



โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ จุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) ในระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส

Microanatomy of gonad structure of Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) at complete metamorphosis

ชื่อนิสิต นายสุรเชษฐ เกียรติชูพัฒน์ เลขประจำตัว 5932053823

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *Duttaphrynus melanostictus*
(Schneider, 1799) ในระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส

Microanatomy of gonad structure of Asian common toad
Duttaphrynus melanostictus (Schneider, 1799) at complete metamorphosis

นายสุรเชษฐ์ เกียรติชูพิพัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ : จุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน
Duttaphrynus melanostictus (Schneider, 1799)
ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ : นายสุรเชษฐ์ เกียรติชูพัฒนา
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ
ภาควิชา : ชีววิทยา

บทคัดย่อ

คางคกบ้าน *Duttaphrynus melanostictus* มีการกระจายพันธุ์ทั่วไปเป็นวงกว้าง มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย และมีขนาดประชากรใหญ่ จึงทำให้สามารถแพร่กระจาย และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว แต่การศึกษาเกี่ยวกับจุลกายวิภาคและการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกยังมีอยู่จำกัด ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และรูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศของคางคกบ้านในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส โดยการเก็บตัวอย่างลูกอ๊อดคางคก จำนวน 30 ตัว จากแหล่งน้ำภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในเดือนตุลาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2562 เมื่อถึงระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิสหลัง การรุมขบและนำมาตรวจสอบระยะการเจริญทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอตามระบบของ Gosner (1960) และบันทึกข้อมูลเบื้องต้น ได้แก่ ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร และบันทึกภาพลักษณะภายนอกด้วยกล้องถ่ายภาพ รักษาสภาพทั้งตัว นำเนื้อเยื่อมาทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin Method และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin แล้วนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการศึกษาพบว่า อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ *D. melanostictus* ทั้งหมดในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิสเป็น indifferent gonad ที่อยู่ในช่วงของการสร้าง genital ridge ลักษณะสำคัญที่พบ ได้แก่ เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการแยกออกเป็น 2 ชั้น ได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นใน และเนื้อเยื่อชั้นนอก อีกทั้งยังสามารถสังเกตเห็น primordial germ cell ปรากฏอยู่บริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอก ซึ่งโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะดังกล่าว ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ จึงไม่สามารถระบุได้ว่ารูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศของคางคกชนิดนี้เป็นรูปแบบใด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ไม่ได้มีการติดตามการเจริญภายหลังระยะดังกล่าว ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันถึงรูปแบบของการเจริญเพื่อแยกเพศที่แน่ชัดในคางคกบ้าน จึงควรมีการศึกษาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะหลังสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิสในงานวิจัยต่อไป

คำสำคัญ: อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์, จุลกายวิภาคศาสตร์, คางคกบ้าน, *Duttaphrynus melanostictus*

Research Title : Microanatomy of gonad structure of Asian common toad
Duttaphrynus melanostictus (Schneider, 1799) at
complete metamorphosis

Student name : Mr. Suracheth Kiatchupipat

Advisor : Assistant Professor Jirarach Kitana, Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* is widely distributed and has tolerance to several kinds of habitats. It has a large population and spreads rapidly. However, there's a lack of information about microanatomy and development of gonad in bufonids. This study aims to examine the microanatomy of gonad and pattern of sex differentiation in Asian common toad at complete metamorphosis stage. In October and November 2019, tadpoles were collected from a pond in Chulalongkorn University when they reached complete metamorphosis, 30 froglets were euthanized. After euthanasia, samples were identified the stage of development by morphology according to Gosner (1960) under a stereomicroscope and measured for snout-to-vent length (SVL). Then, the sample was photographed, fixed, preserved, and processed by Paraffin Method and stained with Hematoxylin and Eosin. After that, the tissue was observed under a light microscope. The result showed that all gonads of *D. melanostictus* at complete metamorphosis stage were indifferent gonads in the period of genital ridge formation. In this stage, tissue of the indifferent gonads composed of 2 layers including medulla and cortex. Primordial germ cells located in the cortex layer. From the result of gonad structure, there were still in undifferentiated phase. Therefore, the pattern of sex differentiation in this species cannot be identified at complete metamorphosis stage. However, in this study, the samples after complete metamorphosis have not been observed. To confirm the pattern of sex differentiation in this species, studying of the gonad after complete metamorphosis is needed in further study.

Keywords: Gonad, Histology, Asian common toad, *Duttaphrynus melanostictus*

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรารัช กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ให้ความกรุณาในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตั้งแต่เริ่มหาข้อมูลสำหรับหัวข้องานวิจัย แนวทางการวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ตลอดจนให้ความช่วยเหลือระหว่างการศึกษาวิจัยในสภาวะวิกฤตโควิด-19 ทำให้การศึกษาดังกล่าวสำเร็จลุล่วงและมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ที่ให้ทุนสนับสนุนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ดี

ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ภาณุพงศ์ ธรรมโชติ ที่ช่วยให้คำแนะนำเกี่ยวกับคางคกบ้านทั้งในภาคสนามและการเลี้ยงลูกอ๊อดคางคก รวมไปถึงให้ความช่วยเหลือในการศึกษาลักษณะทางสัณฐาน ทำให้งานวิจัยมีความสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณนางสาวธฤชวรรณ ไตรจิตต์ ที่ช่วยให้คำปรึกษาและการช่วยเหลือตลอดการทำวิจัยดังกล่าว ทั้งคำแนะนำจากประสบการณ์ในการทำงานวิจัยเกี่ยวกับเรื่องการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ การเก็บตัวอย่าง รวมไปถึงเทคนิคต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานทางเนื้อเยื่อ ตลอดจนให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนายธงชัย ธิติภูรี ที่ช่วยสอนเกี่ยวกับการปฏิบัติงานทางด้านเนื้อเยื่อในทุกขั้นตอน รวมไปถึงคำแนะนำตั้งแต่ช่วงเริ่มการวางแผนในการดำเนินงานจนทำให้งานวิจัยนี้ได้ผลสำเร็จ

ขอขอบคุณนางสาวอรยา อรรถจินดา, นายณัฐดนัย แต่งแดน, นางสาวณัฐนิชา พลายงาม และนางสาวธัญลักษณ์ บุญสร้าง รวมทั้งสมาชิก Biosentinel Laboratory ทุกคน ที่คอยช่วยเหลือกันในหลาย ๆ ด้าน อีกทั้งยังให้กำลังใจที่ดีต่อกันเสมอมาตลอดระยะเวลาการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเนื้อเยื่อและไมโครเทคนิค-ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ รวมไปถึงอุปกรณ์และสารเคมี

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันท์เพ็ญ จันท์เจ้า, อาจารย์ พงษ์ชัย ดำรงโรจนวัฒนา และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2562 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และครอบครัวที่คอยห่วงใย และเป็นกำลังใจที่ดีให้กันเสมอมาจนกระทั่งงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1. คางคกบ้าน <i>Duttaphrynus melanostictus</i> (Schneider, 1799).....	3
2.2. รูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศ (sex differentiation).....	5
2.3. การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ Bidder's organ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก... 6	
2.3.1. <u>การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์</u>	6
2.3.2. <u>การเจริญของ Bidder's organ</u>	7
2.4. ระยะเวลาการเจริญตามสัณฐานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก.....	7
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	11
3.1. การเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง.....	11
3.2. การตรวจสอบระยะเวลาการเจริญทางสัณฐาน.....	12
3.3. การทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin Method.....	13
3.3.1. <u>การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing)</u>	13
3.3.2. <u>การตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (sectioning)</u>	14
3.3.3. <u>การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ (staining)</u>	15
3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล.....	16
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	17
4.1. การตรวจสอบระยะเวลาการเจริญทางสัณฐาน.....	17
4.1.1. <u>ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Gosner (1960)</u>	17
4.1.2. <u>ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL)</u>	18
4.2. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ Bidder's organ.....	19

4.2.1. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์.....	19
4.2.2. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ.....	30
4.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ	39
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา.....	47
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	50
6.1. สรุปผลการศึกษา.....	50
6.2. ข้อเสนอแนะ.....	50
6.2.1. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์</u>	50
6.2.2. <u>ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต</u>	50
เอกสารอ้างอิง.....	52
ภาษาอังกฤษ.....	52
ภาคผนวกที่ 1 สูตรการเตรียมสารเคมีและสีย้อม.....	56

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 การเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงชีวิตของคางคกบ้าน <i>D. MELANOSTICTUS</i>	5
ตารางที่ 4-1 ข้อมูลความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (SNOUT VENT LENGTH, SVL) ของคางคกบ้าน <i>D. MELANOSTICTUS</i> ระยะเวลาสิ้นสุดเมทามอร์โฟซิส	19
ตารางที่ 4-2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน <i>D. MELANOSTICTUS</i> ที่ระยะเวลาสิ้นสุดเมทามอร์โฟซิส	21
ตารางที่ 4-3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน <i>D. MELANOSTICTUS</i> ที่ระยะเวลาสิ้นสุดเมทามอร์โฟซิส	32
ตารางที่ 4-4 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน <i>D. MELANOSTICTUS</i>	40

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 *DUTTAPHRYNUS MELANOSTICTUS* (SCHNEIDER, 1799) (O'SHEA, 2011).... 3

ภาพที่ 2-2 แผนที่แสดงการกระจายของคางคกบ้าน *D. MELANOSTICTUS* 4

ภาพที่ 2-3 คางคกบ้าน *D. MELANOSTICTUS* ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส 4

ภาพที่ 2-4 รูปแบบการกำหนดเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (ดัดแปลงจาก EGGERT, 2004)
..... 6

ภาพที่ 2-5 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และ BIDDER'S ORGAN ในสัตว์สะเทินน้ำ
สะเทินบก (ดัดแปลงจาก ALTIG AND MCDIARMID, 1999)..... 8

ภาพที่ 2-6 ระยะเวลาเจริญทางสัณฐานของลูกอ๊อด จำแนกตามระบบของ GOSNER (1960).... 9

ภาพที่ 3-1 พื้นที่แหล่งน้ำในการเก็บตัวอย่าง บริเวณคณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 11

ภาพที่ 3-2 ตัวอย่างลูกอ๊อดคางคกในแหล่งน้ำ บริเวณคณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
..... 12

ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วย PARAFFIN METHOD ตามวิธีมาตรฐาน ... 13

ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการติดชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับการทำให้ INDEX SLIDE และ SERIAL SLIDE 14

ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการย้อมสี HEMATOXYLIN และ EOSIN สำหรับศึกษาจุลกายวิภาคของ
อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. MELANOSTICTUS*..... 15

ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะที่ 46 ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำภายในจุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย 18

ภาพที่ 4-2 เปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคที่พบของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ
คางคกบ้าน *D. MELANOSTICTUS* ในช่วงการเกิด GENITAL RIDGE (ลูกครีสีดำ);
ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง INDIVIDUAL NUMBER; PGC = PRIMORDIAL GERM
CELL; CX = CORTEX; M = MEDULLA 20

ภาพที่ 4-3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน 25

ภาพที่ 4-4 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน 26

ภาพที่ 4-5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน 27

ภาพที่ 4-6 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน 28

ภาพที่ 4-7 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน 29

ภาพที่ 4-8 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐาน (ซ้าย) กับลักษณะทางจุลกายวิภาค (ขวา)..... 30

- ภาพที่ 4-9 เปรียบเทียบขนาดและลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ที่พบใน
คางคกบ้าน *D. MELANOSTICTUS* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้าย
แสดง INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; OC = OOCYTE; F =
FOLLICULAR CELL; ดอกจัน = BINUCLEAR OOCYTE 31
- ภาพที่ 4-10 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง
INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; 34
- ภาพที่ 4-11 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง
INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; 35
- ภาพที่ 4-12 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง
INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; 36
- ภาพที่ 4-13 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง
INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; 37
- ภาพที่ 4-14 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ BIDDER'S ORGAN ของคางคกบ้าน *D.*
MELANOSTICTUS ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง
INDIVIDUAL NUMBER; GC = GERM CELL; 38

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

การเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ (sex differentiation) เป็นกระบวนการที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการพัฒนาไปเป็นรังไข่หรืออัณฑะ ซึ่งเกิดหลังจากการกำหนดเพศด้วยพันธุกรรม (Flament et al., 2011) โดยทั่วไปสัตว์มีกระดูกสันหลัง เพศจะถูกกำหนดไว้ตั้งแต่หลังการปฏิสนธิ ในกลุ่มของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสัตว์ที่มีความนิยมนำมาใช้เป็นตัวแบบของการศึกษาในแต่ละช่วงชีวิตอย่างกว้างขวาง ทั้งทางด้านชีววิทยาการเจริญ การกำหนดเพศ และรวมถึงรูปแบบของกระบวนการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Eggert, 2004) พบว่าสัตว์กลุ่มนี้มีรูปแบบของการเจริญเพื่อแยกเพศที่แตกต่างกันถึง 3 รูปแบบจากการศึกษาของ Witschi (1929) และมีความแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์อีกด้วย นอกจากนี้การกำหนดเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก อาจขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม อย่างเช่น อุณหภูมิ (Tang Y et al., 2020) หรือแม้กระทั่งการใช้สารเคมีในพื้นที่ทำการเกษตรที่เป็นสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ ส่งผลต่อการเจริญเพื่อกำหนดเพศ รวมถึงโครงสร้างประชากรที่เปลี่ยนแปลงไปของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดนั้น ๆ (Mann, 2009)

แม้ว่าจะมีการนำสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมาเป็นตัวแบบในการศึกษารูปแบบของการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศอยู่เป็นจำนวนมาก แต่การศึกษาเกี่ยวกับจุลกายวิภาคและการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกยังมีอยู่จำกัด จากการทบทวนวรรณกรรม งานวิจัยของ Falconi และคณะ (2004) และ Piprek และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาดูจุลกายวิภาคการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ รวมไปถึงโครงสร้างที่เกี่ยวข้องอย่าง Bidder's organ ในคางคก *Bufo bufo* (Linnaeus, 1758) และ *Bufo viridis* (Laurenti, 1768) ตามลำดับ พบว่า การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เริ่มต้นขึ้นในระยะที่ 29 อ้างอิงตามระยะของ Gosner ในปี 1960 และเริ่มมีการแยกของเพศเกิดขึ้นในระยะที่ 40-41 แต่ไม่ได้มีการเปรียบเทียบอัตราส่วนของเพศที่พบในเชิงประชากรเมื่อกระบวนการเมทาโมอร์โฟซิสสมบูรณ์เพื่อดูแนวโน้มของรูปแบบในการกำหนดเพศ

ในโครงการวิจัยนี้ผู้ศึกษาจึงมีความสนใจที่จะศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิสของคางคกบ้าน *D. melanostictus* เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการศึกษาทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในคางคกชนิดนี้ จากรายงานของ IUCN Red list คางคกชนิดนี้เป็นสายพันธุ์ที่พบได้ทั่วไป มีการกระจายตัวกว้างและสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วจนนำไปสู่แนวโน้มการเพิ่มขึ้นประชากรในปัจจุบัน จึงมีการนำคางคกบ้านไปใช้ศึกษาในด้านต่าง ๆ เช่น การทดสอบทางพิษวิทยาในสิ่งแวดล้อมต่อระยะตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัย

(Fernando et al., 2016; Goswami et al., 2016) และมีการนำคางคกบ้านไปใช้ประโยชน์อีกมากมาย (Gomes, 2011; Neerati et al., 2014; Sharma et al., 2013) การศึกษาในเรื่องนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญของการศึกษารูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศในคางคกบ้าน *D. melanostictus* ต่อไปในอนาคต

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส
- เพื่อศึกษารูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

บทที่ 2
ทบทวนวรรณกรรม

2.1. คางคกบ้าน *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799)

การจำแนกคางคกบ้านทางอนุกรมวิธาน สามารถจำแนกได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Amphibia

Order Anura

Family Bufonidae

Genus *Duttaphrynus*

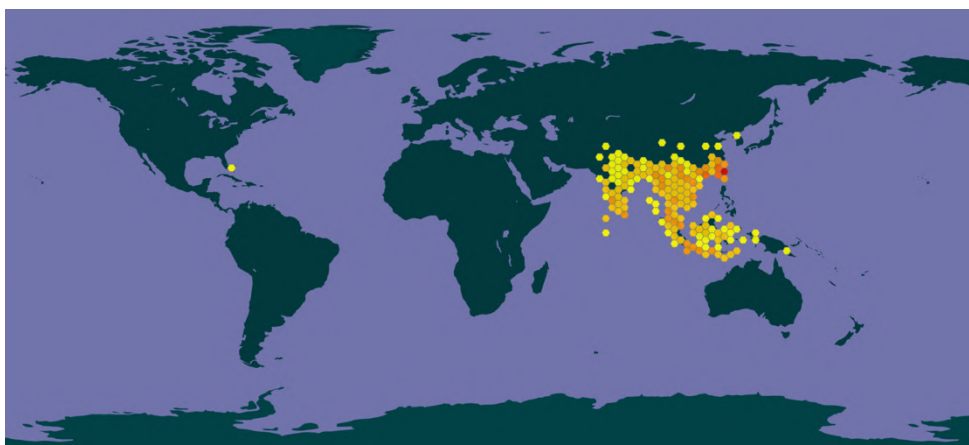
Species *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799)



