

ภาวะสองรูปแบบทางเพศและวงรอบการสืบพันธุ์ในรอบปีของตะพานน้ำ

Amyda cartilaginea

นายนพดล กิตนะ



สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-784-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**SEXUAL DIMORPHISM AND ANNUAL REPRODUCTIVE CYCLE OF
COMMON ASIATIC SOFTSHELL TURTLE *Amyda cartilaginea***



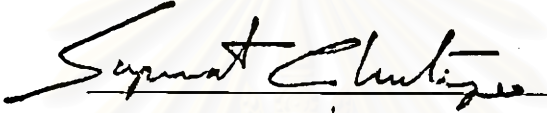
Mr. Noppadon Kitana

**สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology

**Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997
ISBN 974-638-784-7**


Thesis Title Sexual dimorphism and annual reproductive cycle of
 common asiatic softshell turtle *Amyda cartilaginea*
By Mr. Noppadon Kitana
Department Biology
Thesis Advisor Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree



(Professor Supawat Chutivongse, M.D.) Dean of Graduate School


THESIS COMMITTEE



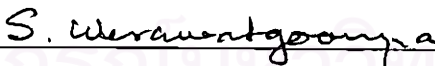
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.) Chairman



(Associate Professor Vithaya Yodyingyuad, Ph.D.) Thesis Advisor



(Assistant Professor Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.) Thesis Co-advisor



(Associate Professor Sukanya Werawatgoompa, Ph.D.) Member

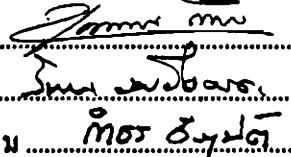
นพดล กิตนะ: ภาวะสองรูปแบบทางเพศและวงรอบการสืบพันธุ์ในรอบปีของตะพานน้ำ *Amyda cartilaginea*
(SEXUAL DIMORPHISM AND ANNUAL REPRODUCTIVE CYCLE OF COMMON ASIATIC
SOFTSHELL TURTLE *Amyda cartilaginea*) อาจารย์ที่ปรึกษา: รศ.ดร.วิทยา ขย่องवाद, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม:
ผศ.ดร.กำธร ชีรกุลต์; 105 หน้า. ISBN 974-638-784-7.

ศึกษาภาวะสองรูปแบบทางเพศและวงรอบการสืบพันธุ์ในรอบปีของตะพานน้ำวัยเจริญพันธุ์ จากประชากร
ตะพานน้ำที่เลี้ยงในสภาพกึ่งธรรมชาติในบ่อเต้าวัดประจวบวงศาต กรุงเทพมหานคร ในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2539 ถึง
เดือนกันยายน พ.ศ. 2540

ภาวะสองรูปแบบทางเพศพิจารณาจากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์
การถดถอยเชิงเส้นของกราฟความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าตะพานน้ำทั้งสองเพศมีความแตกต่างของ
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาหลายประการอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ลักษณะที่แตกต่างกันและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์
ได้แก่ ความกว้างหาง ความยาวหาง ตำแหน่งของช่องเปิดของทวารร่วม และขนาดลำตัว ส่วนลักษณะอื่นที่แตกต่างกันคาด
ว่ามีบทบาทเพื่อลดการแข่งกันระหว่างเพศ ได้แก่ ขนาดหัว ข้อมูลเหล่านี้บ่งชี้ว่าตะพานน้ำแสดงภาวะสองรูปแบบทางเพศ

