



รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

สุขภาวะ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูต
ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

ผู้รับผิดชอบโครงการ

อาจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชษฐ คนเชื้อ

น.ส.มุกเรขา เชี่ยวชาญชัย

น.ส.หนึ่งฤทัย วิชัยกุล

นายชัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี

นายรชตะ มณีอินทร์

น.ส.ยุพาพร วิสูตร

นายวรภัทร สวัสดิ์วงศ์

น.ส.ณัฐฐา มธพยนต์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

น.ส.ธฤชวรรณ ไตรจิตต์

ว่าที่ร้อยตรี ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ

นายสุธีโรจน์ มีสวัสดิ์

นายเพชร สิทธิชีวภาค

น.ส.ฤดีมาศ บุตรศิริ

น.ส.ปิ่นมนัส นนท์นา

น.ส.สุวิสาข์ ชอบจิตต์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
0330000000333

เรื่อง

(ภาษาไทย) สุขภาวะ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตในพื้นที่ปกปัก
พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

(ภาษาอังกฤษ) Health and Reproductive Biology of the Blyth's Giant
Frog *Limnonectes blythii* in RSPG Area

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร.จิรารักษ์ กิตนะ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นพดล กิตนะ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชษฐ คุนเชื้อ	รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริญญานท์
น.ส.มุกเรขา เขียวชาญชัย	น.ส.ธฤชวรรณ ไตรจิตต์
น.ส.หนึ่งฤทัย วิชัยกุล	ว่าที่ร้อยตรี ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
นายชัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี	นายสุธิโรจน์ มีสวัสดิ์
นายรชตะ มณีอินทร์	นายเพชร สิทธิชีวภาค
น.ส.ยุพาพร วิสูตร	น.ส.ฤดีมาศ บุตรศิริ
นายวรภัทร สวัสดิ์วงษ์	น.ส.ปิ่นมนัส นนท์นา
น.ส.ณัฐฐา มธุพยนต์	น.ส.สุวิสาข์ ชอบจิตต์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงาน ภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

กบหูต *Limnonectes blythii* เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีขนาดใหญ่และเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ในพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 มีถิ่นอาศัยอยู่บริเวณป่าต้นน้ำบนภูเขาสูง ตามลำห้วยป่าดิบเฉพาะแห่ง โดยในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบกบหูตทางฝั่งตะวันตก ตั้งแต่ภาคเหนือจรดภาคใต้ มีรายงานการพบประชากรกบหูตธรรมชาติในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ได้รับการฟื้นฟูจนมีสภาพระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ จึงเหมาะเป็นแหล่งศึกษาชีววิทยาของกบชนิดนี้ จากการสำรวจภาคสนามด้วยวิธี visual encounter survey ในฤดูแล้งหนาว (เดือนมกราคม) ฤดูแล้งร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) ปี พ.ศ. 2560 พบกบหูตเพศผู้ 7 ตัว เพศเมีย 4 ตัว และกบหูตก่อนวัยเจริญพันธุ์ 3 ตัว รวมทั้งหมด 14 ตัว ทั้งหมดมีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ โดยเพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวจากปลายจมูกถึงรูทวาร เท่ากับ 299 ± 105 กรัม และ 141.30 ± 14.83 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เพศเมียมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและความยาวจากปลายจมูกถึงรูทวาร เท่ากับ 208 ± 27 กรัม และ 129.60 ± 10.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากการศึกษาทางโลหิตวิทยา กบหูตเพศผู้มีค่าเฉลี่ยเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่น เท่ากับ 27.07 ± 7.01 % สูงกว่าเพศเมีย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.50 ± 10.12 % กบหูตทั้งเพศผู้ เพศเมีย และ juvenile มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดออกเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง ทромโบไซต์ และเซลล์เม็ดเลือดขาว 5 ชนิด ได้แก่ โมโนไซต์, ลิมโฟไซต์, นิวโทรฟิล, อีโอสิโนฟิล และเบโซฟิล ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดของกบหูตมีลักษณะคล้ายคลึงกับที่เคยมีรายงานในกบชนิดอื่น โดยไม่พบลักษณะเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติ ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และโลหิตวิทยาของกบหูตที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยา และสภาวะของกบชนิดนี้ในธรรมชาติ เพื่อการวางแผนอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ กบหูต, สภาวะ, เซลล์เม็ดเลือด, โลหิตวิทยา, สัณฐานวิทยา