ภาพที่ 2-1 *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) (O'Shea, 2011)

(<https://zookeys.pensoft.net/articles.php?id=2567>)

คางคกบ้าน มีชื่อสามัญคือ Asian common toad หรือ Black-spined toad และมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider, 1799) อยู่ในวงศ์ Bufonidae มีการกระจายพันธุ์ทั่วไปเป็นวงกว้างในทวีปเอเชีย ตั้งแต่ตอนเหนือของปากีสถานถึงเนปาล อินเดีย จีนตอนใต้ และประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีถิ่นที่อยู่อาศัยตามพื้นที่ราบลุ่ม ทั้งในธรรมชาติ พื้นที่การเกษตร รวมไปถึงชุมชนเมือง มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมที่อาศัย และมีขนาดประชากรใหญ่ จึงทำให้สามารถแพร่กระจาย และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (van Dijk et al., 2004)



ภาพที่ 2-2 แผนที่แสดงการกระจายของคางคกบ้าน *D. melanostictus*

(<https://www.gbif.org/species/2422538>)

ลูกอ๊อดคางคกบ้านจะมีลำตัวสีดำ ลักษณะสัณฐานเหมือนกันในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกทั่วไป ได้แก่ มีรูปร่างกลมกับหางที่มีความอ่อน ครีบหลังกว้างในขณะที่หน้าท้องแคบ oral disc มีลักษณะเหมือนคางคกโดยทั่วไป มีสูตรแถวฟัน คือ 2(2)/3 oral papillae อยู่ด้านข้าง จงอยปากเป็นหยักละเอียดและคมชัด (Khan, 1991) เมื่อเข้าสู่ช่วงเมตามอร์โฟซิส ลูกอ๊อดคางคกจะกลายเป็นลูกคางคก และเกิดการลดลงของมวลร่างกายมากถึง 46% พร้อมกับหางที่หดสั้นลงจนหายไป อีกทั้งยังลดการพึ่งพาสภาพแวดล้อมในน้ำลง สำหรับการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะเมตามอร์โฟซิสนั้นอาจจะต้องใช้ระยะเวลา 25-30 วัน ซึ่งกรณีการเกิดเมตามอร์โฟซิสที่ล่าช้าในสปีชีส์ดังกล่าวเป็นพฤติกรรมปรับตัวเมื่อต้องเผชิญต่อผู้ล่า และยังส่งผลต่อโอกาสของความสำเร็จในการเจริญเติบโตเพื่อให้จำนวนประชากรมีขนาดใหญ่ (Mogali et al., 2011).



ภาพที่ 2-3 คางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส

(<https://bangkokherps.wordpress.com/2012/04/15/common-indian-toad/>)

ตารางที่ 2-1 การเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงชีวิตของคางคกบ้าน *D. melanostictus*

ช่วงชีวิต	ระยะเวลา
ฤดูผสมพันธุ์	- ผสมพันธุ์ในฤดูฝน (กรณีที่พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ที่มีความแตกต่างกันของฤดูฝนและฤดูแล้ง) - ผสมพันธุ์ตลอดทั้งปี (ประเทศสิงคโปร์)
การส่งเสียงร้อง	ได้ยินเสียงร้องได้ตลอดทั้งปี (ประเทศสิงคโปร์)
ความถี่ในการวางไข่	ผสมพันธุ์ได้ประมาณ 2 ครั้ง/ปี
ค่าเฉลี่ยของจำนวนลูก	40,000 ฟอง ต่อการวางไข่จำนวนหนึ่งครั้ง
การฟักตัวออกจากไข่	24-48 ชั่วโมง
ระยะตัวอ่อน	34-90 วัน
ระยะเมตามอร์โฟซิส	25-30 วัน
อายุขัย	4-10 ปี

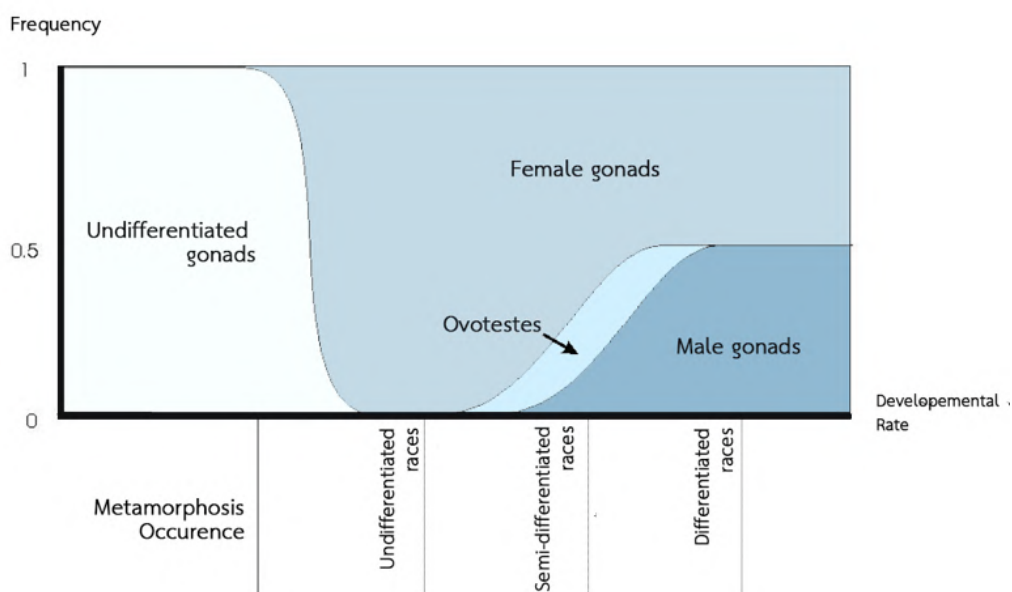
2.2. รูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศ (sex differentiation)

จากการศึกษาของ Witschi (1929) รูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศ (sex differentiation) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ (ภาพที่ 2-4) ได้แก่

1) Differentiated type เมื่อเกิดกระบวนการเมตามอร์โฟซิสสมบูรณ์จะพบอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่สามารถแยกเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยที่อัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมียจะใกล้เคียงกัน

2) Semi-differentiated type เมื่อครบกระบวนการเมตามอร์โฟซิสแล้วพบอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 2 รูปแบบ คือ เป็นเพศเมีย หรือเป็นภาวะ intersex (ovotestis) ซึ่งสัดส่วนของประชากรเพศเมียและ intersex นั้นไม่คงที่ และเมื่อเกิดเมตามอร์โฟซิสจนสมบูรณ์แล้วทั้งกลุ่มเพศเมียและ intersex จะสามารถเปลี่ยนเป็นเพศผู้ได้ในภายหลัง (Eggert, 2004)

3) Undifferentiated type เมื่อสิ้นสุดระยะเมตามอร์โฟซิส ลูกอ๊อดทั้งหมดจะมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นเพศเมีย หลังจากนั้นประชากรบางส่วนจะกลายเป็นเพศผู้ ผ่านกระบวนการเปลี่ยนผ่านจากรังไข่เป็นอัณฑะ (Flament, 2016)



ภาพที่ 2-4 รูปแบบการกำหนดเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (ดัดแปลงจาก Eggert, 2004)

2.3. การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ Bidder's organ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

2.3.1. การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับผลการศึกษาการเจริญของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกโดย Altig และ McDiarmid (1999) ในภาพที่ 2-5 พบว่าในระยะเริ่มต้นจะมีการเจริญของเนื้อเยื่อที่มีชื่อว่า genital ridge บริเวณตรงกลางของไตทั้งสองข้าง (gut mesentery) ต่อมา primordial germ cell จะเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ภายใน genital ridge (ภาพ A) และมีการแบ่งเซลล์เกิดการขยายขนาดเป็น indifferent gonad (ภาพ B) จากนั้นจะพบเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 2 ชั้น (ภาพ C) ได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นนอก (cortex) และเนื้อเยื่อชั้นใน (medulla) จึงเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ (sex differentiation) ในลำดับต่อมาสำหรับเพศเมีย (ภาพ C-F) เกิดการแยกตัวของเนื้อเยื่อชั้น cortex และ medulla โดย mesenchymal cell และพบ primordial germ cell เจริญเป็น oogonium ที่มีขนาดแตกต่างกันในเนื้อเยื่อชั้น cortex แต่จะมีการเจริญน้อยลงและเกิดการฝ่อสลายไปในชั้น medulla ส่วนเพศผู้ (ภาพ G-I) ชั้น cortex จะแบ่งออกเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นในและชั้นนอก ต่อมา primordial germ cell เจริญเป็น spermatogonium ที่มีขนาดใกล้เคียงกันในเนื้อเยื่อชั้น medulla นอกจากนี้ยังสามารถพบกลุ่มเซลล์ต่าง ๆ ที่พัฒนาไปเป็น seminiferous tubules

2.3.2. การเจริญของ Bidder's organ

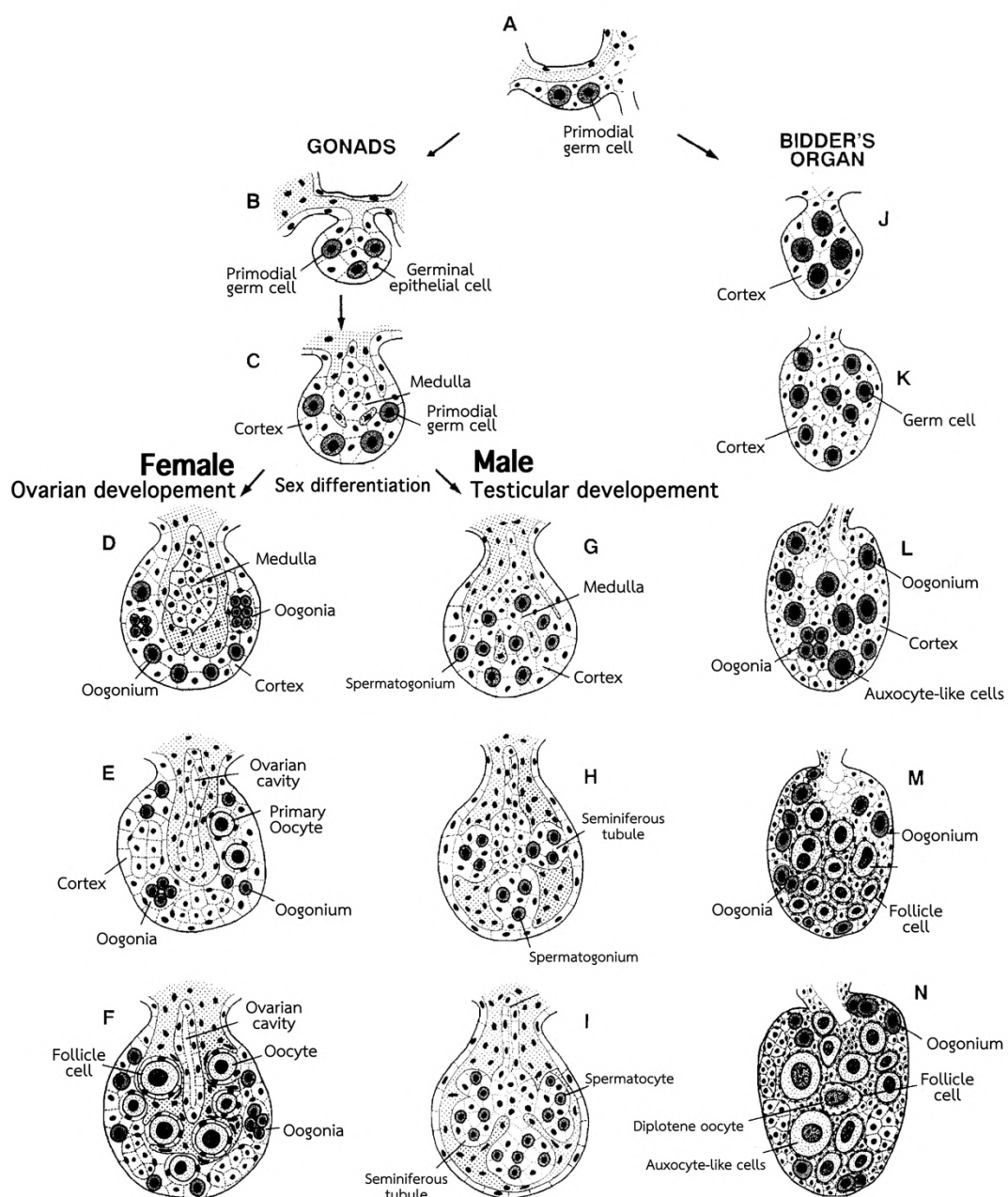
Bidder's organ สามารถพบการเจริญได้ทั้งเพศผู้และเพศเมียในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก กลุ่ม Bufonids โดยสามารถพบได้ตลอดชีวิตในเพศผู้ และส่วนใหญ่มีแนวโน้มที่จะไม่พบลักษณะดังกล่าวหลังจากการเจริญพันธุ์ในเพศเมีย (Alexander, 1933) จากภาพที่ 2-5 (J-L) จุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นหลังจากการฟักตัวของตัวอ่อนด้วยการเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ที่กระจัดกระจายอยู่ท่ามกลาง medulla-like cells ตั้งแต่บริเวณด้าน anterior ของ mesogonia ไปจนถึงส่วนของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ อีกทั้งยังไม่พบลักษณะของโครงสร้าง cortico-medullary ที่ชัดเจน

การเปลี่ยนแปลงและการขยายของเซลล์สืบพันธุ์ภายใน Bidder's organ ไปเป็นเซลล์ gonia และเซลล์คล้าย auxocyte นั้น เกิดจากท่อหุ้มของชั้นเซลล์ follicular ขณะที่อยู่ในช่วงการเจริญของระยะตัวอ่อน แต่จะยังไม่เกิดการแยกเพศของเซลล์สืบพันธุ์ จนกระทั่งระยะหลังเมทาโมอร์โฟซิส จึงจะพบจำนวนของ oocytes และ secondary gonia ในเพศเมียที่มีปริมาณมากกว่าได้ อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้ ยังพบก้อนไขมัน (fat body) ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ที่มาจากส่วนของเซลล์สืบพันธุ์อิสระของ germinal ridge ที่เรียกว่า progonia และเซลล์ไขมัน (adipose cell) (Altig and McDiarmid, 1999)

2.4. ระยะการเจริญตามสัณฐานของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

