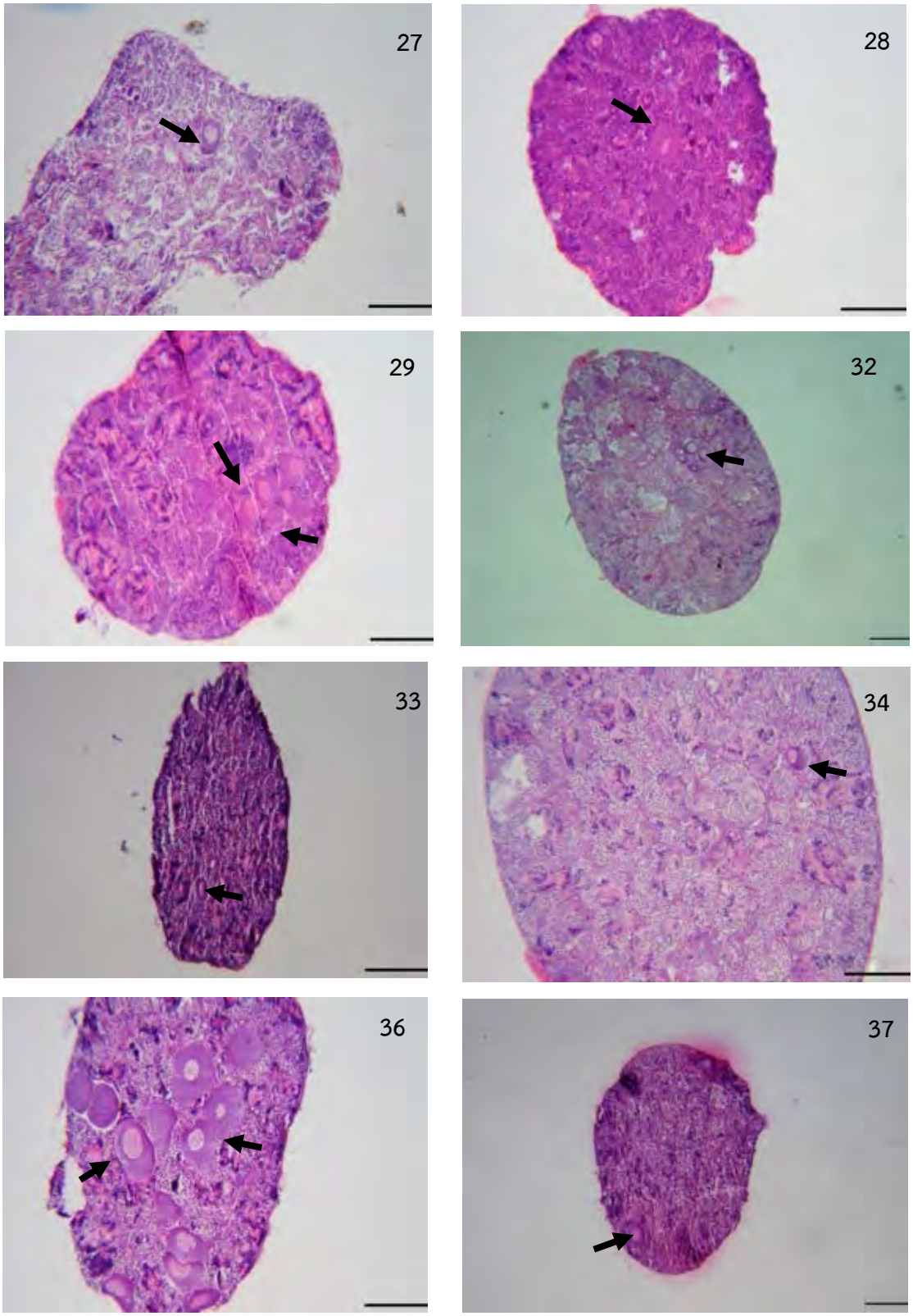
ภาคผนวก ก



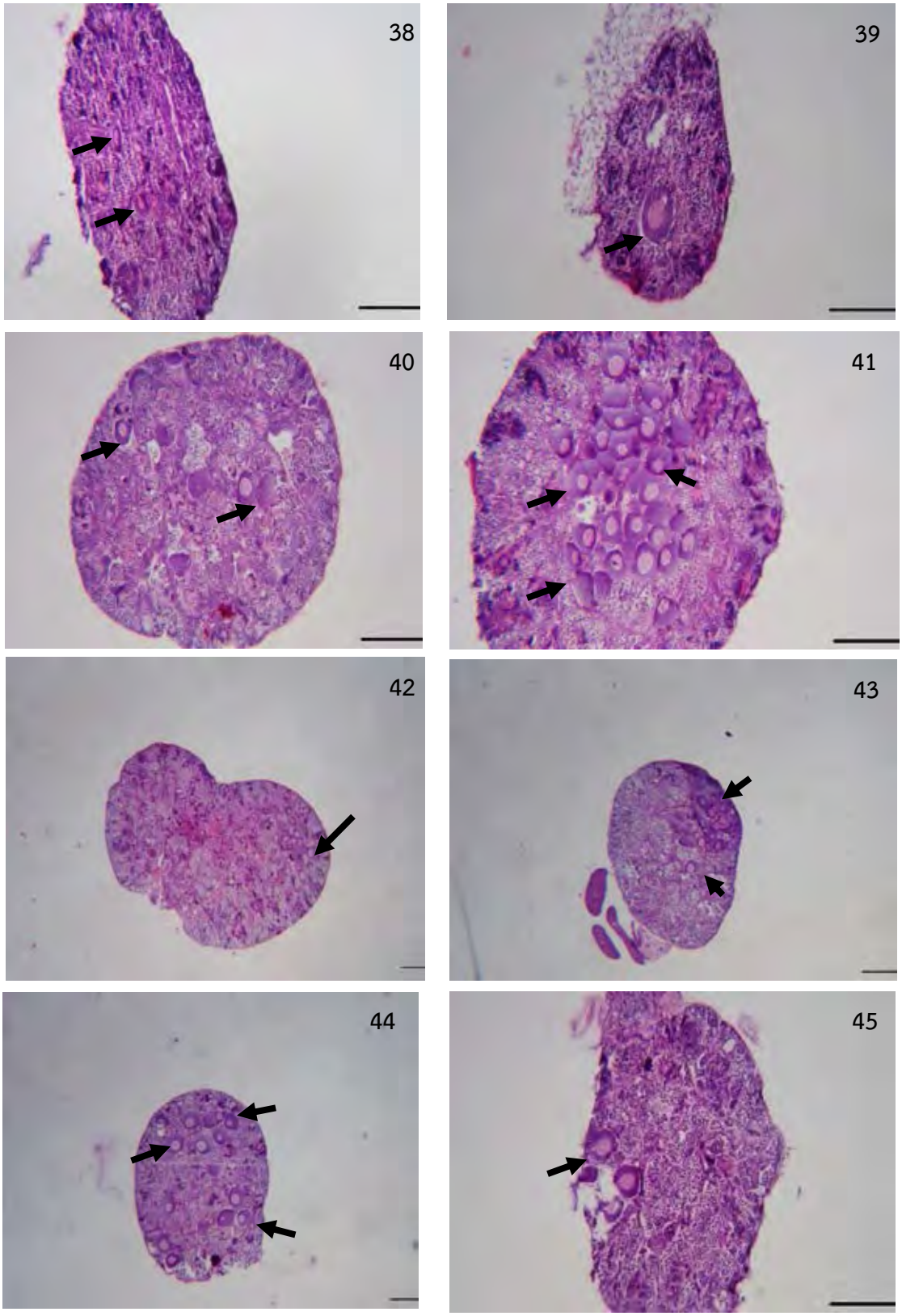
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 μm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number