Abstract

Blyth's giant frog *Limnonectes blythii* is a large amphibian and a protected species inhabited in streams and creeks of some specific highland forests. In Thailand, it been reported to inhabit the western to southern forest areas. It was reported that the Blyth's giant frog has been found in natural habitat at Huai Hongkhrai Royal Development Study Centre, Chiang Mai Province which is one of the RSPG areas. So this area is appropriated to serve as study site in this project. After field collection by visual encounter survey method during cool dry (January), hot dry (April) and wet (August) seasons of 2017 we found 14 frogs: 7 males, 4 females and 3 juveniles. All of the frogs had healthy external appearances. The male frogs were relatively bigger than the females with mean weight and SVL at 299 ± 105 g and 141.30 ± 14.83 mm, respectively. Mean weight and SVL of the females was 208 ± 27 g and 129.60 ± 10.27 mm, respectively. Hematological study revealed that mean PCV of the male frogs (27.07 ± 7.01 %) was relatively higher than that of the females (19.50 ± 10.12 %). Morphological characters of each blood cell type were not different among sexes or ages. The blood cell types of *L. blythii* consisted of erythrocyte, thrombocyte and 5 types of leukocytes: monocyte, lymphocyte, neutrophil, eosinophil and basophil. Morphological characters of each blood cell type are similar to that reported in other frog species without any abnormal characters. All data of morphological and hematological studies of *L. blythii* in this work will be served as baseline data for further biological and health status studies as well as conservation of this frog species in its natural habitat.

Keywords: Blyth's giant frog, health, blood cell, hematology, morphology

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	vii
บทนำ	2
วัตถุประสงค์	2
วิธีดำเนินการวิจัย	2
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล	4
สัตว์ทดลอง	4
ผลการศึกษา	4
สรุปผลการศึกษา	10
เอกสารอ้างอิง	11

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: ข้อมูลสัณฐานวิทยาของกบทูต <i>Limnonectes blythii</i> จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560	6
ตารางที่ 2: ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักตัว และความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้นของกบทูต <i>Limnonectes blythii</i> จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560	7
ตารางที่ 3: ค่าเฉลี่ย PCV และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกบทูต <i>Limnonectes blythii</i> จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560	7

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1: ลักษณะทางสัณฐานของกบทูต <i>Limnonectes blythii</i> ตัวเต็มวัยเพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา) ที่สำรวจพบในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอ ดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่	5
ภาพที่ 2: ลักษณะทางสัณฐานที่ใช้จำแนกเพศกบทูตตัวเต็มวัยเพศผู้ มีเขี้ยวเทียม 1 คู่ มีลักษณะยาว ขึ้นมาจากบริเวณขากรรไกรล่าง (ซ้าย) และเพศเมีย มีโครงสร้างเขี้ยวเทียมที่สั้นไม่ยื่นยาวออกมา จากขากรรไกรล่าง (ขวา)	5
ภาพที่ 3: ลักษณะทางสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ของกบทูต <i>Limnonectes blythii</i> (A) Erythrocyte และ lymphocyte (B) Monocyte (C) Neutrophil (D) Basophil (E) Eosinophil (F) Thrombocyte	8

รายงานผลการดำเนินงาน
 ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2560

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
 สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) สุขภาวะ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตในพื้นที่ปกปัก
 พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ
 (ภาษาอังกฤษ) Health and Reproductive Biology of the Blyth's Giant
 Frog *Limnonectes blythii* in RSPG Area

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. จิรราช กิตนะ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชษฐ คนชื้อ
 รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์
 น.ส.มุกเรขา เขียวชาญชัย น.ส.ธฤชวรรณ ไตรจิตต์
 น.ส.หนึ่งฤทัย วิชัยกุล ว่าที่ร้อยตรี ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ
 นายชัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี นายสุธีโรจน์ มีสวัสดิ์
 นายรชตะ มณีอินทร์ นายเพชร สิริชีวะภาค
 น.ส. ยุภาพร วิสูตร น.ส.ฤดีมาศ บุตรศิริ
 นายวรภัทร สวัสดิ์วงศ์ น.ส.ปิ่นมณีส นนท์นา
 น.ส.ณัฏฐา มธุพยนต์ น.ส.สุวิสาข์ ขอบจิตต์
 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน่วยงานสนับสนุน

- โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
 สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)
- ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ
 ต.ป่าเมี่ยง อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่

1. บทนำ

พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ประกอบด้วยระบบนิเวศหลากหลายตั้งแต่ระบบนิเวศบก ระบบนิเวศน้ำจืด และระบบนิเวศทะเล ที่ยังคงสภาพอุดมสมบูรณ์ จากผลการศึกษาในภาคสนามที่ผ่านมาพบว่าหลายพื้นที่ที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกค่อนข้างสูง มีสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดสำคัญ เช่น กบทูต *Limnonectes blythii* ซึ่งเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทยและมีสถานภาพเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง และจากศักยภาพในการพัฒนาเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ทำให้กบทูตได้รับการยอมรับให้เป็นสัตว์ป่าที่เพาะพันธุ์ได้ จึงมีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเป็นสัตว์เศรษฐกิจ หรือเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ โดยคณะผู้วิจัยได้เริ่มสำรวจสุขภาพจากค่าทางโลหิตวิทยาของกบทูตในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. ตั้งแต่ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556 และในปีงบประมาณ พ.ศ. 2560-2564 วางแผนที่จะศึกษาต่อเนื่องให้ครอบคลุมด้านสุขภาพและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. เพื่อให้เข้าใจพลวัตประชากรและนิเวศสรีรวิทยาของกบทูต เพื่อการวางแผนการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในระยะยาวต่อไป