วงรอบการสืบพันธุ์ในรอบปีพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน อิस्टราไดออก และ
โปรเจสเตอโรนในเลือด ซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิคเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ตามวิธีการขององค์การอนามัยโลก พบว่า
ตะพานน้ำทั้งสองเพศมีวงรอบการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล โดยเพศผู้มีระดับเทสโทสเตอโรนสูงในช่วงก่อนฤดูวางไข่ ส่วนเพศ
เมียมีระดับอิस्टราไดออกสูงในช่วงก่อนฤดูวางไข่ และมีระดับโปรเจสเตอโรนสูงทั้งในช่วงก่อนฤดูวางไข่ และในช่วงฤดู
วางไข่ อิस्टราไดออกและโปรเจสเตอโรนในเพศผู้ และเทสโทสเตอโรนในเพศเมียอยู่ในระดับที่สามารถตรวจสอบได้
ตลอดทั้งปี แสดงให้เห็นถึงหน้าที่ของกลุ่มฮอร์โมนข้ามเพศในตะพานน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับอิस्टราไดออกของทั้ง
สองเพศ และระดับโปรเจสเตอโรนของเพศผู้ สอดคล้องกับระดับอุณหภูมิของกรุงเทพมหานครอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)
จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตะพานน้ำมีวงรอบการสืบพันธุ์แบบก่อนผสมพันธุ์ โดยระดับฮอร์โมนเพศจะเพิ่มสูงใน
ช่วงก่อนฤดูกาลสืบพันธุ์จากนั้นจะลดลงสู่ระดับต่ำตลอดทั้งปี

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยว
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิติ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม


** C725590 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: *Amyda cartilaginea* / SEXUAL DIMORPHISM / REPRODUCTIVE CYCLE / SEX STEROIDS
NOPPADON KITANA: SEXUAL DIMORPHISM AND ANNUAL REPRODUCTIVE CYCLE OF
COMMON ASIATIC SOFTSHELL TURTLE *Amyda cartilaginea*. THESIS ADVISOR:
ASSOC. PROF. VITHAYA YODYINGYUAD, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF.
KUMTHORN THIRAKHUPT, Ph.D. 105 pp. ISBN 974-638-784-7.

Sexual dimorphism and annual reproductive cycles of mature male and female common Asiatic softshell turtles were studied in a captive population of *Amyda cartilaginea* maintained under semi-natural conditions at a temple pond at Prayurawongsawas temple, Bangkok, Thailand. The study was carried out from October 1996 to September 1997.

Sexual dimorphism was determined from mean comparison of parameters of morphological characters and regression analysis of plots of morphological characters. It was found that this softshell turtle species exhibited significant differences ($p < 0.05$) in various parameters of morphological characters. Several of these sexually dimorphic traits are related to reproductive performance, including tail width, tail length, position of cloacal opening and size. The other traits might play important roles in decreasing intersexual competition for resources, including head size. These data indicated that *Amyda cartilaginea* is sexually dimorphic.

The annual reproductive cycle was investigated from changes in levels of plasma testosterone, estradiol and progesterone. These sex steroids were detected by radioimmunoassay according to the WHO matched reagent programme. It was found that male and female softshell turtles exhibited a seasonal reproductive cycle. The males displayed high levels of testosterone in prenesting period, while the females showed a prenesting peak of estradiol and high levels of progesterone during the prenesting and perinesting period. Detectable levels of heterologous sex steroids i.e. androgens in females and estrogens in males were apparent in both sexes indicating evidence for functions of heterologous sex steroids in this softshell turtle. Plasma estradiol levels in both sexes and plasma progesterone levels in the males were well correlated ($p < 0.05$) with temperature of the Bangkok Metropolis area. The results suggest that softshell turtles exhibit a prenuptial reproductive cycle which results in rising plasma sex steroid levels prior to the mating season and decreasing to basal level at other periods of the year.

ภาควิชา.....ชีววิทยา.....

สาขาวิชา.....สัตววิทยา.....

ปีการศึกษา.....2540.....

ลายมือชื่อนิสิต.....*Mr. Noppadon*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*Vithaya yodyingyuad*.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....*K. Thirakhupt*.....



Acknowledgements

I wish to express my sincere gratitude to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Vithaya Yodyingyuad, and my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, for their invaluable suggestions, guidances, patiences, and strong encouragements throughout the study.

I am grateful to Professor Dr. Siriwat Wongsiri, chairman of thesis committee for his precious advice. I also would like to express my appreciation to Associate Professor Dr. Sukanya Werawatgoompa, for her kind suggestions in many aspects of RIA techniques as well as her valuable advice as the member of thesis committee.