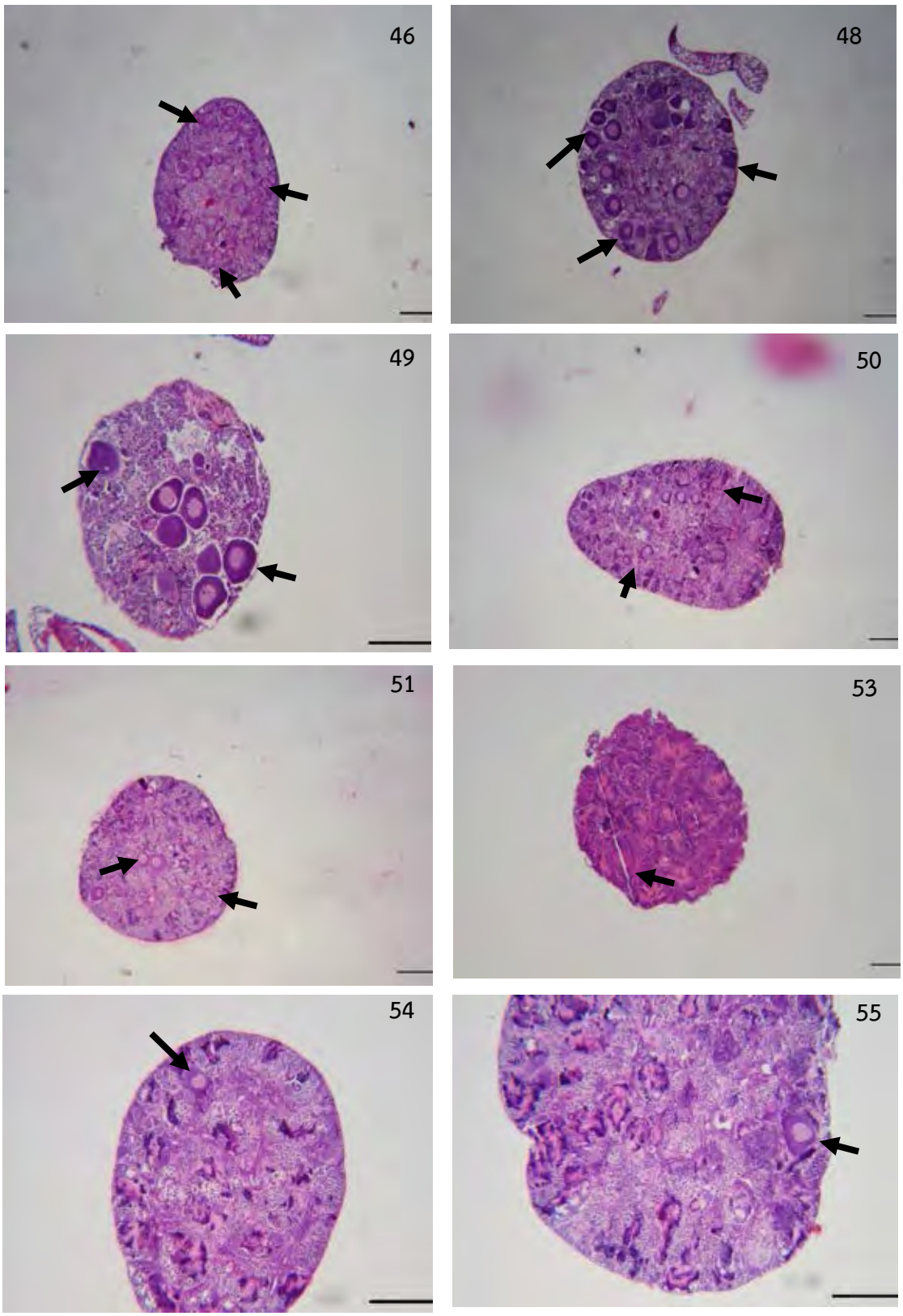
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number (ต่อ)