กบทูต เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีขนาดใหญ่ มีถิ่นอาศัยอยู่บริเวณป่าต้นน้ำบนภูเขาสูง อยู่ตามลำห้วยป่าดิบเฉพาะแห่ง พบได้ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย กัมพูชา ลาว และ เวียดนาม โดยในประเทศไทยมีรายงานการสำรวจพบกบทูตทางฝั่งตะวันตก ตั้งแต่ภาคเหนือจรดภาคใต้ โดยมีรายงานการพบประชากรกบทูตธรรมชาติในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จ.เชียงใหม่ กบทูต จัดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ในพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 แต่จัดเป็นสัตว์ป่าชนิดที่เพาะพันธุ์ได้ และจากขนาดตัวที่จัดได้ว่ามีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่พบในประเทศไทย จึงมีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ตลอดจนเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เพื่อปล่อยคืนสู่ธรรมชาติ

ในการศึกษารุ่นนี้ วางแผนที่จะศึกษาด้านสุขภาพและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตที่อาศัยตามธรรมชาติในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. เพื่อให้เข้าใจพลวัตประชากรและนิเวศสรีรวิทยาของกบทูต เพื่อการวางแผนการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ในระยะยาวต่อไป

2. วัตถุประสงค์

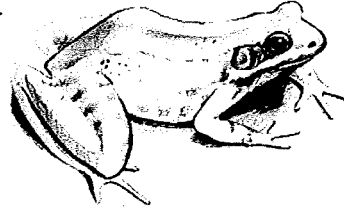
สำรวจสุขภาพและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตที่อาศัยในพื้นที่ของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บข้อมูลเกี่ยวกับสภาวะและชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูต ในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. ได้แก่ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นพื้นที่ที่สามารถสำรวจพบประชากรกบทูตตามธรรมชาติตลอดทั้งปี การศึกษาคั้งนี้มุ่งเน้นการประเมินปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่บ่งบอกสภาวะเบื้องต้น และ ข้อมูลทางชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูตที่ใช้พื้นที่โครงการ อพ.สธ. ดังนี้

ปัจจัยทางกายภาพ		สภาวะของกบทูต
- อุณหภูมิ/ความชื้น อากาศ	→	- โลหิตวิทยา
- ปริมาณน้ำฝน	→	- ภาวะเจริญพันธุ์
- การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม	→	- ชีววิทยาการสืบพันธุ์



ข้อมูลด้านนิเวศรีวิทยาเหล่านี้สามารถนำมาใช้บ่งบอกการดำรงชีวิตของกบทูตในธรรมชาติและเมื่อเก็บรวบรวมอย่างต่อเนื่องจะเป็นประโยชน์ต่อการติดตามตรวจสอบสภาวะในระยะยาว เพื่อใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพในพื้นที่โครงการ อพ.สธ. อย่างยั่งยืน ตลอดจนนำไปสู่การพัฒนาการเป็นสัตว์เศรษฐกิจต่อไป

3.2 วิธีการศึกษา

- 3.2.1 สำรวจประชากรของกบทูตในพื้นที่โครงการฯ บันทึกข้อมูลของสัตว์ที่พบแต่ละตัวเกี่ยวกับ เพศ ขนาด น้ำหนัก และลักษณะสัณฐานวิทยา
- 3.2.2 บันทึกพิกัดภูมิศาสตร์ ข้อมูลนิเวศวิทยาและลักษณะของถิ่นอาศัยย่อยของบริเวณที่พบ
- 3.2.3 เก็บข้อมูลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิสิ่งแวดล้อม
- 3.2.4 เก็บตัวอย่างเลือดของกบทูต เพื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางโลหิตวิทยาของเนื้อเยื่อเลือด เช่น ค่า PCV (Packed cell volume) จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง และ จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อใช้ประเมินสภาวะโดยรวมของสัตว์ในธรรมชาติ
- 3.2.5 นำตัวอย่างเลือดมาปั่นแยกเพื่อเก็บน้ำเลือดมาตรวจสอบระดับฮอร์โมนที่สัมพันธ์กับความเครียด (corticosterone) ในห้องปฏิบัติการ
- 3.2.6 เก็บข้อมูลลักษณะสัณฐานและกายวิภาคที่เกี่ยวข้องกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบทูต เช่น จุดกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
- 3.2.7 วิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาในภาคสนาม และสรุปผลการศึกษา