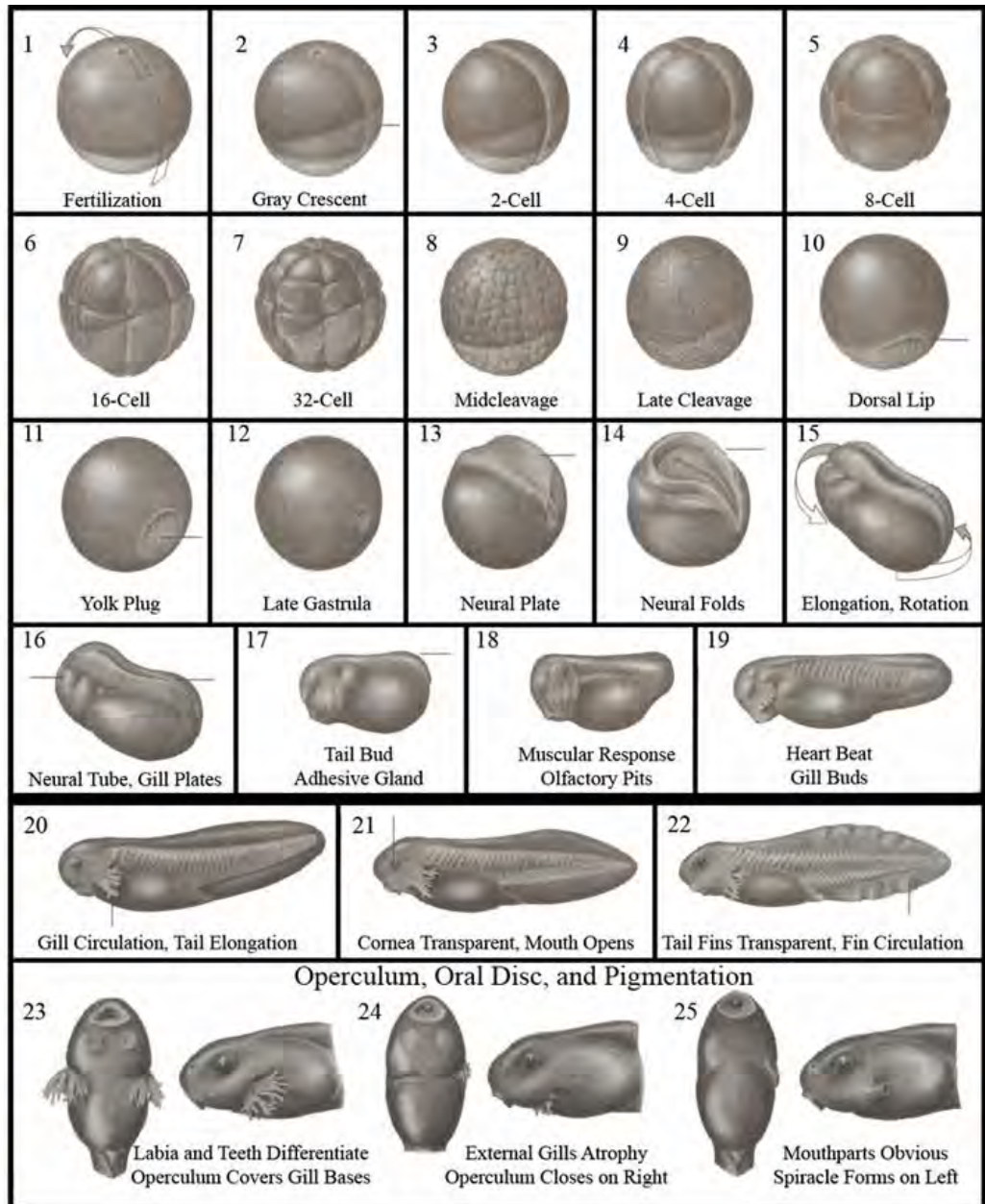
การเปรียบเทียบระยะเวลาการเจริญจากสัณฐานภายนอกตามวิธีจัดจำแนกของ Gosner (1960) จะแสดงลักษณะของสัณฐานที่อยู่ในรูปแบบของตารางแบ่งออกเป็นระยะทั้งหมด 46 ระยะ พร้อมคำอธิบายสั้น ๆ ที่ใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในการเจริญซึ่งเกิดจากการเปรียบเทียบข้อมูลจากหลายสปีชีส์ที่แตกต่างกันด้วยกระบวนการวัดความยาวในแต่ละระยะ จนได้ขนาดและลักษณะสำคัญสำหรับใช้ในการระบุระยะเวลาการเจริญอันเป็นที่ยอมรับได้

ในการศึกษาครั้งนี้ มีการใช้ลักษณะสำคัญของสัณฐานภายนอกตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) เพื่อตรวจสอบระยะเวลาการเจริญของลูกอ๊อดคางคก โดยอาศัยลักษณะที่ปรากฏในระยะที่ 46 ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดกระบวนการเมทาโมอร์โฟซิสตามรูปภาพที่ 2-6 ลักษณะสัณฐานที่สามารถสังเกตเห็นได้ คือ บริเวณส่วนหัวเกิดการเมทาโมอร์โฟซิส โครงสร้างของปากมีการเปลี่ยนแปลงไปโดยมุมปากจะลากยาวไปบริเวณส่วนหลังของตา ส่วนของรยางค์คู่หน้าที่สามารถสังเกตเห็นได้เมื่อเข้าสู่ระยะที่ 42 และหางที่หดสั้นจนหายไป ทั้งนี้เมื่อเกิดกระบวนการเมทาโมอร์โฟซิสสมบูรณ์ที่ระยะ 46 รูปร่างใหม่ที่เกิดขึ้นอาจจะมีส่วนที่คล้ายคลึงกับตัวเต็มวัย หรือไม่มีลักษณะที่ใช้ระบุในเชิงบวกเลยย่อมนได้



ภาพที่ 2-5 การเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และ Bidder's organ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (ดัดแปลงจาก Altig and McDiarmid, 1999)

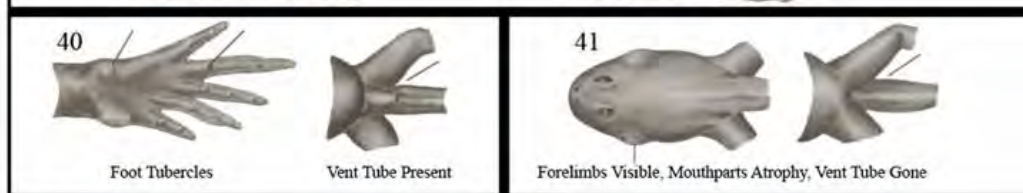
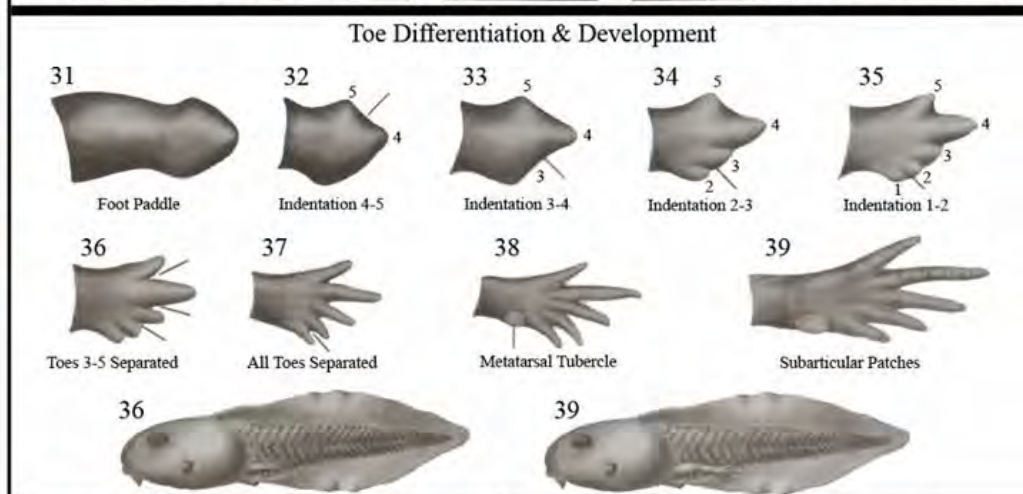
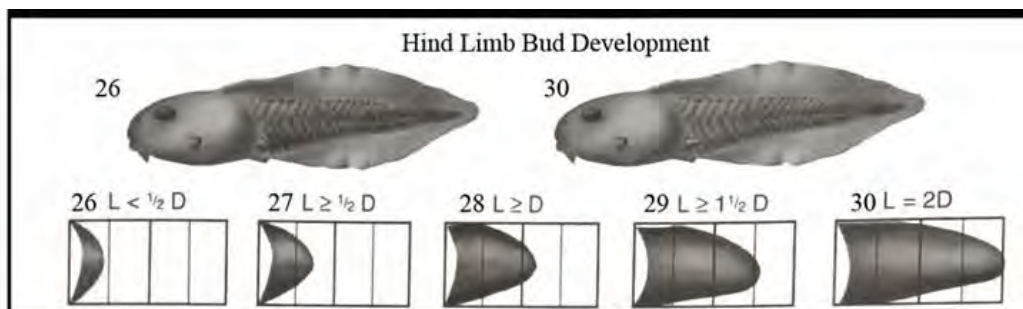
E M B R Y O S



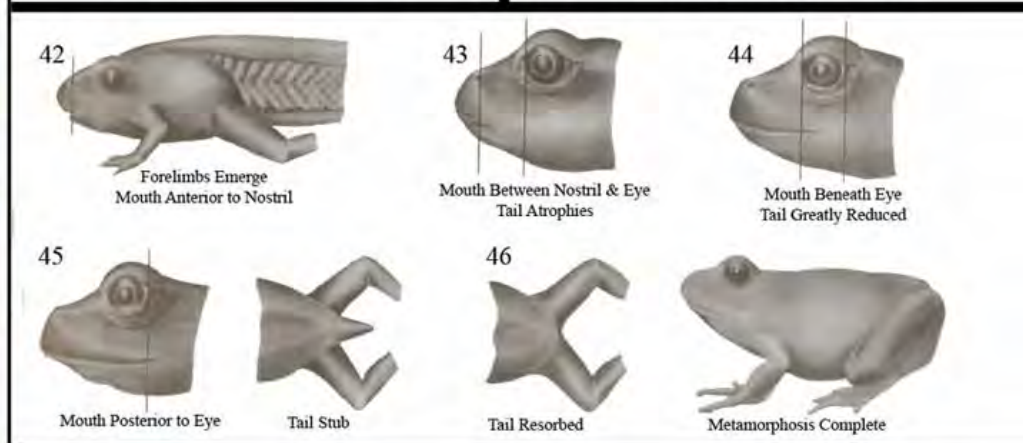
H A T C H L I N G S

ภาพที่ 2-6 ระยะการเจริญทางสัณฐานของลูกอีต จำแนกตามระบบของ Gosner (1960)

L
A
R
V
A
E



M
E
T
A
M
O
R
P
H
S



ภาพที่ 2-6 ระยะการเจริญทางสัณฐานของลูกอ๊อด จำแนกตามระบบของ Gosner (1960)

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1. การเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง

คางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ใช้ในการศึกษา เก็บตัวอย่างลูกอ๊อดจากแหล่งน้ำทั่วไปที่สภาพแวดล้อมเดียวกัน บริเวณพื้นที่ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการจนถึงระยะ 46 ซึ่งเป็นระยะที่เมตามอร์โฟซิสสมบูรณ์ (Gosner, 1960) โดยทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ในเดือนตุลาคม ถึง พฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2562 จำนวนทั้งหมด 30 ตัว จากนั้นนำตัวอย่างมาสลับและทำการการุณฆาตด้วยการแช่ในสารละลาย MS-222 ความเข้มข้น 0.5 % W/V (Torreilles et al., 2009)



ภาพที่ 3-1 พื้นที่แหล่งน้ำในการเก็บตัวอย่าง บริเวณคณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 3-2 ตัวอย่างลูกอ๊อดคางคกในแหล่งน้ำ บริเวณคณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2. การตรวจสอบระยะการเจริญทางสัณฐาน

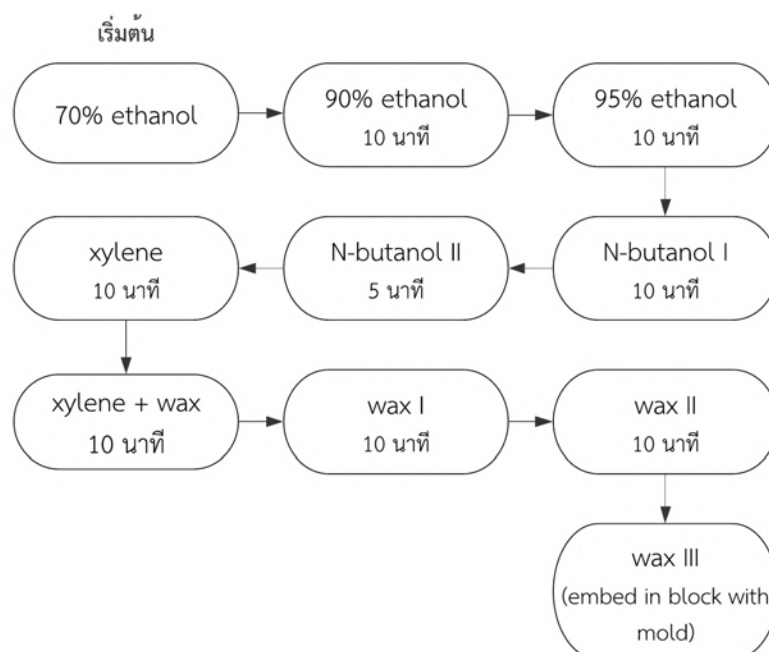
นำตัวอย่างคางคกบ้าน *D. melanostictus* มาจำแนกระยะการเจริญ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) จากนั้นบันทึกข้อมูลสัณฐานเบื้องต้น ได้แก่ ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL) และบันทึกภาพลักษณะภายนอกด้วยกล้องถ่ายภาพ

3.3. การทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin Method

นำตัวอย่างคางคกบ้าน *D. melanostictus* มาจำแนกกระยะการเจริญ โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) จากนั้นบันทึกข้อมูลสัณฐานเบื้องต้น ได้แก่ ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL) และบันทึกภาพลักษณะภายนอกด้วยกล้องถ่ายภาพ

3.3.1. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ (tissue processing)

นำตัวอย่างที่ทำการผ่าตัดเปิดผิวหนังหน้าท้องมารักษาสภาพ (fixation) ทั้งตัวไว้ใน 10% neutral buffered formalin ทันทีหลังการรูดขน เป็นระยะเวลา 3-4 วัน จึงนำมาเก็บรักษาใน 70% ethanol จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการ Paraffin Method ตามวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997) เริ่มจากการดึงน้ำภายในเนื้อเยื่อที่เหลือออก (dehydration) โดยผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70% ไปยังความเข้มข้นที่สูงกว่า ได้แก่ 90% ethanol, 95% ethanol และ n-butanol ตามลำดับ ต่อมานำตัวอย่างมาทำให้เนื้อเยื่อใสด้วย xylene (clearing) จึงนำไปแทรกซึมด้วยพาราฟิน (infiltration) เข้าไปแทนที่ xylene โดยตรงด้วยการแช่ในพาราฟิน (Paramat extra; Gurr®) ที่อุณหภูมิประมาณ 58 องศาเซลเซียส เพื่อให้เนื้อเยื่อมีความแข็งอย่างสม่ำเสมอจนสามารถนำเนื้อเยื่อไปตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ ได้ (ภาพที่ 3-3)

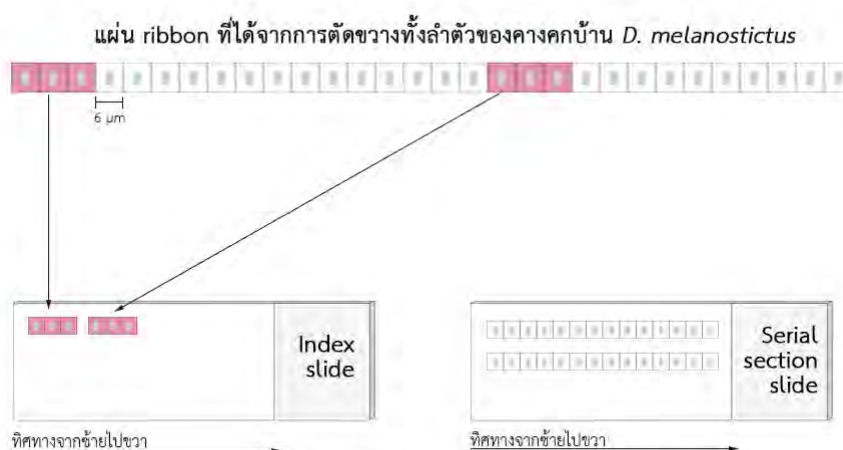


ภาพที่ 3-3 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วย Paraffin Method ตามวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997)

ตามด้วยขั้นตอนการฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) โดยการนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการแทรกซึมของแว็กซ์เข้าไปเติมที่แล้ว ฝังเข้าไปในวัสดุแข็ง (paraffin wax) เพื่อขึ้นรูปสำหรับกระบวนการตัดชิ้นส่วนเนื้อเยื่อในขั้นต่อไป เริ่มจากการเท paramat extra เหลวที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส ลงในแม่พิมพ์ที่มี embedding ring วางประกบไว้ แล้วนำเนื้อเยื่อตัวอย่างฝังลงไป ใน paramat extra เหลว (สำหรับการศึกษาค้างนี้ ได้ทำการศึกษาแบบตัดขวาง จึงวางเนื้อเยื่อในลักษณะแนวตั้ง เพื่อตัดเนื้อเยื่อตามแนว transverse) จากนั้นปล่อยให้ paramat extra แข็งตัว โดยนำไปวางในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อบล็อกเนื้อเยื่อแข็งตัวจึงสามารถแกะออกจากแม่พิมพ์โลหะ เพื่อนำไปตัดแต่งหน้าบล็อก (trimming) จนทุกด้านเสมอกันเป็นรูปสี่เหลี่ยม โดยเว้นระยะห่างจากเนื้อเยื่อพอประมาณ

3.3.2. การตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (sectioning)