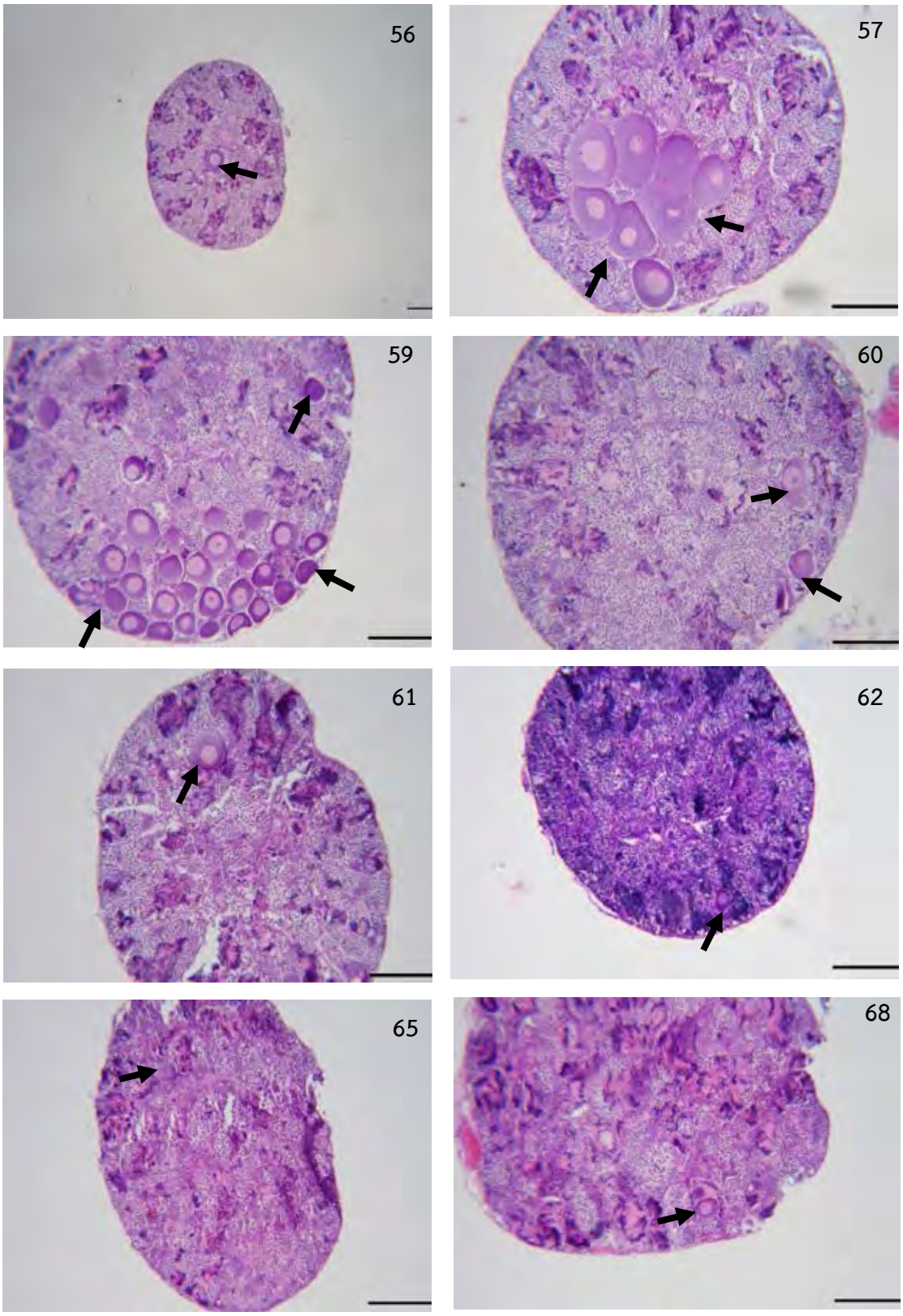
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number (ต่อ)