4. สถานที่ทำการศึกษา

สำรวจภาคสนามและเก็บข้อมูลทางกายภาพและชีวภาพในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ (ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ. ดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่) และนำตัวอย่างมาศึกษาเพิ่มเติมที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

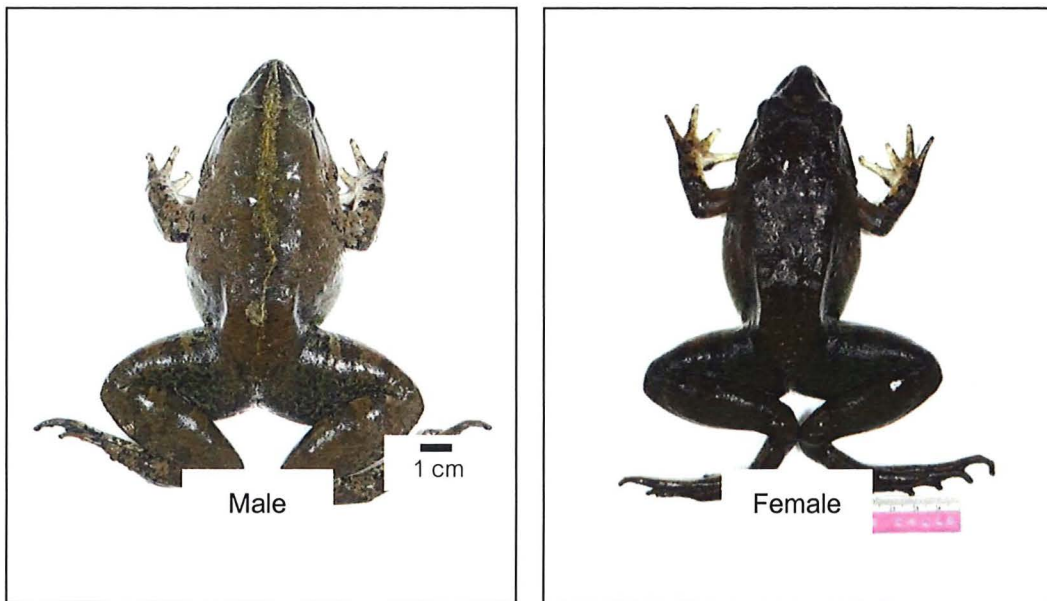
5. สัตว์ทดลอง

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “สุขภาวะ และชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกบหู *Limnonectes blythii* ในพื้นที่ปกปักพันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ” ซึ่งได้รับอนุญาตให้ทำการประมงเพื่อประโยชน์ทางวิชาการจากกรมประมง (หนังสืออนุญาตเลขที่ 13/2559 ลงวันที่ 26 ตุลาคม 2559) และขั้นตอนในการกระทำต่อสัตว์ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการการควบคุมดูแล การเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Animal Use Protocol Number 1723006)