หลังจากได้บล็อกของเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัดแต่ง (trimming) จึงนำมาตัดให้เป็นแผ่นด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome; Leica® RM2125 RTS) โดยกำหนดให้ชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างมีความหนาอยู่ที่ 6 ไมโครเมตร ตัดอย่างต่อเนื่องจนได้เป็นแผ่นชิ้นเนื้อเยื่อที่ต่อกัน (ribbon) ตัดจนสิ้นสุดบริเวณที่ต้องการ จากนั้นเลือกเนื้อเยื่อ จำนวน 3 แผ่น สำหรับการทำ index slide และเว้นเนื้อเยื่อ จำนวน 14 แผ่น สำหรับการทำ serial slide ทำซ้ำจนหมดชิ้นเนื้อเยื่อ (ภาพที่ 3-4) แล้วนำไปติดบนสไลด์ที่มีสารละลาย albumin solution ซึ่งเป็น adhesive agent

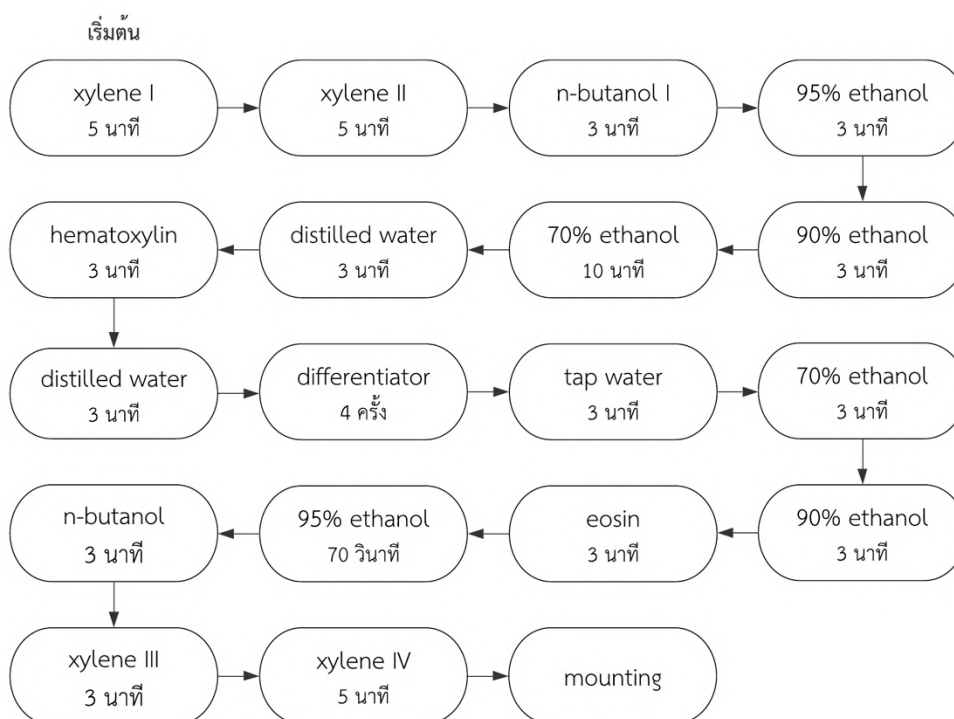


ภาพที่ 3-4 ขั้นตอนการติดชิ้นเนื้อเยื่อ สำหรับการทำ index slide และ serial slide

3.3.3. การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อ (staining)

นำสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อ มาย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ตามวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997) เริ่มจากการละลาย paramat extra (dewaxing) ด้วย xylene แล้วดึงน้ำกลับเข้าไปในเนื้อเยื่อ (rehydration) โดยการนำสไลด์ผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงไปย้งต่ำ ได้แก่ butanol, 95% ethanol, 90% ethanol และ 70% ethanol ตามลำดับ จากนั้นนำไปแช่ในน้ำกลั่นก่อน จึงนำไปย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 3 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น ตามด้วยจุ่มลงในสาร differentiator จนกระทั่งบริเวณพื้นหลังและส่วนรอบเนื้อเยื่อมีความใส จึงนำไปแช่ในน้ำประปาพร้อมให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน 70% ethanol และ 90% ethanol ตามลำดับ ก่อนนำไปย้อมด้วย 0.5% eosin Y แล้วทำการดึงน้ำออกเนื้อเยื่อโดยผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปย้งสูง ได้แก่ 70% ethanol, 90% ethanol, 95% ethanol และ butanol ตามลำดับ ต่อบนนำมาทำให้เนื้อเยื่อมีความใสอีกครั้งด้วย xylene (ภาพที่ 3-5)

จากนั้นนำ index slide ไปตรวจสอบลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แล้วทำการบันทึกผล กรณีที่ไม่พบโครงสร้างดังกล่าวหรือเนื้อเยื่อมีความเสียหาย จะนำ serial slide ที่เหลือมาทำตามข้อที่ 3.4.4 ซ้ำ



ภาพที่ 3-5 ขั้นตอนการย้อมสี hematoxylin และ eosin สำหรับศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*

3.4. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง วิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาคตรวจสอบการเจริญของโครงสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของตัวอย่างลูกคางคกที่ระยะ 46 ซึ่งเป็นระยะที่เมทามอร์โฟซิสจนสมบูรณ์ จำแนกเพศพร้อมหาอัตราส่วนเพศ แล้วนำมาวิเคราะห์แนวโน้มของรูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศในคางคกสปีชีส์นี้ พร้อมทำการถ่ายภาพของเนื้อเยื่อจากกล้องจุลทรรศน์เพื่อรายงานผลการทดลอง

บทที่ 4 ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแบ่งออกเป็น 3 หัวข้อหลัก ดังนี้

ส่วนที่ 4.1 การตรวจสอบระยะการเจริญทางสัณฐาน โดยอ้างอิงเกณฑ์ของ Gosner (1960)

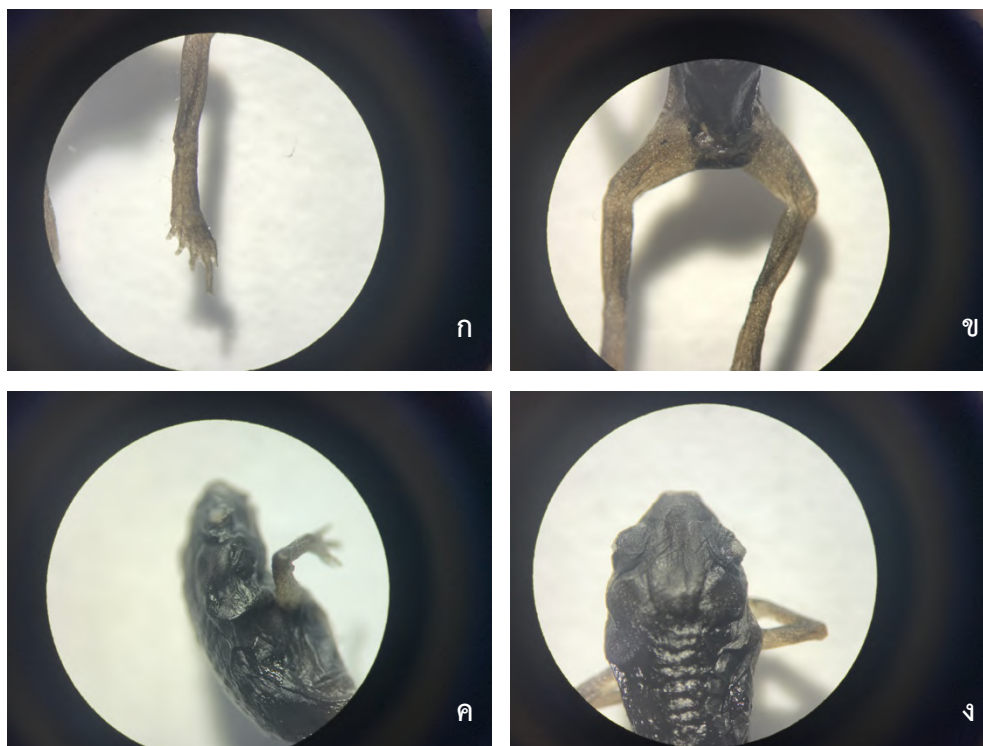
ส่วนที่ 4.2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ Bidder's organ โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง วิเคราะห์ลักษณะทางจุลกายวิภาค พร้อมบันทึกภาพเนื้อเยื่อจากกล้องจุลทรรศน์สำหรับรายงานผลการทดลอง

ส่วนที่ 4.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ โดยศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง วิเคราะห์ขนาดและลักษณะทางจุลกายวิภาค พร้อมบันทึกภาพเนื้อเยื่อจากกล้องจุลทรรศน์สำหรับรายงานผลการทดลอง

4.1. การตรวจสอบระยะการเจริญทางสัณฐาน

4.1.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาตามเกณฑ์ของ Gosner (1960)

จากการศึกษาลักษณะสัณฐานของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะที่ 46 ตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดเมทาเมอร์โฟซิส พบว่าคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่นำมาศึกษามีลักษณะตรงตามเกณฑ์ ได้แก่ บริเวณส่วนหัวที่เกิดการเมทาเมอร์โฟซิส โดยพบปากที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปโดยมุมปากจะลากยาวเลยบริเวณส่วนหลังของตา (ภาพที่ 4-1 ค) ส่วนของรยางค์คู่หน้าและหลังสมบูรณ์ (ภาพที่ 4-1 ก, ภาพที่ 4-1 ง) ทางที่หดสั้นจนหายไปเมื่อเกิดกระบวนเมทาเมอร์โฟซิสสมบูรณ์ที่ระยะ 46 (ภาพที่ 4-1 ข)



ภาพที่ 4-1 ลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะที่ 46 ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก) - ลักษณะของรอยง่ามหลังที่สมบูรณ์, ข) - ลักษณะของหางที่หดสั้นจนหายไปเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเมตามอร์โฟซิส, ค) - ลักษณะมุมปากที่ลากยาวเลยบริเวณหลังตา, ง) - ลักษณะของส่วนหัวที่เกิดการเมตามอร์โฟซิส

4.1.2. ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL)

จากการศึกษาพบว่า ความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL) ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* จำนวนทั้งหมด 30 ตัว มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.2 ± 0.4 มิลลิเมตร และมีค่าพิสัยเท่ากับ 6 - 8 มิลลิเมตร (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ข้อมูลความยาวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงรูทวาร (Snout Vent Length, SVL) ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส

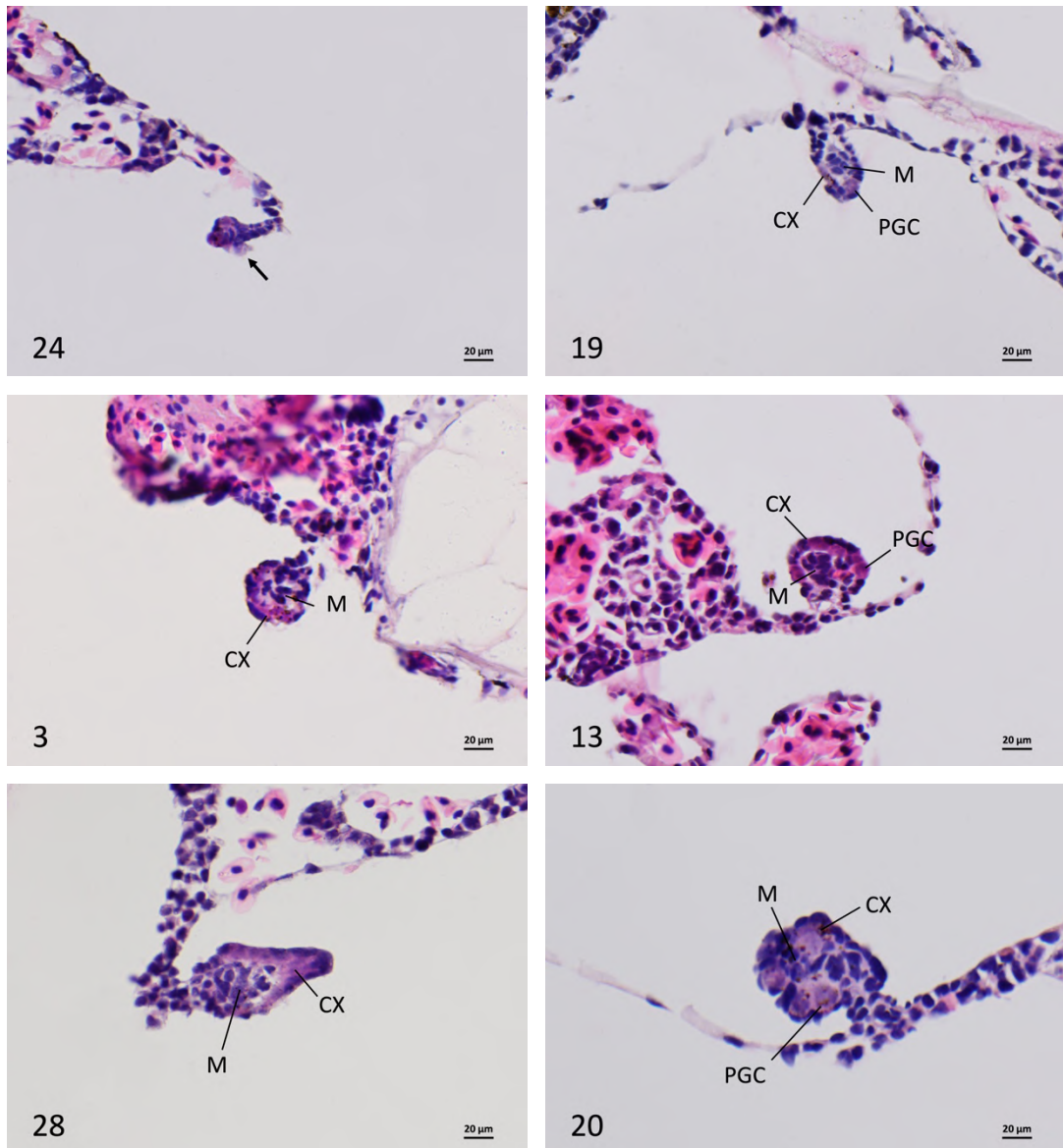
รหัสตัวอย่าง	SVL (mm.)	รหัสตัวอย่าง	SVL (mm.)
DM 11-2019-01	6.9	DM 11-2019-16	7.5
DM 11-2019-02	6.5	DM 11-2019-17	7.3
DM 11-2019-03	7.0	DM 11-2019-18	7.4
DM 11-2019-04	7.1	DM 11-2019-19	7.4
DM 11-2019-05	7.4	DM 11-2019-20	7.2
DM 11-2019-06	6.7	DM 11-2019-21	6.9
DM 11-2019-07	7.2	DM 11-2019-22	7.6
DM 11-2019-08	7.1	DM 11-2019-23	7.6
DM 11-2019-09	7.2	DM 11-2019-24	8.0
DM 11-2019-10	7.2	DM 11-2019-25	7.8
DM 11-2019-11	6.8	DM 11-2019-26	7.5
DM 11-2019-12	7.3	DM 11-2019-27	6.9
DM 11-2019-13	6.8	DM 11-2019-28	7.7
DM 11-2019-14	7.0	DM 11-2019-29	7.0
DM 11-2019-15	7.1	DM 11-2019-30	6.0

4.2. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ Bidder's organ

4.2.1. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* จำนวน 30 ตัว พบว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็น indifferent gonad ที่อยู่ในช่วงของการสร้าง genital ridge เป็นเซลล์ร่างกาย ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของทั้ง 2 เพศ เกิดจากการเคลื่อนที่ของ peritoneal cell ไปยังบริเวณของ germinal epithelium ทำให้เกิดการสร้างคู่ของ genital ridge ตามแนวยาวขึ้น (Altig and McDiarmid, 1999) แม้ว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะอยู่ในช่วงของการสร้าง genital ridge เหมือนกัน แต่รูปร่างขนาด และการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละตัว ตามภาพที่ 4-2 กล่าวคือ พบมีรูปร่างรีถึงกลมยื่นออกมาจากส่วนของ mesentary ขนาดเล็กมากที่พบมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 μm (ภาพที่ 4-2-24) ไปจนถึงมีรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ที่พบมี

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60 μm (ภาพที่ 4-2-20) ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ร่างกาย (somatic cell) และ primordial germ cell นอกจากนี้ ยังพบลักษณะของเนื้อเยื่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ เนื้อเยื่อชั้นใน (medulla) และเนื้อเยื่อชั้นนอก (cortex)



ภาพที่ 4-2 เปรียบเทียบลักษณะทางจุลกายวิภาคที่พบของเนื้อเยื่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla

ตารางที่ 4-2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
DM 11-2019-01	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-3-1)
DM 11-2019-02	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-3-2)
DM 11-2019-03	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-3-3)
DM 11-2019-04	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-3-4)
DM 11-2019-05	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-3-5)
DM 11-2019-06	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-3-6)
DM 11-2019-07	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-4-7)
DM 11-2019-08	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-4-8)
DM 11-2019-09	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-4-9)