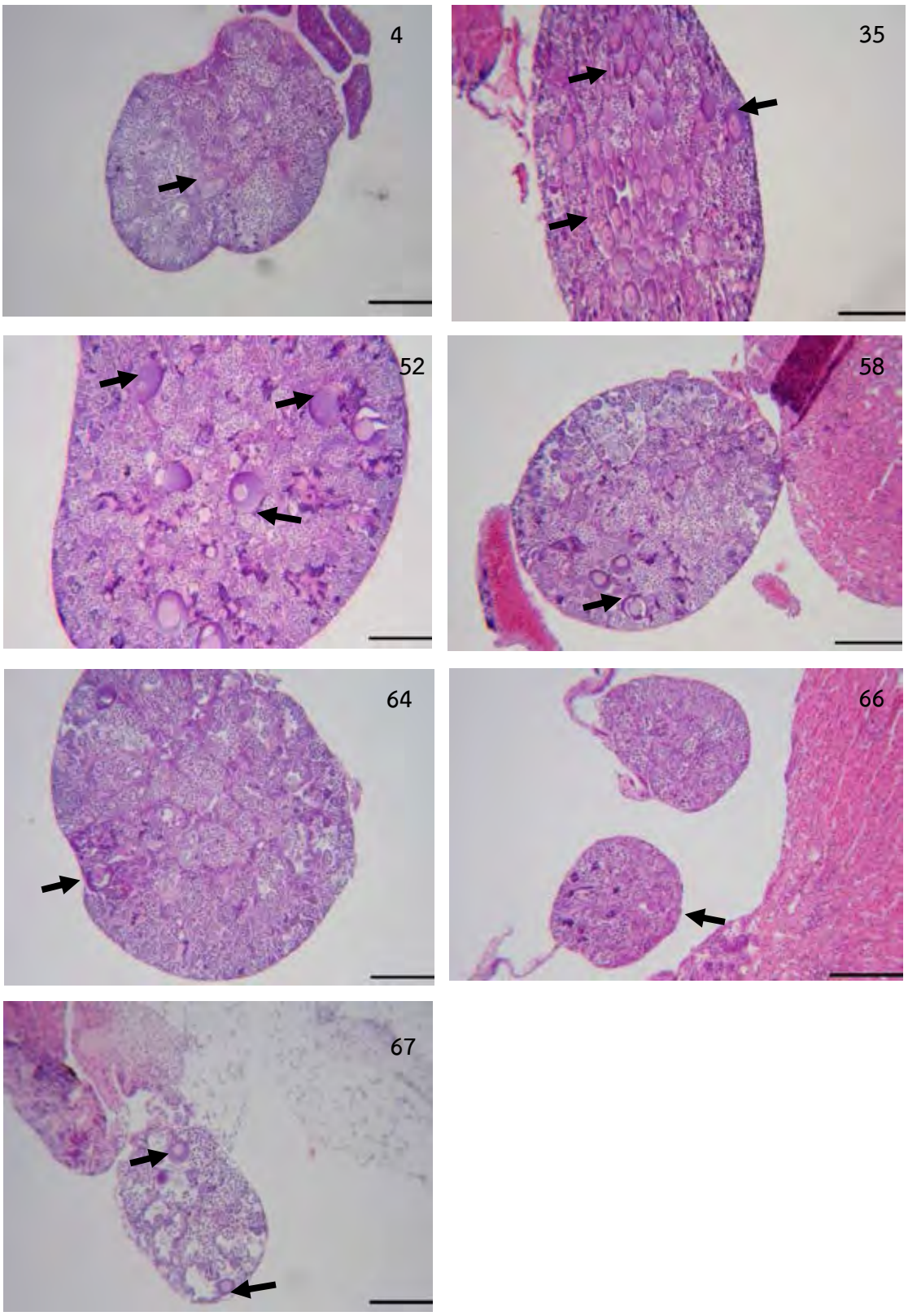
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number (ต่อ)