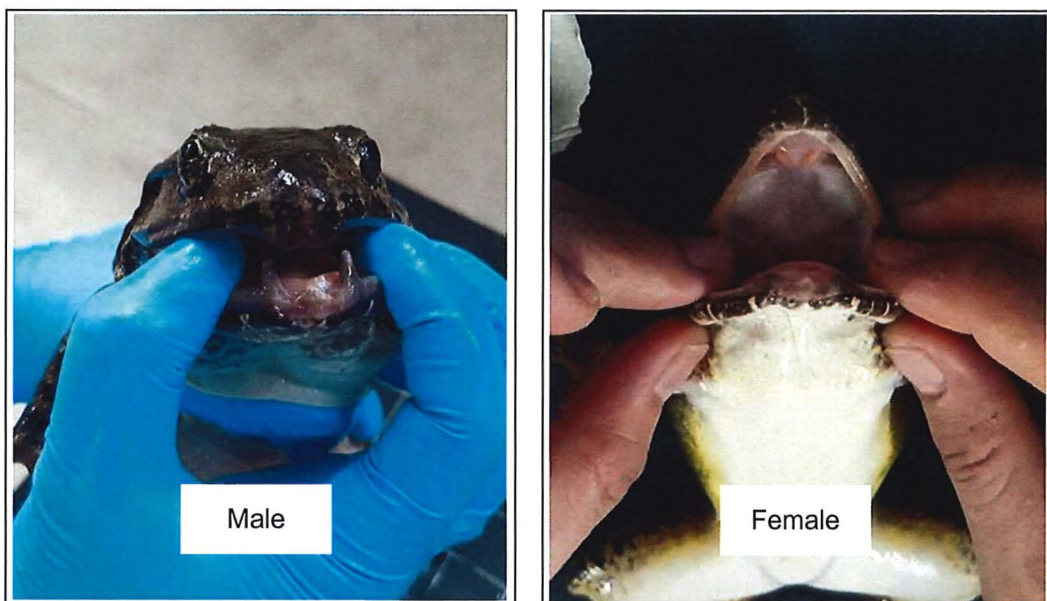
6. ผลการศึกษา

6.1 การสำรวจภาคสนาม

การสำรวจภาคสนามที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ พบกบหูอาศัยอยู่ในพื้นที่ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นป่าเบญจพรรณที่มีความอุดมสมบูรณ์ อยู่บนภูเขาที่มีลำธารน้ำผ่าน การสำรวจโดยวิธี visual encounter survey เพื่อเก็บตัวอย่างกบหู ทำในช่วงเดือนมกราคม (ฤดูแล้งหนาว) เดือนเมษายน (ฤดูแล้งร้อน) และเดือนสิงหาคม (ฤดูฝน) ปี พ.ศ. 2560 พบกบหูทั้งสิ้น 14 ตัว สังเกตจากลักษณะภายนอกและขนาดตัวของกบหูที่สำรวจพบส่วนใหญ่เป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ ไม่มีบาดแผลหรือลักษณะภายนอกที่แสดงว่าเป็นโรค



ภาพที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานของกบทูต *Limnodynastes blythii* ตัวเต็มวัยเพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา) ที่สำรวจพบในพื้นที่ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานที่ใช้จำแนกเพศกบทูตตัวเต็มวัยเพศผู้ มีเขี้ยวเทียม 1 คู่ มีลักษณะยาวขึ้นมาจากบริเวณขากรรไกรล่าง (ซ้าย) และเพศเมีย มีโครงสร้างเขี้ยวเทียมที่สั้นไม่ยื่นยาวออกมาจากขากรรไกรล่าง (ขวา)

6.2 สันฐานวิทยาของกบทูต *Limnonectes blythii*

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างกบทูตในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560 ได้กบทูตทั้งสิ้น 14 ตัว ซึ่งสามารถจำแนกเพศจากลักษณะภายนอกได้ แบ่งเป็นเพศผู้ 7 ตัว เพศเมีย 4 ตัว และวัยก่อนเจริญพันธุ์ (juvenile) 3 ตัว สำหรับกบทูตตัวเต็มวัย สามารถแยกเพศได้จากลักษณะ secondary sexual character ที่สังเกตเห็นจากภายนอกคือ เพศผู้มีขนาดใหญ่ มีโครงสร้างเขี้ยวเทียม (odontoid) 1 คู่ ยื่นยาวขึ้นมาจากขากรรไกรล่าง เห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 2) ส่วนเพศเมียมีขนาดเล็กกว่า และมีเขี้ยวเทียมสั้น ไม่ยื่นยาวขึ้นมาจากขากรรไกรล่าง เห็นเป็นตุ่มขนาดเล็ก

ข้อมูลขนาดทางสันฐานวิทยา และน้ำหนักตัวแสดงในตารางที่ 1 และมีคำอธิบายตัวอักษรย่อ ดังนี้

Body Wt = น้ำหนักตัว (body weight)

SVL = ความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้น (snout-vent length)

จากข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักตัว (Mean \pm SD Body Wt) และความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้น (Mean \pm SD SVL) ของกบทูตแต่ละเพศ ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ข้อมูลสันฐานวิทยาของกบทูต *Limnonectes blythii* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560

หมายเลข	เดือน	เพศ/วัย	Body Wt (g)	SVL (mm)
LB001	มกราคม	Male	255	136.44
LB002	มกราคม	Male	235	128.46
LB003	มกราคม	Male	225	130.98
LB004	มกราคม	Male	160	123.71
LB005	มกราคม	Male	400	158.66
LB006	มกราคม	Female	230	138.06
LB007	เมษายน	Male	420	152.77
LB008	เมษายน	Female	225	129.37
LB009	เมษายน	Female	170	115.21
LB010	เมษายน	Juvenile	95	94.97
LB011	สิงหาคม	Male	400	158.08
LB012	สิงหาคม	Female	205	135.76
LB013	สิงหาคม	Juvenile	40	77.97
LB014	สิงหาคม	Juvenile	50	85.95

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของน้ำหนักตัว และความยาวจากปลายจมูกถึงรู้งันของ กบหูต *Limnnectes blythii* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560

เพศ	Mean±SD Body Wt (g)	Mean±SD SVL (mm)
Male (n=7)	299 ± 105	141.30 ± 14.83
Female (n=4)	208 ± 27	129.60 ± 10.27
Juvenile (n=3)	62 ± 29	86.30 ± 8.51