ตารางที่ 4-2 (ต่อ) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

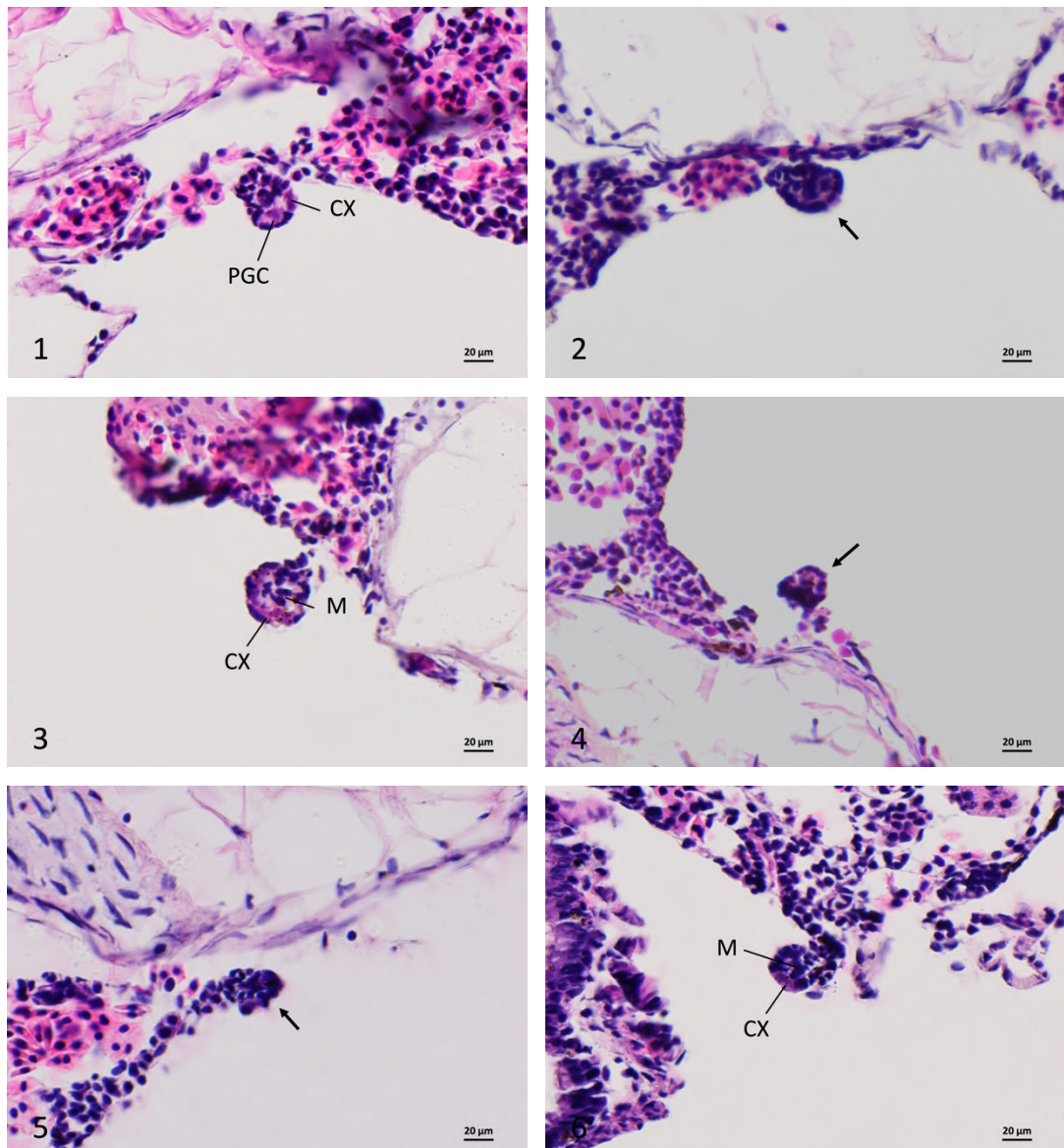
รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
DM 11-2019-10	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-4-10)
DM 11-2019-11	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-4-11)
DM 11-2019-12	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-4-12)
DM 11-2019-13	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-5-13)
DM 11-2019-14	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-5-14)
DM 11-2019-15	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-5-15)
DM 11-2019-16	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-5-16)
DM 11-2019-17	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-5-17)

ตารางที่ 4-2 (ต่อ) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

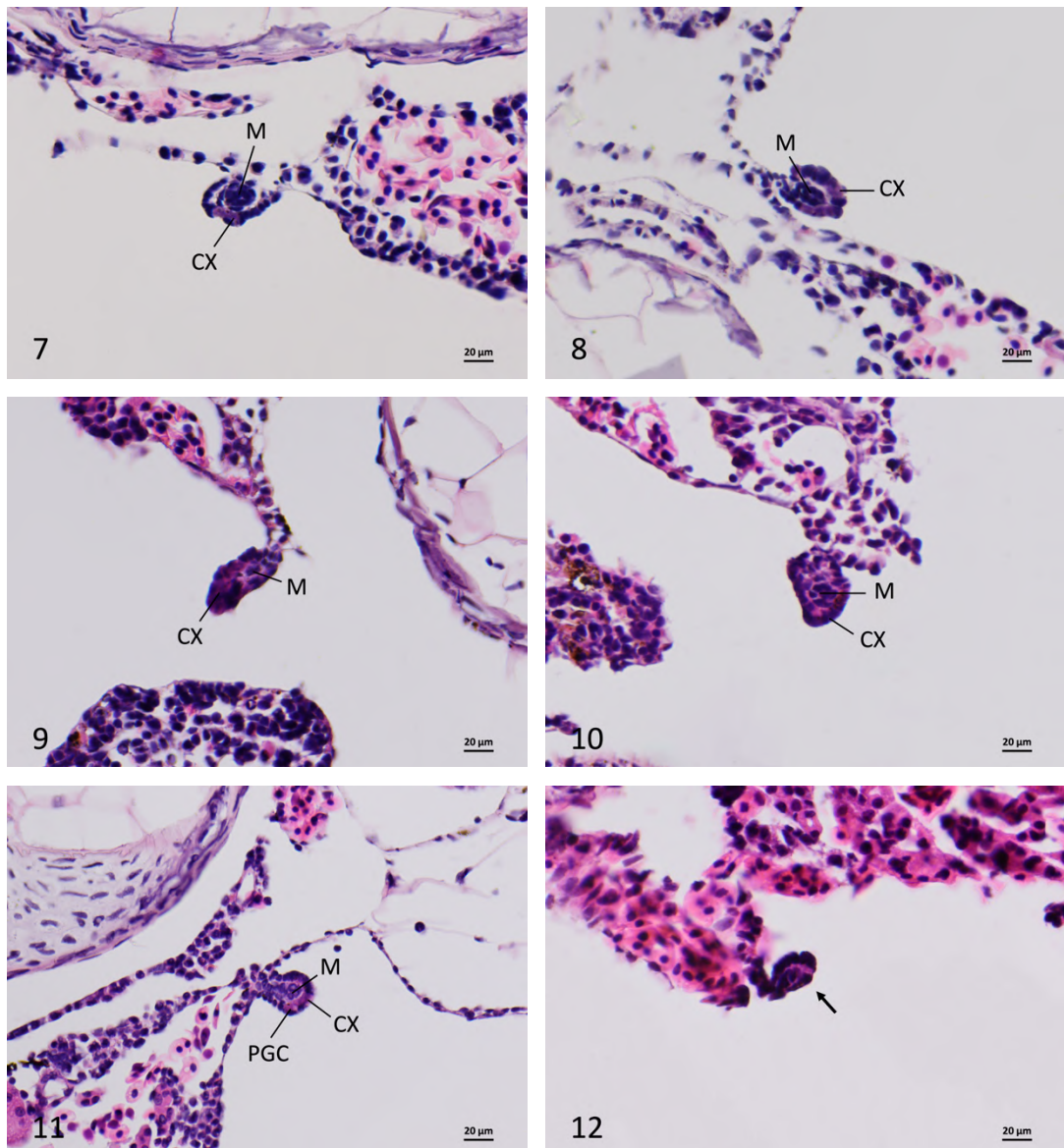
รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
DM 11-2019-18	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-5-18)
DM 11-2019-19	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-6-19)
DM 11-2019-20	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-6-20)
DM 11-2019-21	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-6-21)
DM 11-2019-22	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-6-22)
DM 11-2019-23	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-6-23)
DM 11-2019-24	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-6-24)
DM 11-2019-25	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-7-25)

ตารางที่ 4-2 (ต่อ) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

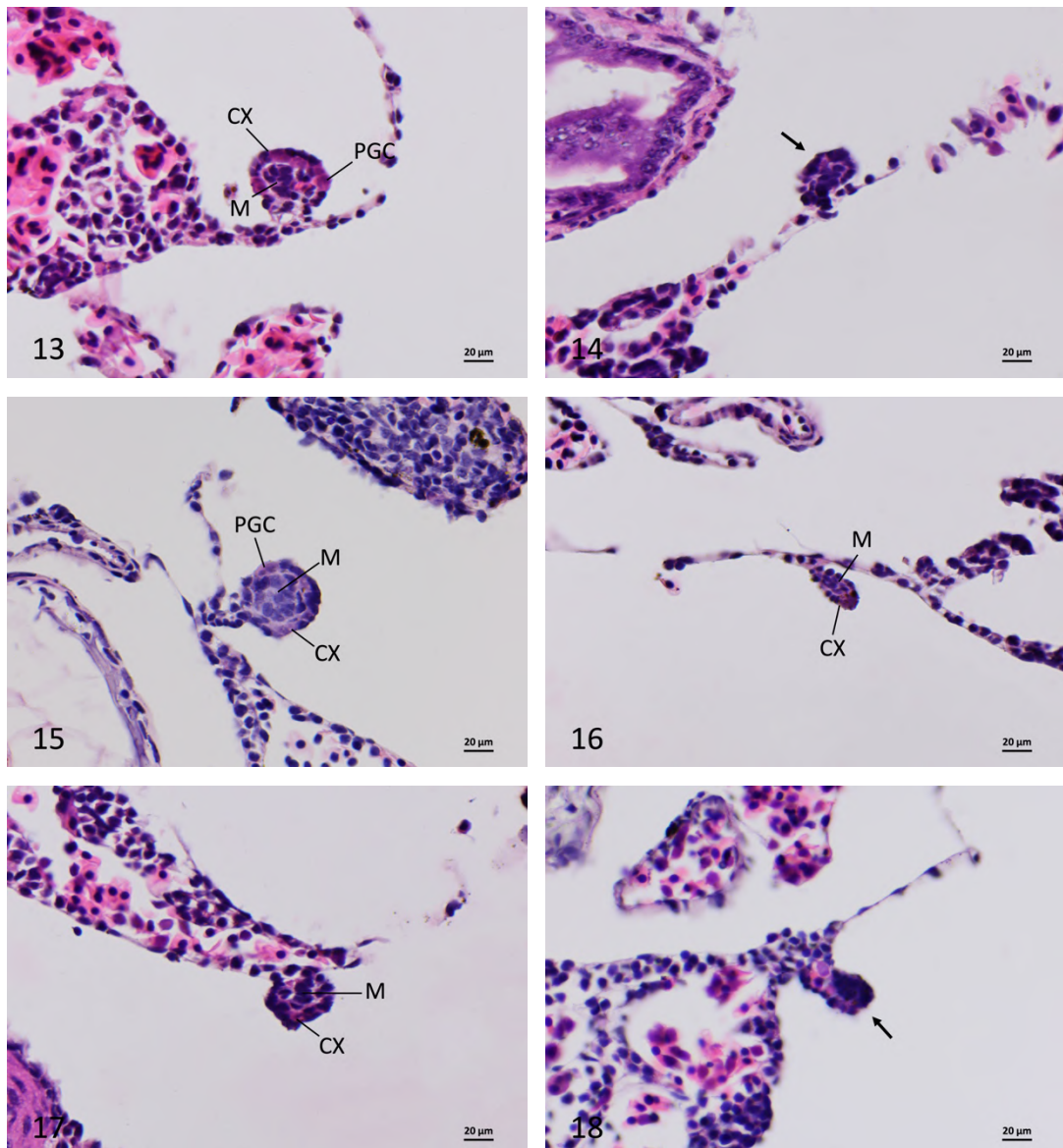
รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์
DM 11-2019-26	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-7-26)
DM 11-2019-27	พบการรวมตัวกันของ germinal epithelium cell เพื่อสร้างเป็น genital ridge (ภาพที่ 4-7-27)
DM 11-2019-28	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-7-28)
DM 11-2019-29	พบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-7-29)
DM 11-2019-30	พบ germinal epithelial cell มีการเพิ่มจำนวนเกิดเป็น primordial gonad และ primary germ cell ในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังพบเนื้อเยื่อที่มีการแบ่งออกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นนอก (cortex) และชั้นใน (medulla) ส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง (ภาพที่ 4-7-30)



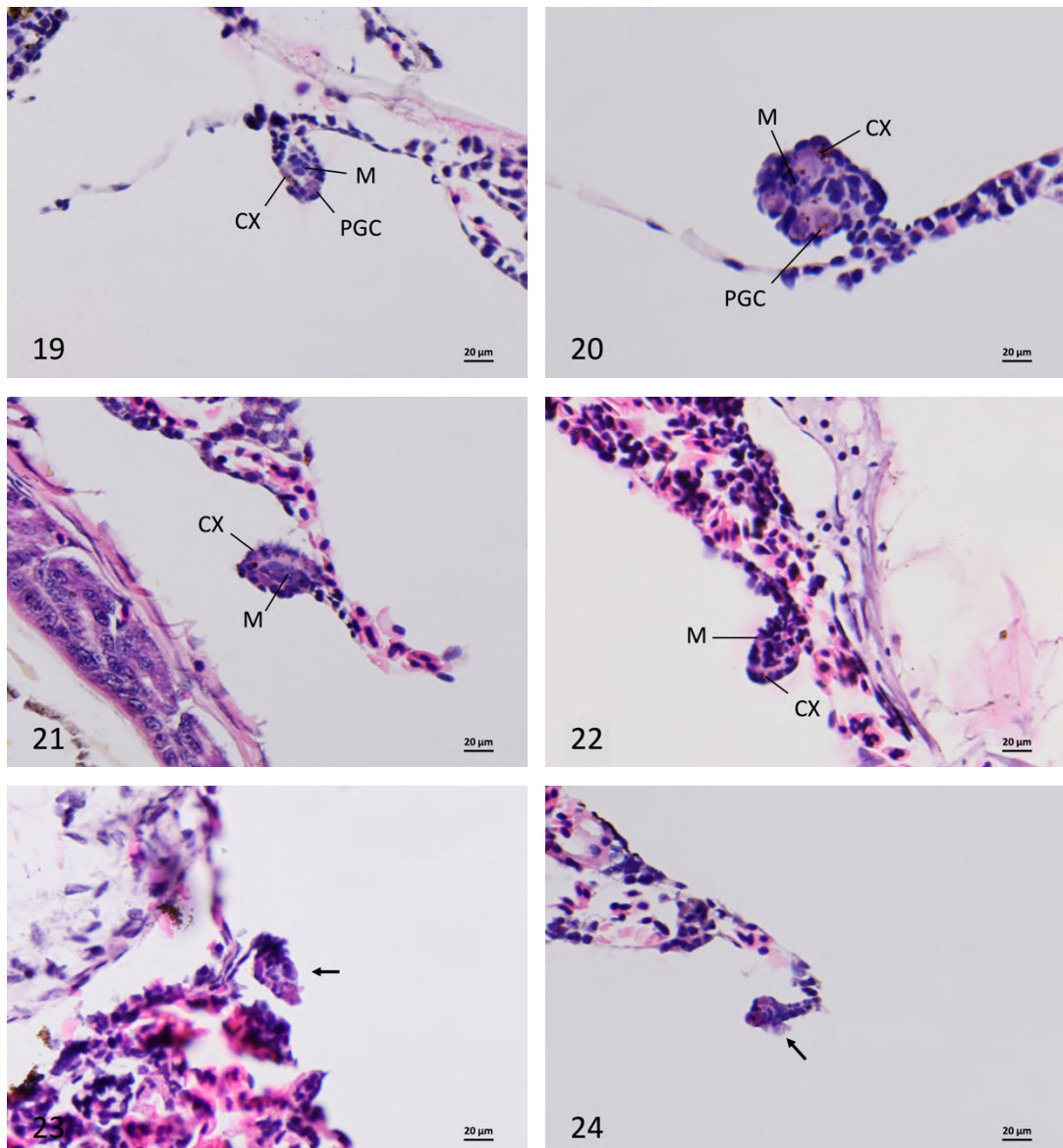
ภาพที่ 4-3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla