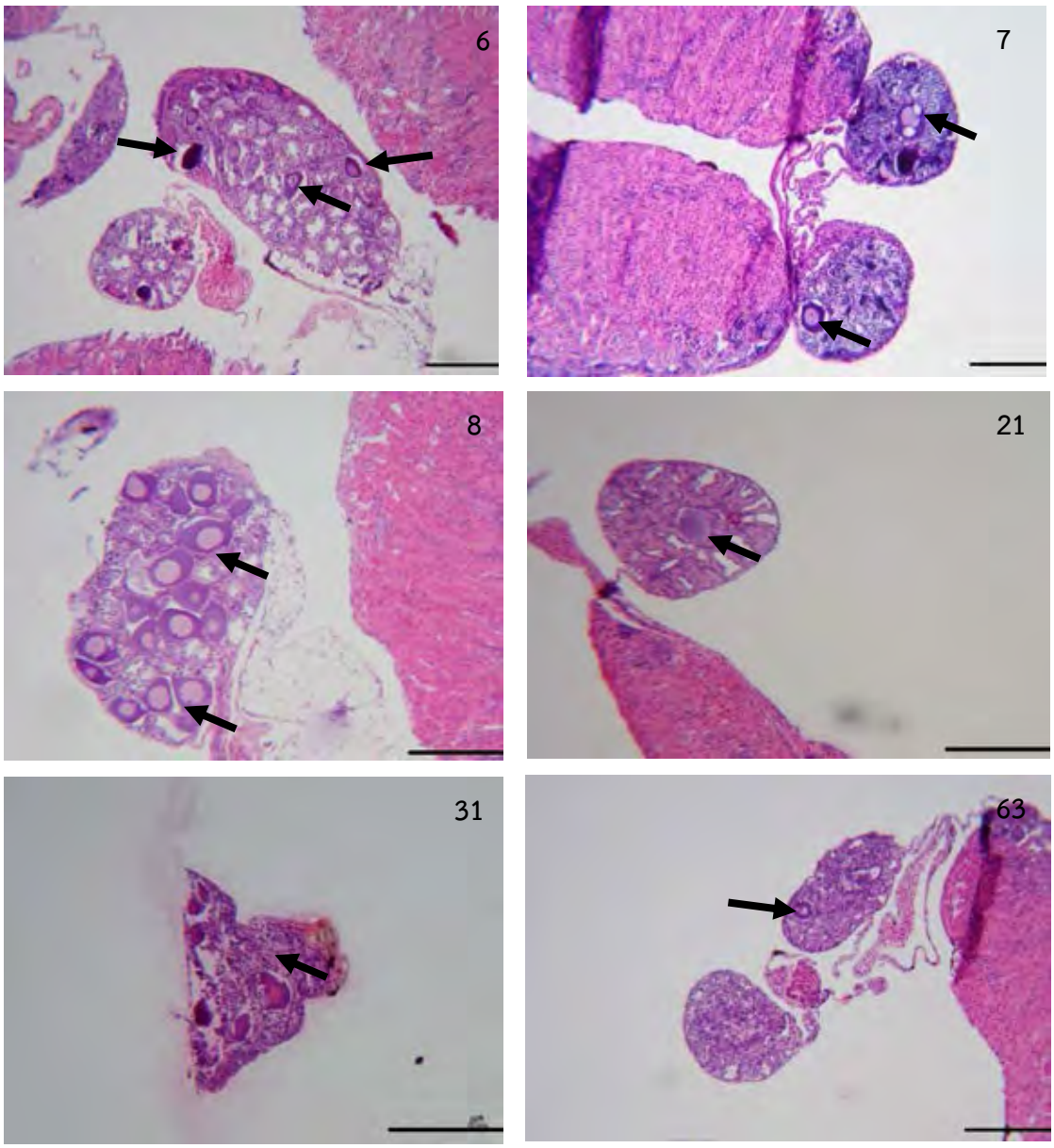
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number (ต่อ)