I truly thank Associate Professor Dr. Usanee Yodyingyuad, Associate Professor Dr. Prakong Tangpraprutkul, for their kind guidances in many ways, and Associate Professor Dr. Wichai Cherdshewasart for his useful instructions about ultracentrifuge.

Very Special thanks are due to Dr. Suchinda Malaivijitmond for her 'Big sister' guiding role in various aspects of RIA techniques. Many thanks are due to Associate Professor Dr. Gen Watanabe, Tokyo University of Agriculture and Technology, for his valuable advices about RIA techniques.

I wish to express my grateful thank to Pra Samuha Rawee Khemmadhammo, Prayurawongsawas temple, Bangkok for the opportunity to sample softshell turtle.

I am grateful to Mr. Peter Paul van Dijk for his constructive discussion in softshell turtle biology as well as polishing my English writing. I also thank Ajarn Duangkhae Sitticharoenchai, Ajarn Varanya Aranyawalai, Mr. Thawit Poopradit and Mr. Boripat Siriaroonrat for their suggestions and assistances in many ways.

I am indebted to my friend, Ajarn Wichase Khonsue for his encouragements, supports and helping hands in many ways.

I must thank many helping hands throughout my sampling and writing period including Miss Nutcharin Klaewkla, Miss Saowanee Sematong, Miss Khanitha Karaveg, Miss Panida Laocharnwut, Miss Bangon Tangtong, Miss Chantima Piyapong, Miss Jirarach Srijan-ngam, Miss Nipada Ruenkaew, Miss Nongpal Chancharoen, Miss Duangjai Ngamsom, Miss Siriraks Arrathrakorn, Mr. Anusak Pinyopich, Mr. Adul Choungnoi, and other students in the Department of Biology, Chulalongkorn University. Many thanks are due to Mr. Tavorn, Siam University, for his expert capture and handling of the softshell turtle.

I am indebted to the Biodiversity Research and Training program for a supported research grant, the Thai Turtle research fund from Khunying Sam-angwan Lamsam for thesis preparation, the organizing committee of the XIII International Congress of Comparative Endocrinology for a travel scholarship award for attending and presenting a poster in the congress at Yokohama, Japan. Also, a two-year scholarship awarded by the University Development Committee (UDC), Ministry of University Affairs, is fully acknowledged.

I would like to dedicate all the best of my thesis to my departed father, my beloved mother, everyone in Kitana and Jearasuk families, and Miss Amornrat Chairprasongsuk for their love and understanding during my study. Finally, I would like to express my deepest gratitude to all my teachers at all levels, my success would not be possible without you.

CONTENTS

| | Page |
|--|------|
| Thai Abstract..... | iv |
| English Abstract..... | v |
| Acknowledgements..... | vi |
| Contents..... | vii |
| List of Tables..... | viii |
| List of Figures..... | ix |
| Chapter 1: Introduction..... | 1 |
| Chapter 2: Literature Review..... | 4 |
| Chapter 3: Materials and Methods..... | 21 |
| Chapter 4: Results and Discussion..... | 46 |
| Chapter 5: Conclusions and Recommendations..... | 75 |
| References..... | 77 |
| Appendix I: Chemical reagents and Instruments..... | 85 |
| Appendix II: Reagents preparation..... | 89 |
| Appendix III: Sexual dimorphism data..... | 92 |
| Appendix IV: Plasma steroids data..... | 100 |
| Biography..... | 105 |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|---|------|
| 3-1 Number of softshell turtles in each sample during October 1996 to September 1997..... | 23 |
| 3-2 Summary of contents of assay tubes in testosterone assay..... | 32 |
| 3-3 Precision of testosterone assay..... | 34 |
| 3-4 Summary of contents of assay tubes in estradiol assay..... | 37 |
| 3-5 Precision of estradiol assay..... | 39 |
| 3-6 Summary of contents of assay tubes in progesterone assay..... | 42 |
| 3-7 Precision of progesterone assay..... | 45 |
| 4-1 Mean and S.E.M. of parameters of morphological characters of <i>Amyda cartilaginea</i> | 47 |
| 4-2 Regression analysis of <i>Amyda cartilaginea</i> morphological characters and comparison of slope and elevation between sexes..... | 56 |
| 4-3 Mean steroids levels of male <i>Amyda cartilaginea</i> in each sample..... | 62 |
| 4-4 Mean steroids levels of male <i>Amyda cartilaginea</i> in each month..... | 64 |
| 4-5 Pearson's correlation coefficients relating climatic data of Bangkok Metropolis area and plasma sex steroids levels of male <i>Amyda cartilaginea</i> | 67 |
| 4-6 Mean steroids levels of female <i>Amyda cartilaginea</i> in each sample..... | 68 |
| 4-7 Mean steroids levels of female <i>Amyda cartilaginea</i> in each month..... | 70 |
| 4-8 Pearson's correlation coefficients relating climatic data of Bangkok Metropolis area and plasma sex steroids levels of female <i>Amyda cartilaginea</i> | 73 |