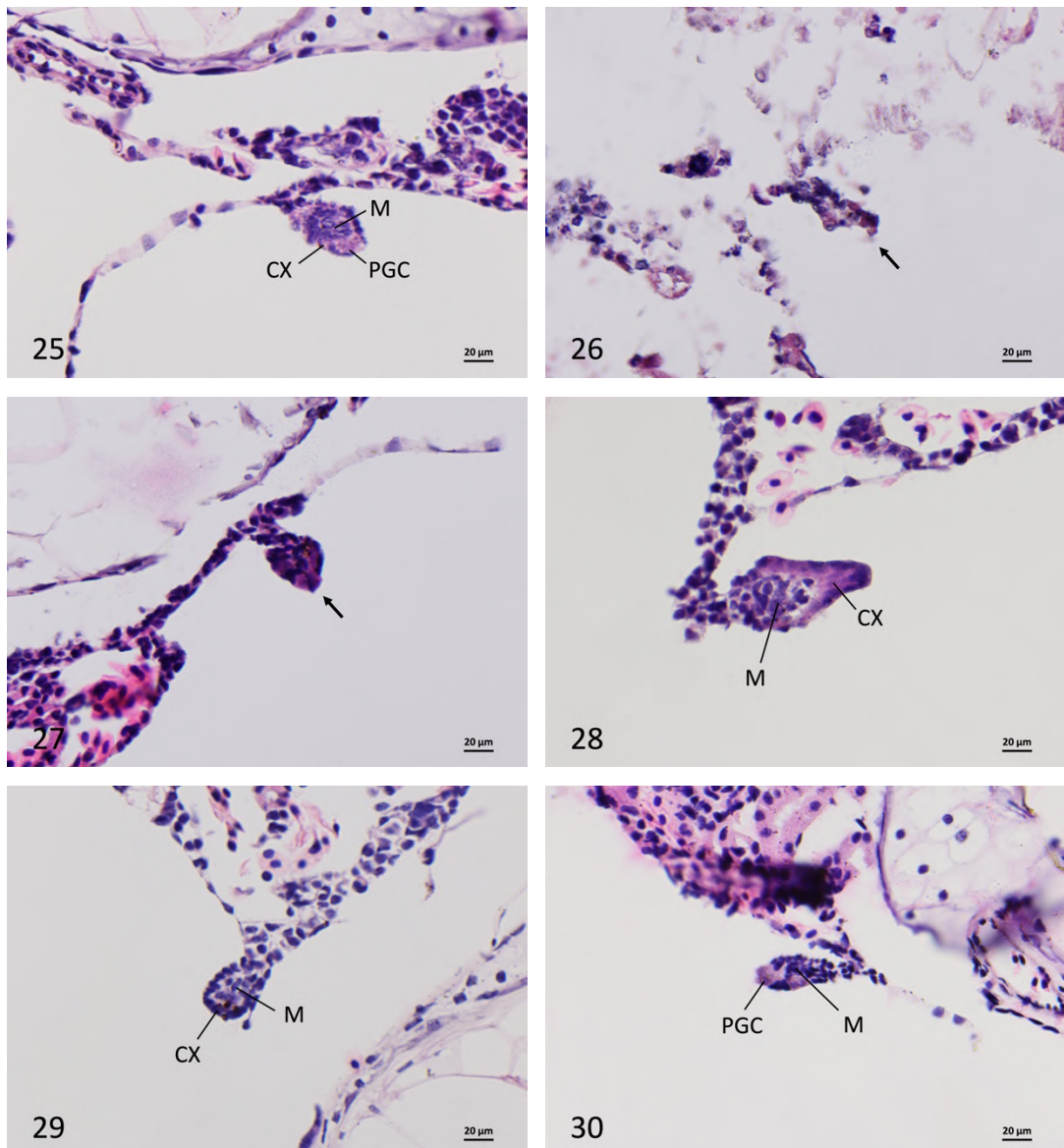
ภาพที่ 4-4 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla



ภาพที่ 4-5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายบนแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla



ภาพที่ 4-6 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla



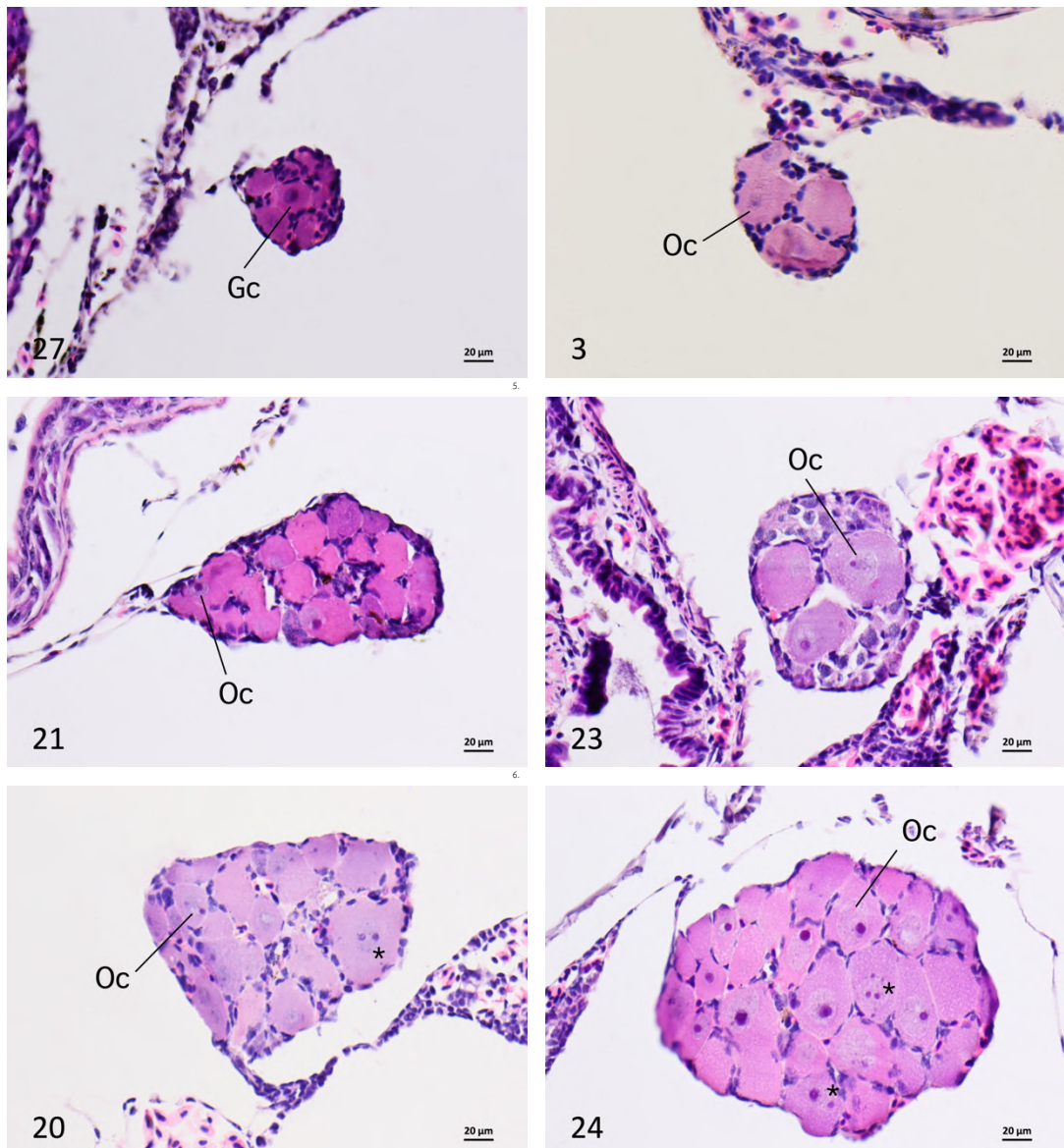
ภาพที่ 4-7 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในช่วงการเกิด genital ridge (ลูกศรสีดำ); ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; PGC = Primordial germ cell; CX = Cortex; M = Medulla

4.2.2. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* จำนวน 28 ตัว พบว่า Bidder's organ เป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ จำนวน 2 พู อยู่ทางด้าน anterior ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ไม่พบโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่แบ่งเป็น 2 ชั้น (cortico-medullary) และไม่พบ primary gonadal cavity เหมือนในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีเซลล์เซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) กระจายอยู่ท่ามกลางเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ซึ่งจะมีการขยายขนาดและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไข่ ขณะที่เซลล์ร่างกายเกิดการเสื่อมสลายไปพร้อม ๆ กัน (Altig and McDiarmid, 1999) ซึ่งรูปร่าง ขนาด และการเจริญของ Bidder's organ นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละตัว ตามภาพที่ 4-5 กล่าวคือ พบมีรูปร่างเรียวยาวถึงกลมยื่นออกมาจากส่วนของ mesentary ขนาดเล็กที่พบมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60 μm (ภาพที่ 4-9-27) ประกอบไปด้วยเซลล์ร่างกายขนาดเล็กอยู่บริเวณรอบเซลล์สืบพันธุ์ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบไปจนถึงรูปร่างกลม ขนาดใหญ่ ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 230 μm (ภาพที่ 4-9-24) ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ไข่ในระยะ diplotene และเซลล์ไข่ที่มี 2 นิวเคลียส (binuclear oocyte ในบางตัวอย่างจะสามารถสังเกตเห็น follicular cell ที่ล้อมรอบเซลล์ไข่ได้ และส่วนของ cytoplasm มี inclusion ที่ย้อมติดสีแดง



ภาพที่ 4-8 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐาน (ซ้าย) กับลักษณะทางจุลกายวิภาค (ขวา) ของ Bidder's organ ในคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ลูกศรสีดำ = Bidder's organ



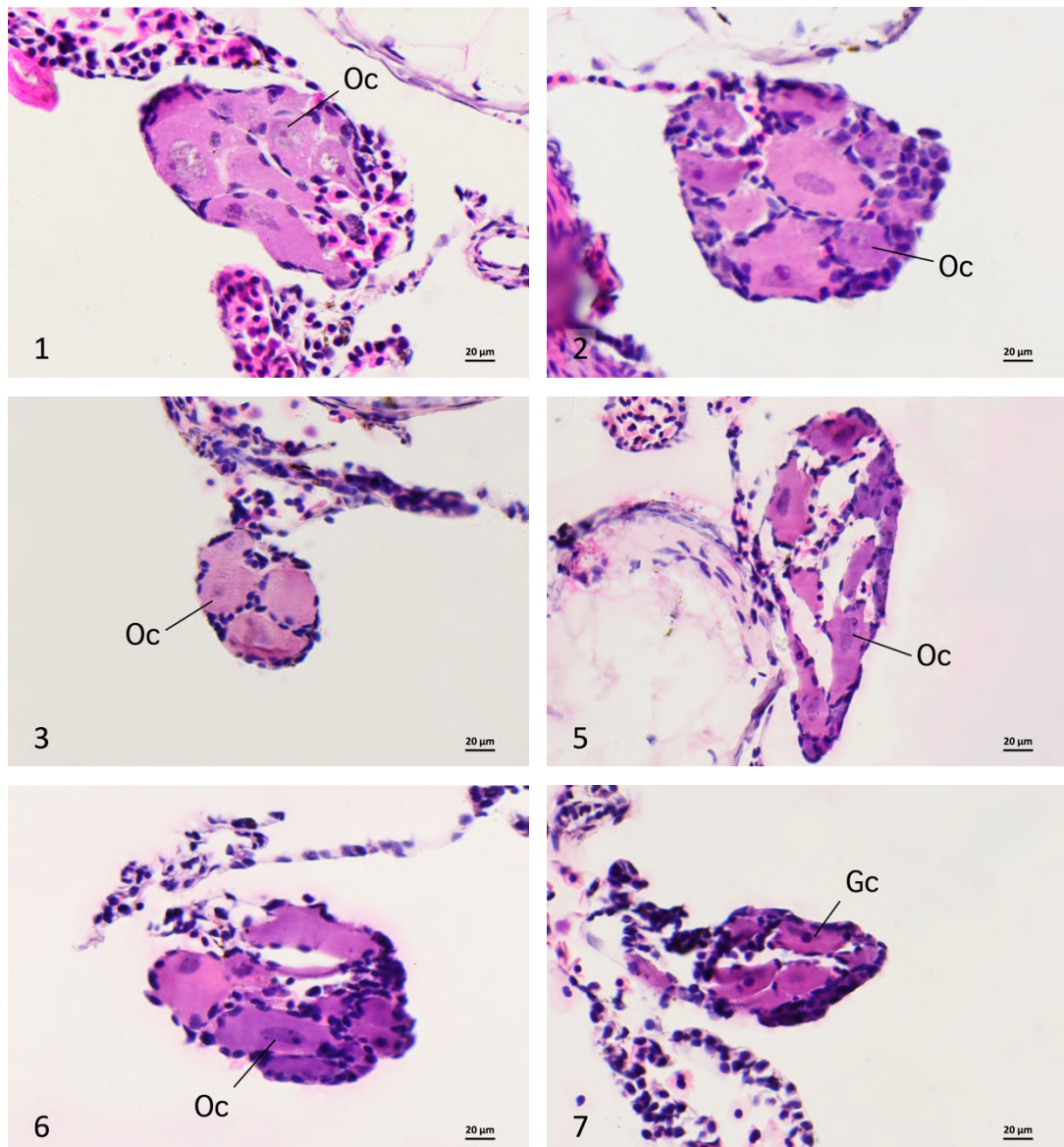
ภาพที่ 4-9 เปรียบเทียบขนาดและลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ที่พบในคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; Gc = Germ cell; Oc = Oocyte; F = Follicular cell; ดอกจัน = Binuclear oocyte

ตารางที่ 4-3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน
D. melanostictus ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ
DM 11-2019-01	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-10-1)
DM 11-2019-02	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน และ follicular cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ภาพที่ 4-10-2)
DM 11-2019-03	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-10-3)
DM 11-2019-05	พบเซลล์ไข่ และเซลล์ที่มีลักษณะเดี่ยว ซึ่งน่าจะเกิดจากขั้นตอนการเตรียม ตัวอย่าง (ภาพที่ 4-10-5)
DM 11-2019-06	พบ germ cell มีการกระจายตัวท่ามกลาง somatic cell (ภาพที่ 4-10-6)
DM 11-2019-07	พบ germ cell มีการกระจายตัวท่ามกลาง somatic cell (ภาพที่ 4-10-8)
DM 11-2019-09	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-11-9)
DM 11-2019-10	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-11-10)
DM 11-2019-11	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-11-11)
DM 11-2019-12	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน และ follicular cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ภาพที่ 4-11-12)
DM 11-2019-13	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน และ follicular cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ภาพที่ 4-11-13)
DM 11-2019-14	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-11-14)
DM 11-2019-15	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-12-15)
DM 11-2019-16	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตได้ชัดเจน และ follicular cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ภาพที่ 4-12-16)
DM 11-2019-17	พบ germ cell มีการกระจายตัวท่ามกลาง somatic cell (ภาพที่ 4-12-17)
DM 11-2019-18	พบ germ cell มีการกระจายตัวท่ามกลาง somatic cell (ภาพที่ 4-12-18)

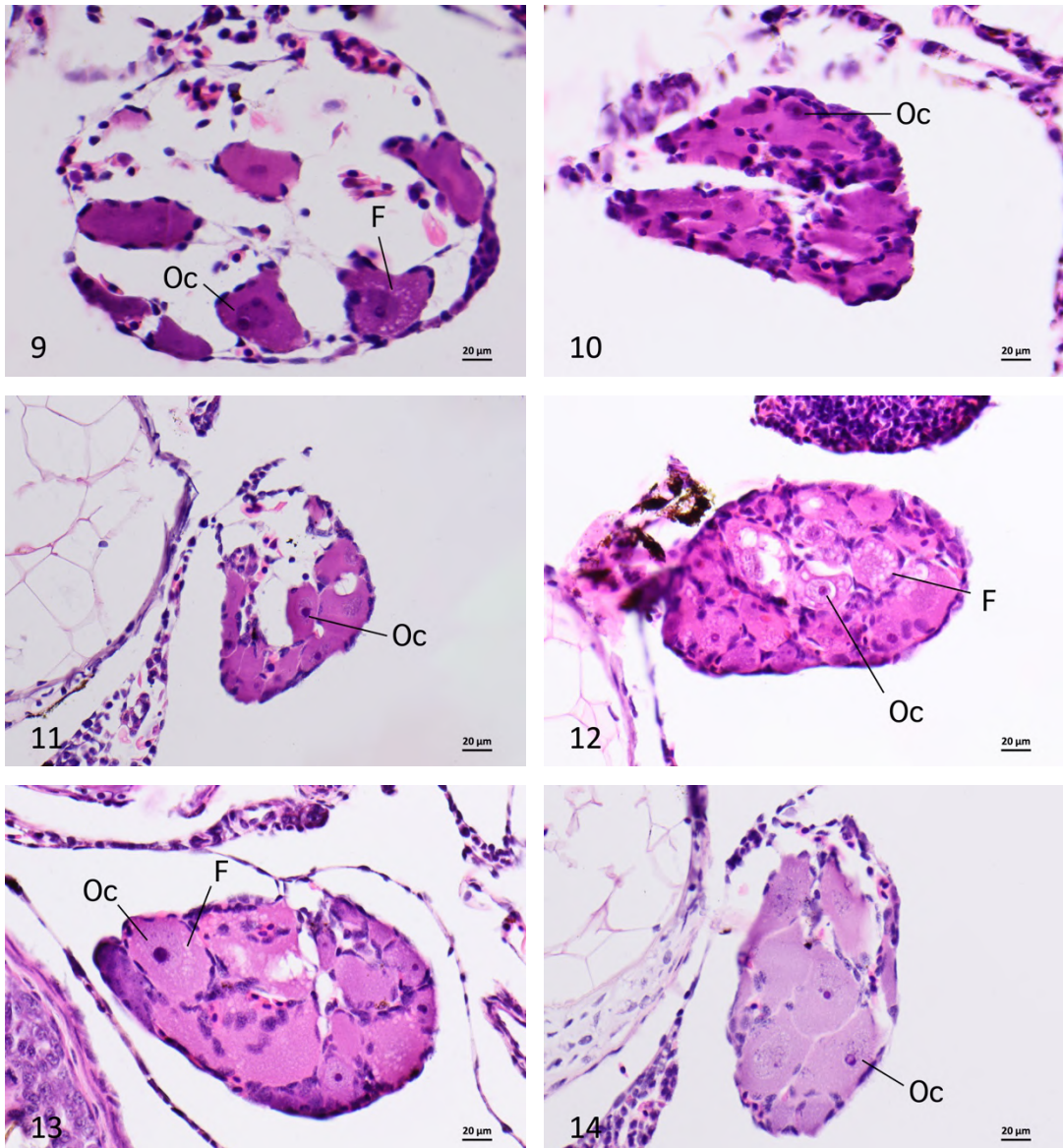
ตารางที่ 4-3 (ต่อ) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน
D. melanostictus ที่ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส