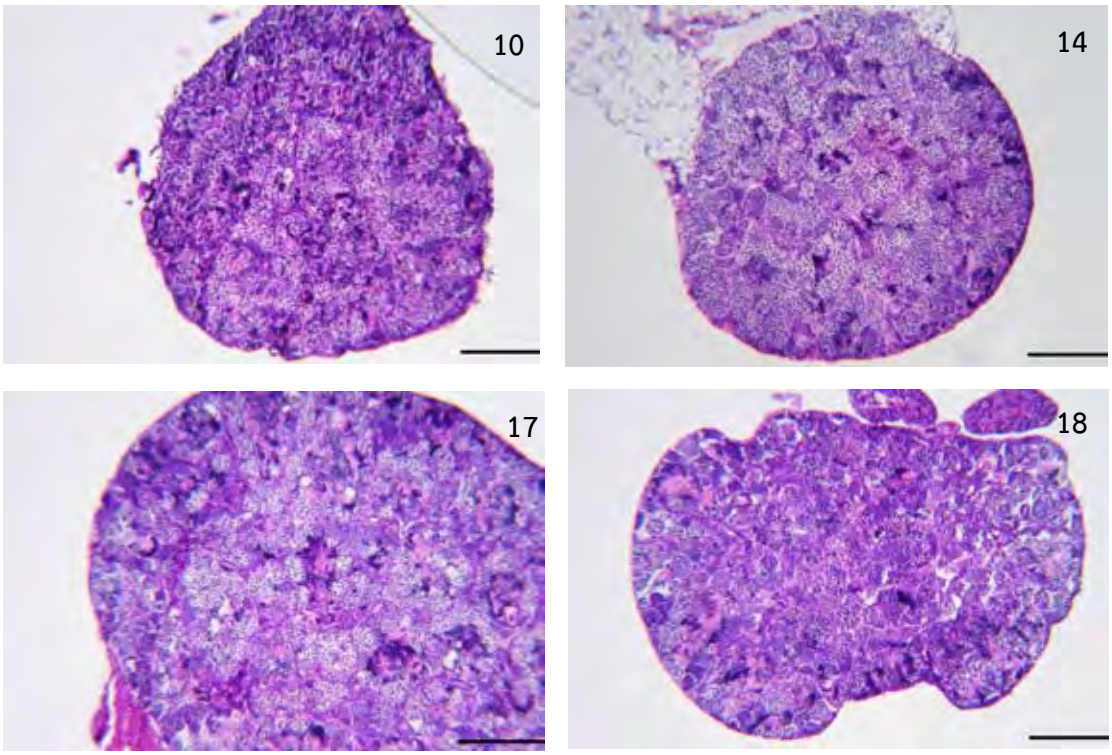
ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number (ต่อ)



ภาพที่ ก-2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ subadult ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number



ภาพที่ ก-3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ juvenile ที่ปรากฏ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number



ภาพที่ ก-1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะกบหนอง *F. limnocharis* เพศผู้ระยะ adult ที่ไม่มีการปรากฏของ TOFs (ลูกศรสีดำ); bar = 200 µm; ตัวเลขมุมบนขวาแสดง individual number

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

สารละลาย Davidson's fixative

Formaldehyde		200 ml
Glycerol		100 ml
Glacial acetic acid		100 ml
Absolute ethanol		300 ml
	Total	700 ml

สารละลาย Neutral formalin buffer (NBF)

Formaldehyde	100 ml
Water	700 ml
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	4.0 g
Na_2HPO_4	6.5 g

Hematoxylin

Delafield's Hematoxylin

Dissolve 4.0 g hematoxylin in 25 ml absolute ethanol

Mix gradually into 400 ml ammonia alum $(NH_4Al(SO_4))_2 \cdot 12H_2O$

(approx. 1 part alum : 11 part distilled water)

Leave exposed to light in a flask with cotton plug for 3-5 days

Filter

To filtrate add 100 ml glycerin and 100 ml methanol

Allow to ripen for at least 6 weeks

The ripened solution will keep for yeas in a stopped bottle

Eosin Y

Eosin Y, C.I. 45a80	10.0 g.
70% ethanol	1000 ml
Glacial acetic acid	5 ml

Diluted with equal volume of 70% ethanol for use and add 2–3 drops of acetic acid

(Humason, 1967)