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|--|------|
| 2-1 Dendrogram of presumed phyletic relationships among the living families of turtles..... | 4 |
| 2-2 <i>Amyda cartilaginea</i> | 6 |
| 2-3 Carapace and plastron of <i>Amyda cartilaginea</i> | 7 |
| 2-4 Distribution of <i>Amyda cartilaginea</i> | 8 |
| 2-5 Three reproductive patterns exhibited in vertebrates..... | 14 |
| 3-1 General view of turtle pond at Prayurawongsawas temple, Bangkok, Thailand..... | 21 |
| 3-2 Climatic data of Bangkok Metropolis area during October 1996 to September 1997..... | 22 |
| 3-3 Eighteen morphological characters that were measured for the study of sexual dimorphism | 25 |
| 3-4 Parallelism of immunoreactivities of human testosterone standard and serial dilutions of softshell turtle plasma..... | 33 |
| 3-5 Parallelism of immunoreactivities of human estradiol standard and serial dilutions of softshell turtle plasma..... | 38 |
| 3-6 Parallelism of immunoreactivities of human progesterone standard and serial dilutions of softshell turtle plasma..... | 44 |
| 4-1 Linear regression lines relating bony disc length 1 to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 48 |
| 4-2 Linear regression lines relating bony disc length 2 to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 48 |
| 4-3 Linear regression lines relating carapace width to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 49 |
| 4-4 Linear regression lines relating plastron length 1 to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 49 |
| 4-5 Linear regression lines relating plastron length 2 to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 50 |
| 4-6 Linear regression lines relating plastron width to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 50 |
| 4-7 Linear regression lines relating height to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 51 |
| 4-8 Linear regression lines relating plastron to rear margin of carapace to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 51 |

LIST OF FIGURES (cont.)

| Figure | Page |
|---|------|
| 4-9 Linear regression lines relating plastron to cloaca to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 52 |
| 4-10 Linear regression lines relating tailbase to cloaca to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 52 |
| 4-11 Linear regression lines relating cloaca to tail tip to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 53 |
| 4-12 Linear regression lines relating tail length to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 53 |
| 4-13 Linear regression lines relating cloaca to tail width to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 54 |
| 4-14 Linear regression lines relating cloaca to head length without snout to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 54 |
| 4-15 Linear regression lines relating head length with snout to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 55 |
| 4-16 Linear regression lines relating head width to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 55 |
| 4-17 Linear regression lines relating head height to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 56 |
| 4-18 Linear regression lines relating weight to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 56 |
| 4-19 Linear regression lines relating tail length beyond carapace to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 57 |
| 4-20 Linear regression lines relating CW-PW to carapace length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 57 |
| 4-21 Linear regression lines relating tailbase to cloaca to tail length of <i>Amyda cartilaginea</i> ($p < 0.05$)..... | 58 |
| 4-22 Plasma steroids profile of male <i>Amyda cartilaginea</i> in each sample..... | 63 |
| 4-23 Monthly plasma steroids profile of male <i>Amyda cartilaginea</i> | 65 |
| 4-24 Plasma steroids profile of female <i>Amyda cartilaginea</i> in each sample.... | 69 |
| 4-25 Monthly plasma steroids profile of female <i>Amyda cartilaginea</i> | 71 |