รหัสตัวอย่าง	ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ
DM 11-2019-19	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-12-19)
DM 11-2019-20	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-13-20)
DM 11-2019-21	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-13-21)
DM 11-2019-22	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-13-22)
DM 11-2019-23	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-13-23)
DM 11-2019-24	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-13-24)
DM 11-2019-25	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน นอกจากนี้ ยังพบเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียส 2 นิวเคลียส (ภาพที่ 4-13-25)
DM 11-2019-26	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตเห็นได้ (ภาพที่ 4-13-26)
DM 11-2019-27	พบ germ cell มีการกระจายตัวท่ามกลาง somatic cell (ภาพที่ 4-14-27)
DM 11-2019-28	พบเซลล์ไข่ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 4-14-28)
DM 11-2019-29	พบ somatic cell (ภาพที่ 4-14-29)
DM 11-2019-30	พบเซลล์ไข่ในระยะ diplotene ที่สามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจน และ follicular cell ล้อมรอบเซลล์ไข่ (ภาพที่ 4-14-30)



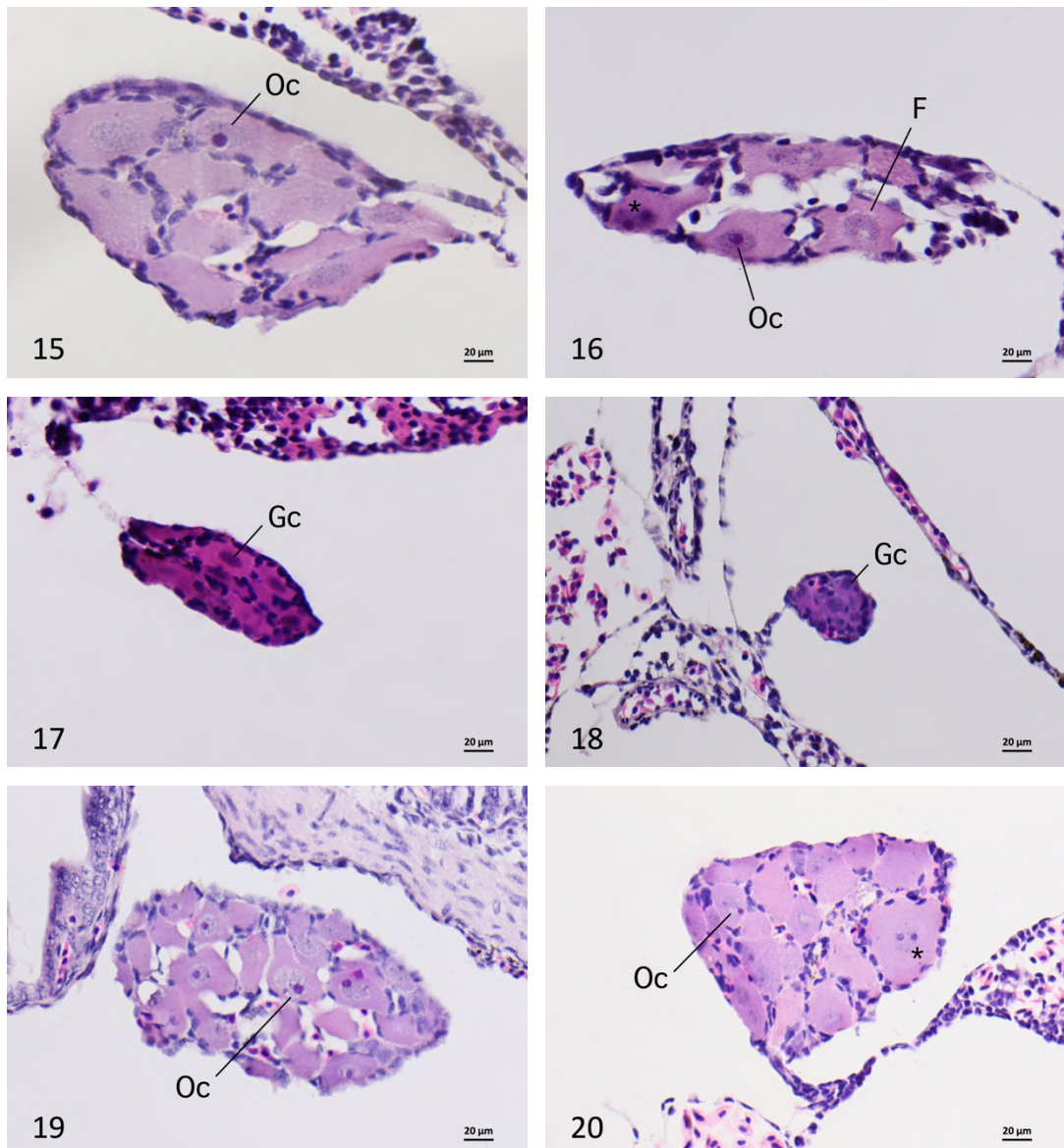
ภาพที่ 4-10 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; GC = Germ cell;

Oc = Oocyte; F = Follicular cell

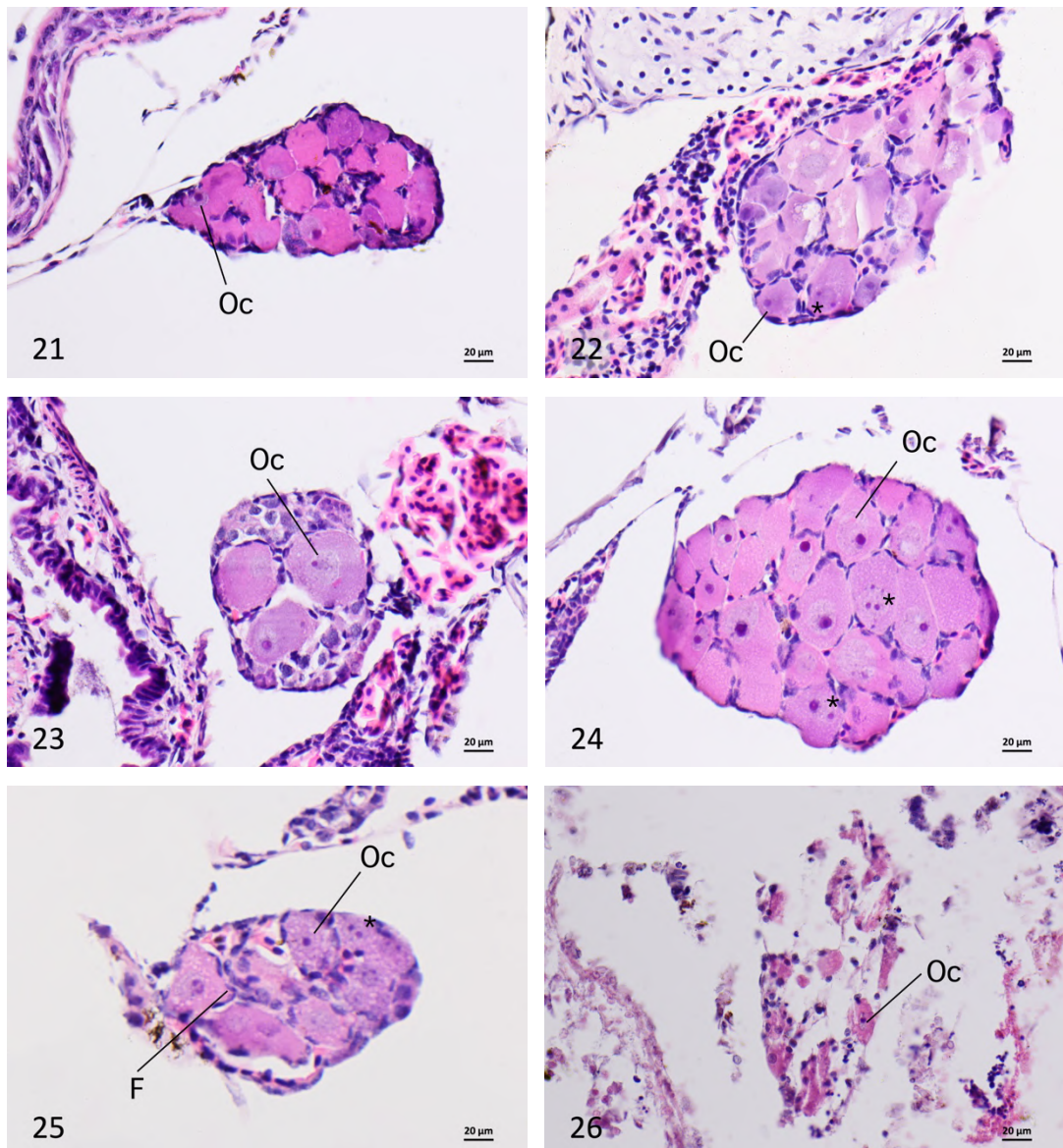


ภาพที่ 4-11 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; GC = Germ cell;

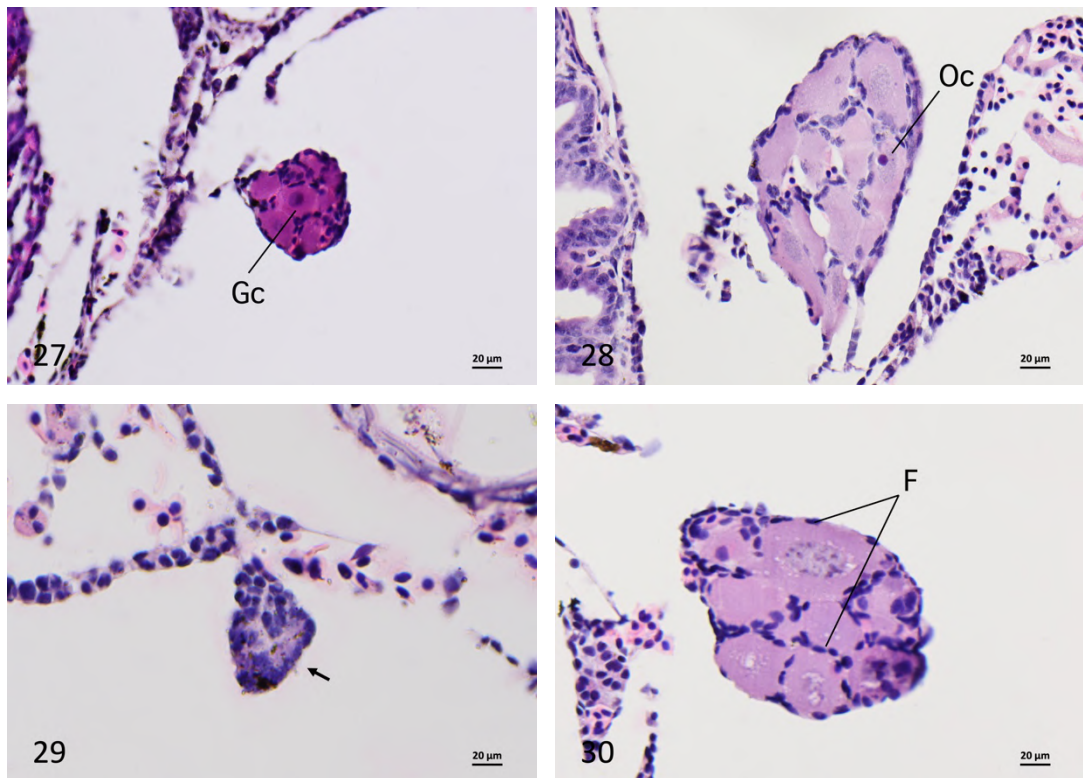
Oc = Oocyte; F = Follicular cell



ภาพที่ 4-12 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; GC = Germ cell; Oc = Oocyte; F = Follicular cell; ดอกจัน = Binuclear oocyte



ภาพที่ 4-13 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; GC = Germ cell; Oc = Oocyte; F = Follicular cell; ดอกจัน = Binuclear oocyte



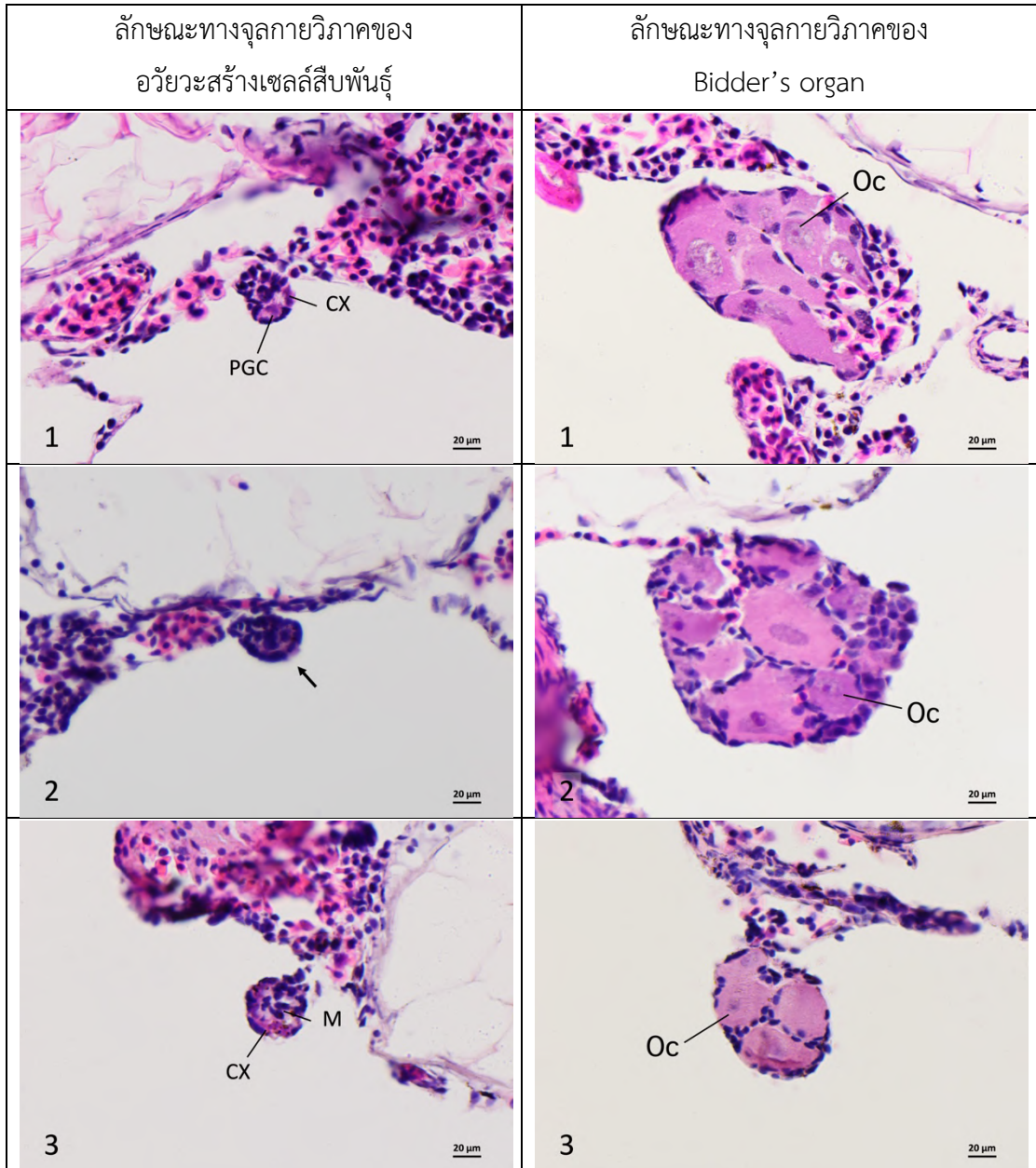
ภาพที่ 4-14 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ระยะสิ้นสุดเมทาโมρφอซิส; ตัวเลขมุมล่างซ้ายแสดง individual number; GC = Germ cell; Oc = Oocyte; F = Follicular cell; เครื่องหมายดอกจัน = Binuclear oocyte