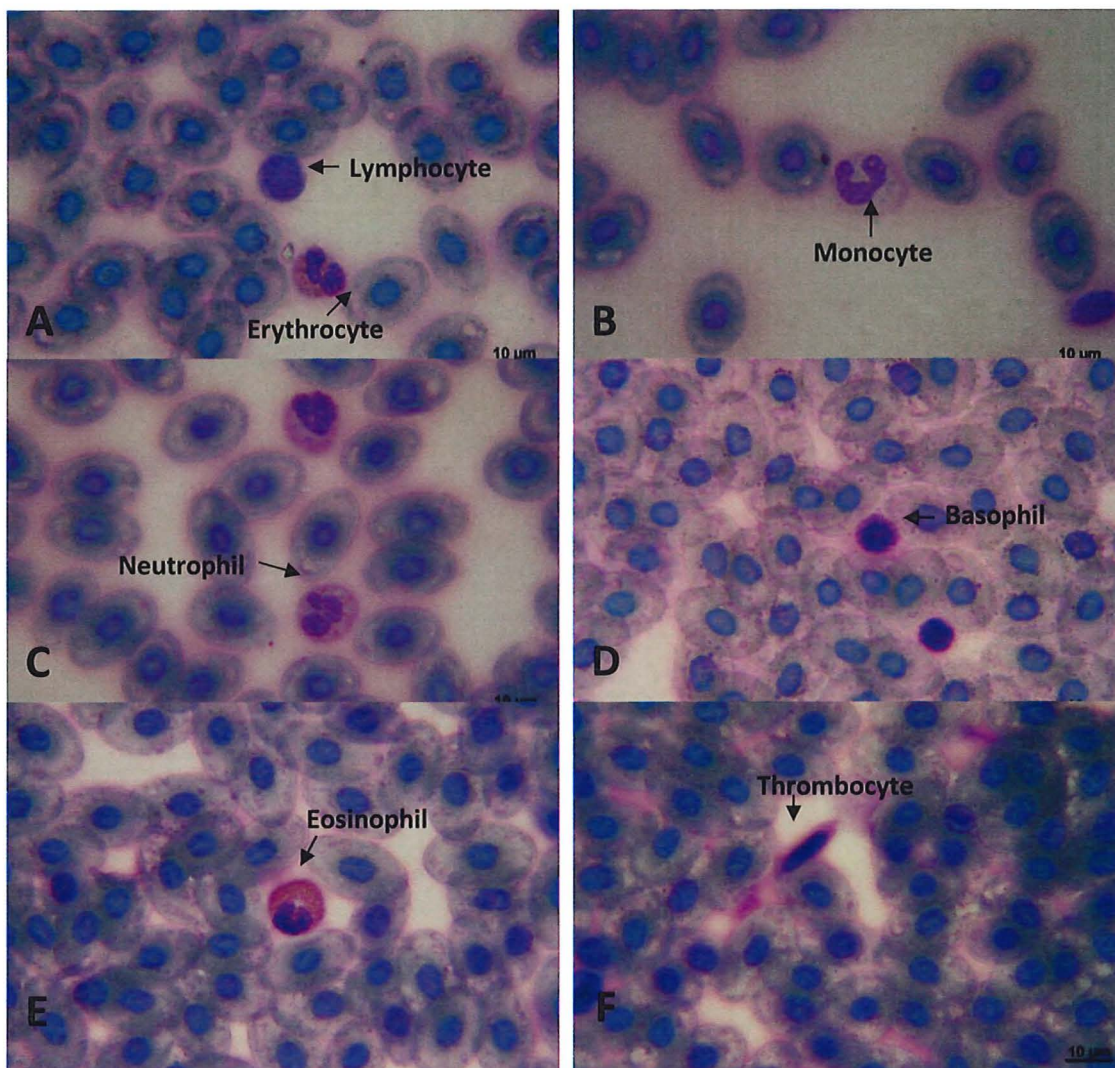
จากข้อมูลทางสัณฐานที่ได้จากการเก็บตัวอย่างกบหูต 2 ฤดูกาลนี้ ทำให้ทราบในเบื้องต้นถึง น้ำหนักและขนาดตัวโดยเฉลี่ยของกบหูตในพื้นที่ตามธรรมชาติ ของศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ กบหูตเพศผู้มีน้ำหนักตัวและความยาวจากปลายจมูกถึงรู้งันโดยเฉลี่ยมากกว่าเพศเมีย แต่ทั้งนี้ยังต้องมีการเก็บข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อให้ได้จำนวนมากขึ้นและได้ข้อสรุปที่ชัดเจนขึ้น

6.3 โลหิตวิทยาของกบหูต *Limnnectes blythii*

จากการเก็บตัวอย่างเลือดของกบหูตมาศึกษาทางโลหิตวิทยาในห้องปฏิบัติการ พบว่ากบหูตทั้งเพศผู้ เพศเมีย และ juvenile มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดออกเป็น เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) ทромโบไซต์ (thrombocyte) และเซลล์เม็ดเลือดขาว 5 ชนิด ได้แก่ โมโนไซต์ (monocyte) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) นิวโทรฟิล (neutrophil) อีโอสิโนฟิล (eosinophil) และเบโซฟิล (basophil) ลักษณะพื้นฐานดังแสดงในภาพที่ 3 และมีค่าเฉลี่ย PCV ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย PCV และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกบหูต *Limnnectes blythii* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติในบริเวณศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ ในเดือนมกราคม เดือนเมษายน และเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2560

เพศ	Mean PCV (%)	SD
Male (n=7)	27.07	7.01
Female (n=4)	19.50	10.12
Juvenile (n=3)	19.83	3.40



ภาพที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ของกบหูต *Limnonectes blythii* (A) Erythrocyte และ lymphocyte (B) Monocyte (C) Neutrophil (D) Basophil (E) Eosinophil (F) Thrombocyte

Giemsa stain; bar = 10 µm

เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) ของกบทูต มีรูปร่างทรงรี มีนิวเคลียสรูปร่างรีตามรูปร่างของเซลล์ มีตำแหน่งอยู่กลางเซลล์ ย้อมติดสีม่วงเข้ม ไฮโทพลาสซึมติดสีเทาจาง มีปริมาณมาก มีโครงสร้างคล้าย vesicle ใสอยู่ภายในไฮโทพลาสซึม (ภาพที่ 3A)

จากการจัดจำแนกโดยอาศัยสัณฐานวิทยาขององค์ประกอบเซลล์ นิวเคลียส ไฮโทพลาสซึม และ cytoplasmic granule พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวของกบทูตที่พบในการศึกษาค้างนี้มี 5 ชนิด ได้แก่ ลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) โมโนไซต์ (Monocyte) นิวโทรฟิล (Neutrophil) อีโอสิโนฟิล (Eosinophil) และเบโซฟิล (Basophil) เซลล์แต่ละชนิดมีลักษณะสัณฐานจำเพาะดังต่อไปนี้

เซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ (Lymphocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม agranulocyte ไม่มีแกรนูลภายในไฮโทพลาสซึม เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก มีนิวเคลียสกลม โคโรมาตินหนาแน่นย้อมติดสีม่วงเข้ม ใหญ่เกือบเต็มเซลล์ นิวเคลียสอยู่ในตำแหน่งกลางเซลล์ มีไฮโทพลาสซึมน้อยมาก ย้อมติดสีม่วงอมน้ำเงินจาง (ภาพที่ 3A)

เซลล์เม็ดเลือดขาวโมโนไซต์ (Monocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม agranulocyte ไม่มีแกรนูลภายในไฮโทพลาสซึม เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสรูปร่างรี หรือรูปถั่ว หรืออาจพบเป็นรูปตัว U ตำแหน่งเอียงไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไม่อยู่กลางเซลล์ มีปริมาณไฮโทพลาสซึมมาก ย้อมติดสีม่วงจาง (ภาพที่ 3B)

เซลล์เม็ดเลือดขาวนิวโทรฟิล (Neutrophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม granulocyte แต่สังเกตเห็นแกรนูลได้ไม่ชัดเจนในระดับที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เซลล์มีรูปร่างกลม มีลักษณะเด่นคือ มีนิวเคลียสหลายพู อยู่ค่อนข้างกลางเซลล์ ไฮโทพลาสซึมย้อมติดสีม่วงจาง (ภาพที่ 3C)

เซลล์เม็ดเลือดขาวเบโซฟิล (Basophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม granulocyte ที่สังเกตเห็นแกรนูลได้ชัดเจน ระดับที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะเห็นแกรนูลขนาดใหญ่ รูปร่างค่อนข้างกลม ย้อมติดสีม่วงเข้ม กระจายเต็มไฮโทพลาสซึม เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเล็กกว่านิวโทรฟิล และใหญ่กว่าลิมโฟไซต์เล็กน้อย นิวเคลียสคล้ายมีรูปร่างกลมอยู่กลางเซลล์ แต่เห็นไม่ชัดเจนเนื่องจากถูกแกรนูลบัง (ภาพที่ 3D)

เซลล์เม็ดเลือดขาวอีโอสิโนฟิล (Eosinophil) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกลุ่ม granulocyte ที่สามารถสังเกตเห็นแกรนูลได้ชัดเจน ในระดับที่ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะเห็นแกรนูลรูปร่างกลม ย้อมติดสีแดงอมส้ม กระจายเต็มไฮโทพลาสซึม เซลล์มีรูปร่างกลม มีนิวเคลียส 2 พู อยู่เอียงชิดขอบด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (ภาพที่ 3E)

นอกจากเซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ แล้ว ในกบทูตยังพบ thrombocyte (Thrombocyte) เป็นเซลล์มีรูปร่างรีคล้ายกระสวย มีนิวเคลียสรูปร่างรี โคโรมาตินหนาแน่นย้อมติดสีม่วงเข้ม อยู่กลางเซลล์ ไฮโทพลาสซึมย้อมติดสีม่วงจางสังเกตเห็นชัดที่หัวและท้ายเซลล์ (ภาพที่ 3F)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดแต่ละชนิดของกบทูต *L. blythii* มีลักษณะพื้นฐานคล้ายคลึงกับที่เคยมีรายงานไว้ในกบชนิดอื่นๆ (Claver and Quaglia, 2009; Meesawat et al., 2016) โดยไม่พบลักษณะสัณฐานเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติ และไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด heterophil ซึ่งเป็น acidophil ที่มีแกรนูลสีแดงรูปร่างกระสวย ในกลุ่มประชากรกบทูตที่ศึกษา

7. สรุปผลการศึกษา

ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.ดอยสะเก็ด จ.เชียงใหม่ เป็นหนึ่งในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ที่ได้รับการฟื้นฟูจนมีสภาพระบบนิเวศที่อุดมสมบูรณ์ เป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์สำคัญหลายชนิด รวมทั้งกบทูต *Limnonectes blythii* ซึ่งเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง ในพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 จากการสำรวจภาคสนามด้วยวิธี visual encounter survey ในฤดูแล้วหนาว (เดือนมกราคม) ฤดูแล้งร้อน (เดือนเมษายน) และฤดูฝน (เดือนสิงหาคม) ปี พ.ศ. 2560 พบกบทูตเพศผู้ 7 ตัว เพศเมีย 4 ตัว และกบทูตก่อนวัยเจริญพันธุ์ (juvenile) 3 ตัว รวมทั้งหมด 14 ตัว ทั้งหมดมีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ ไม่พบแผลหรือการติดเชื้อที่ผิวหนังใดๆ โดยเพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย โดยมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและ SVL เท่ากับ 299 ± 105 กรัม และ 141.30 ± 14.83 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เพศเมียมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวและ SVL เท่ากับ 208 ± 27 กรัม และ 129.60 ± 10.27 มิลลิเมตร ตามลำดับ

จากการศึกษาทางโลหิตวิทยา กบทูตเพศผู้มีค่าเฉลี่ยเซลล์เม็ดเลือดอัดแน่นหรือค่า PCV เท่ากับ 27.07 ± 7.01 % สูงกว่าเพศเมีย ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.50 ± 10.12 % กบทูตทั้งเพศผู้ เพศเมีย และ juvenile มีลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ ไม่แตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกเซลล์เม็ดเลือดออกเป็น เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) ทромโบไซต์ (thrombocyte) และเซลล์เม็ดเลือดขาว 5 ชนิด ได้แก่ โมโนไซต์ (monocyte) ลิมโฟไซต์ (lymphocyte) นิวโทรฟิล (neutrophil) อีโอสิโนฟิล (eosinophil) และเบโซฟิล (basophil) โดยไม่พบลักษณะสัณฐานเซลล์เม็ดเลือดที่ผิดปกติ

ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา และโลหิตวิทยาของกบทูตที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยา และสุขภาพของกบชนิดนี้ในธรรมชาติ เพื่อการวางแผนอนุรักษ์ต่อไปในอนาคต

8. เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 2546. กฎกระทรวงกำหนดให้สัตว์ป่าบางชนิดเป็นสัตว์ป่าคุ้มครอง พ.ศ.2546
- Claver, J.A. and Quaglia, A.I.E. 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18: 87-97.
- van Dijk, P.P. and Iskandar, D. 2004. *Limnonectes blythii*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. International Union for Conservation of Nature. Retrieved 1 March 2015.
- Emerson, S.B., Carroll, L. and Hess, D.L. 1997. Hormonal induction of thumb pads and the evolution of secondary sexual characteristics of the Southeast Asian fanged frog, *Rana blythii*. *Journal of Experimental Zoology* 279: 587-596.
- Gross, W.B. and Siegel, H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases* 27: 972-979.
- Meesawat, S., Kitana, N. and Kitana, J. 2016. Hematology of wild caught *Hoplobatrachus rugulosus* in northern Thailand. *Asian Herpetological Research* 7: 131-138.
- Natt, M.P. and Herrick, C.A. 1952. A new blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poultry Science* 31: 735-738.
- Tharp, G.D. and Woodman, D.A. 2002. *Experiments in Physiology*, 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. pp. 211-235.