4.3 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ

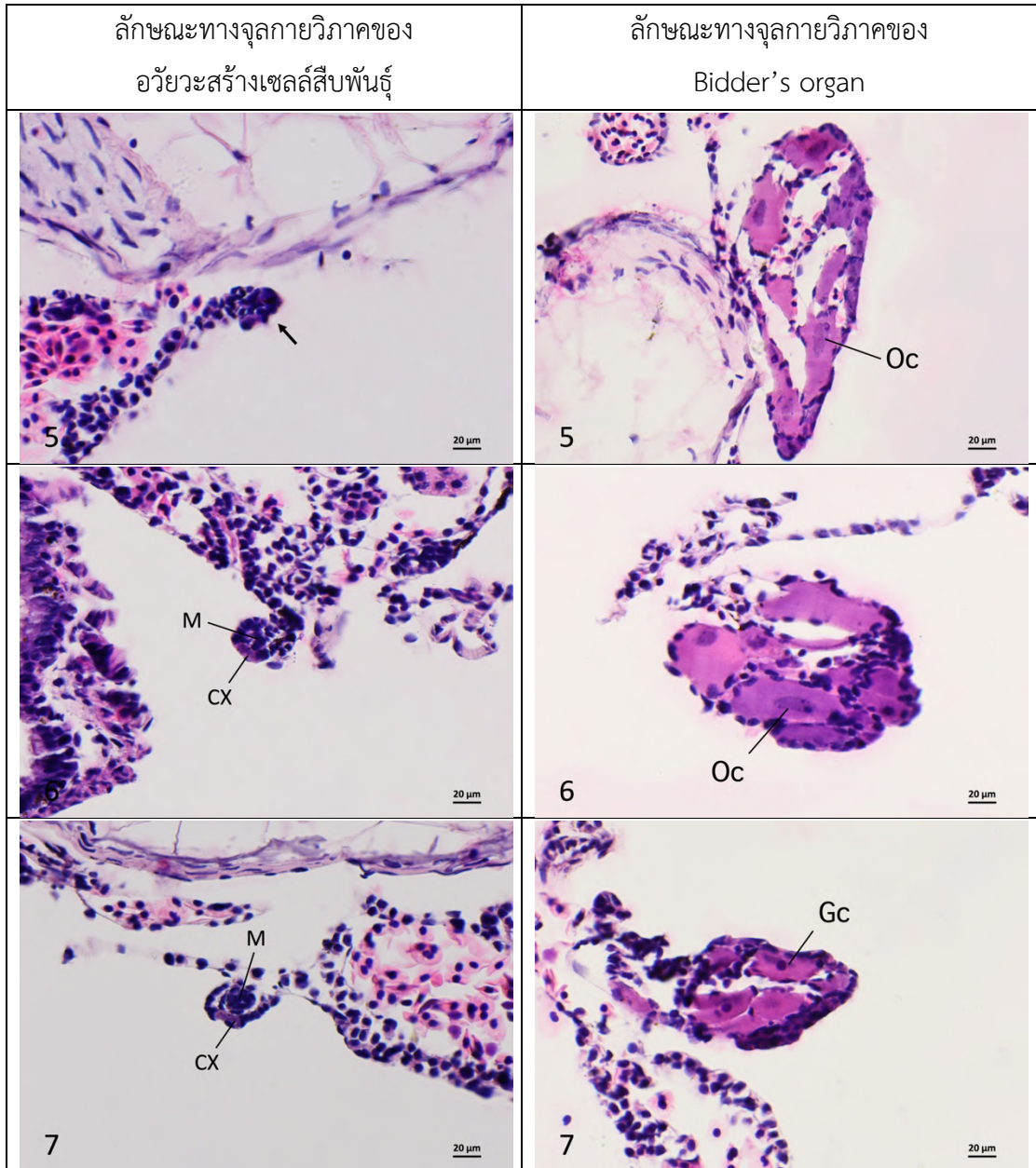
จากการเปรียบเทียบเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ โดยใช้ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาค (ตารางที่ 4-4) สามารถแบ่งกลุ่มของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 μm จำนวน 10 ตัว พบว่า ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bidder's organ เท่ากับ 70 - 230 μm
- กลุ่มที่ 2 ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 μm จำนวน 4 ตัว พบว่า ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bidder's organ เท่ากับ 60 - 200 μm
- กลุ่มที่ 3 ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40 μm จำนวน 11 ตัว พบว่า ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bidder's organ เท่ากับ 80 - 200 μm
- กลุ่มที่ 4 ขนาดของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60 μm จำนวน 3 ตัว พบว่า ช่วงของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bidder's organ เท่ากับ 100 - 180 μm

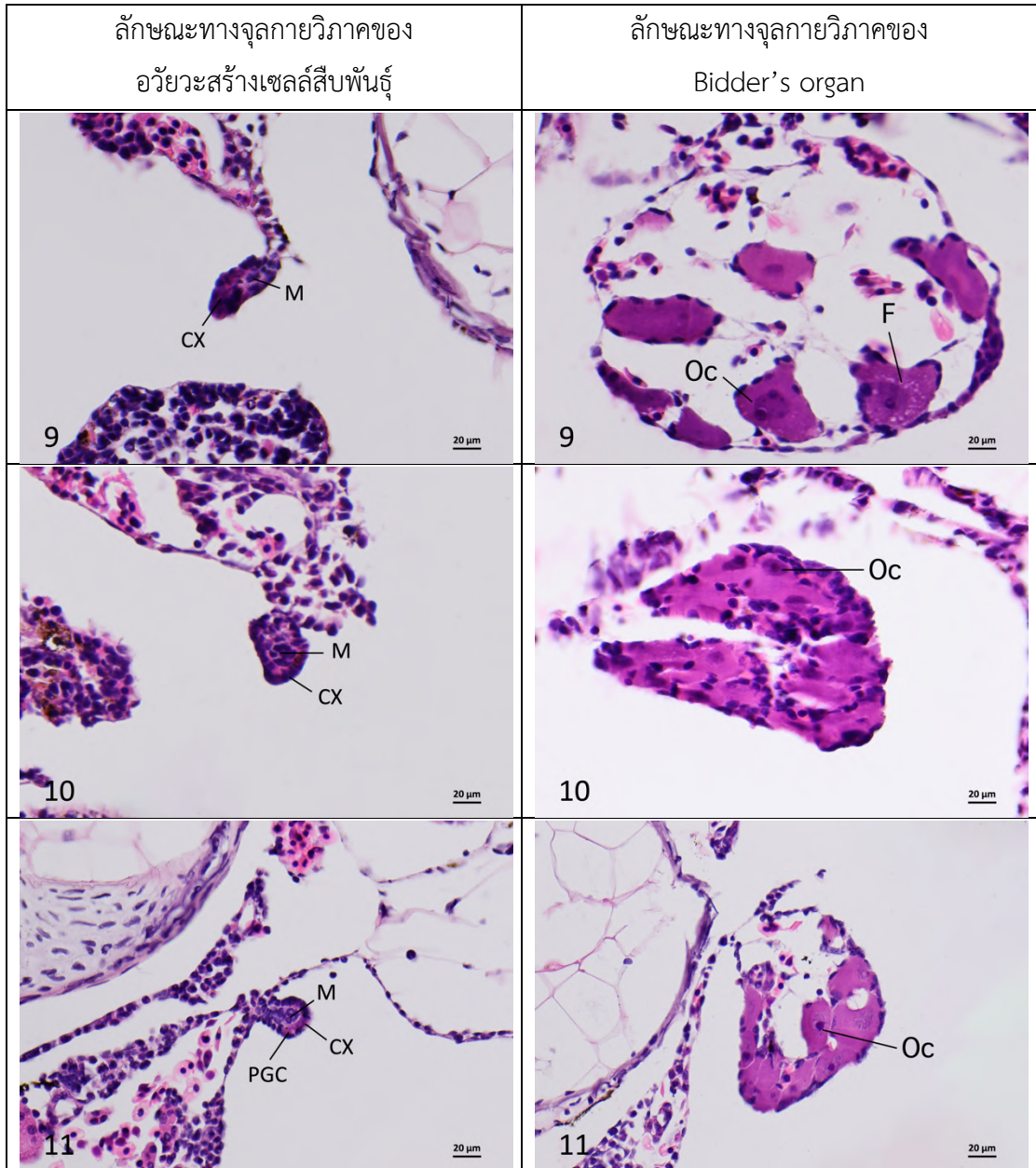
ตารางที่ 4-4 การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



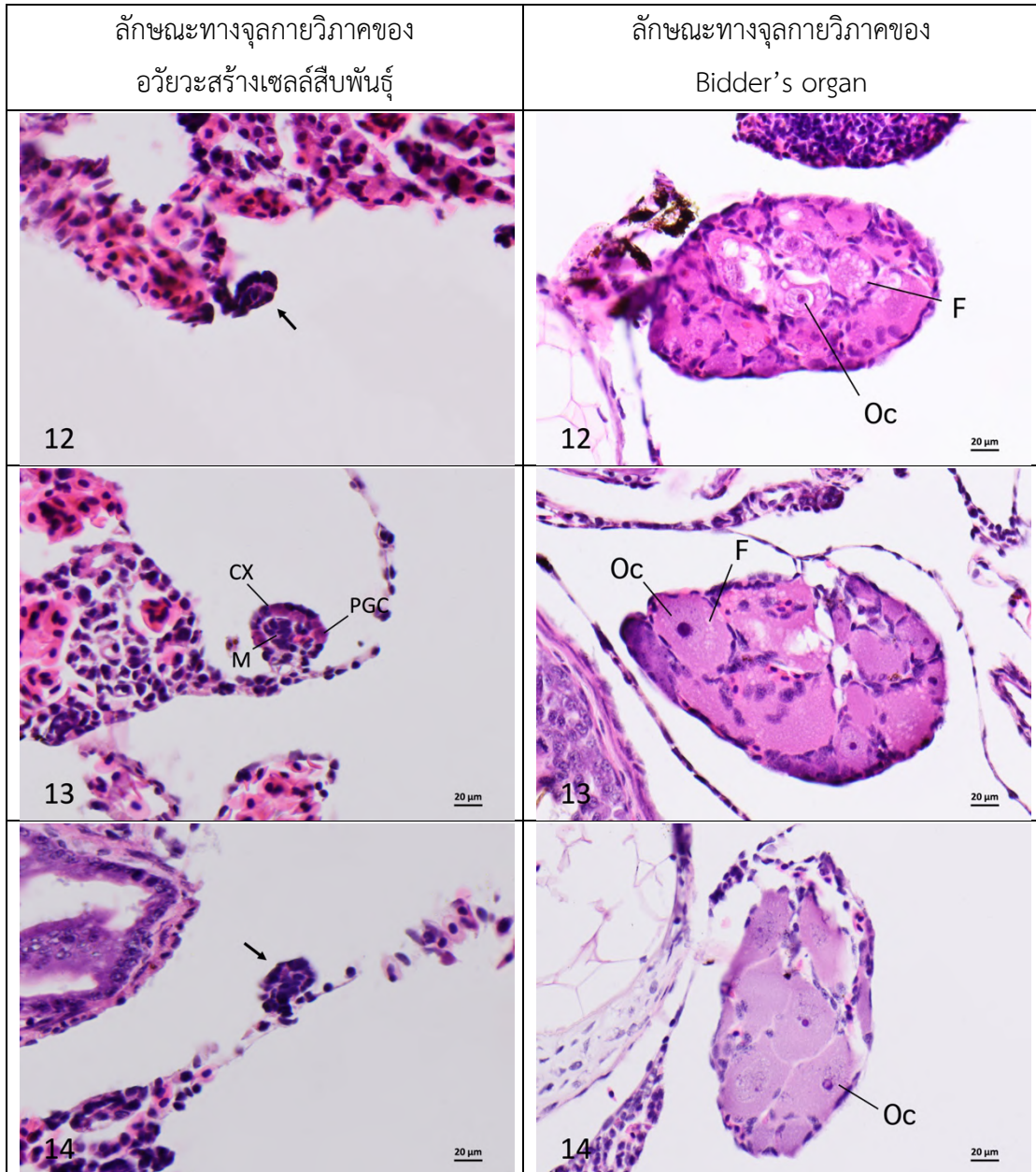
ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



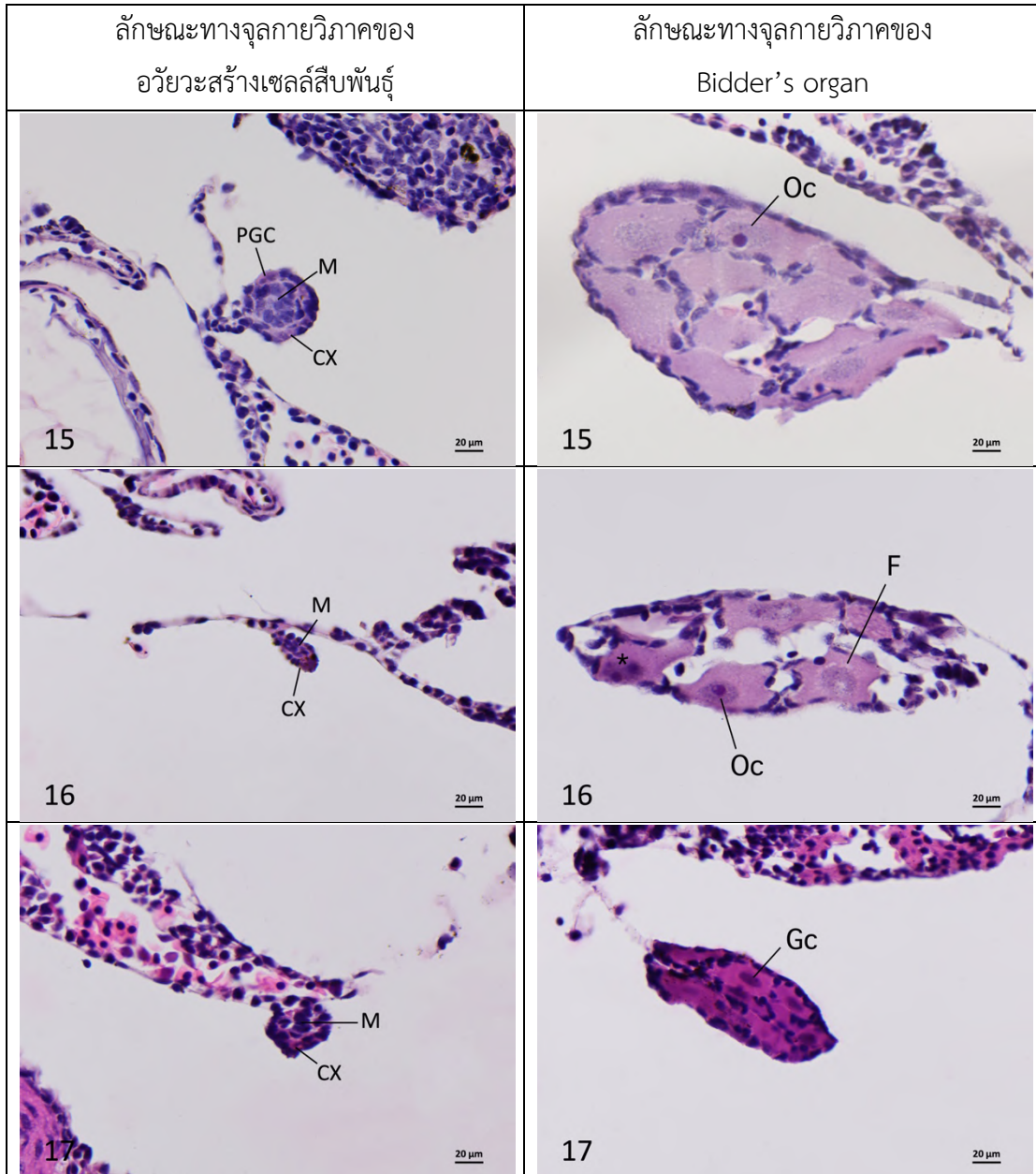
ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



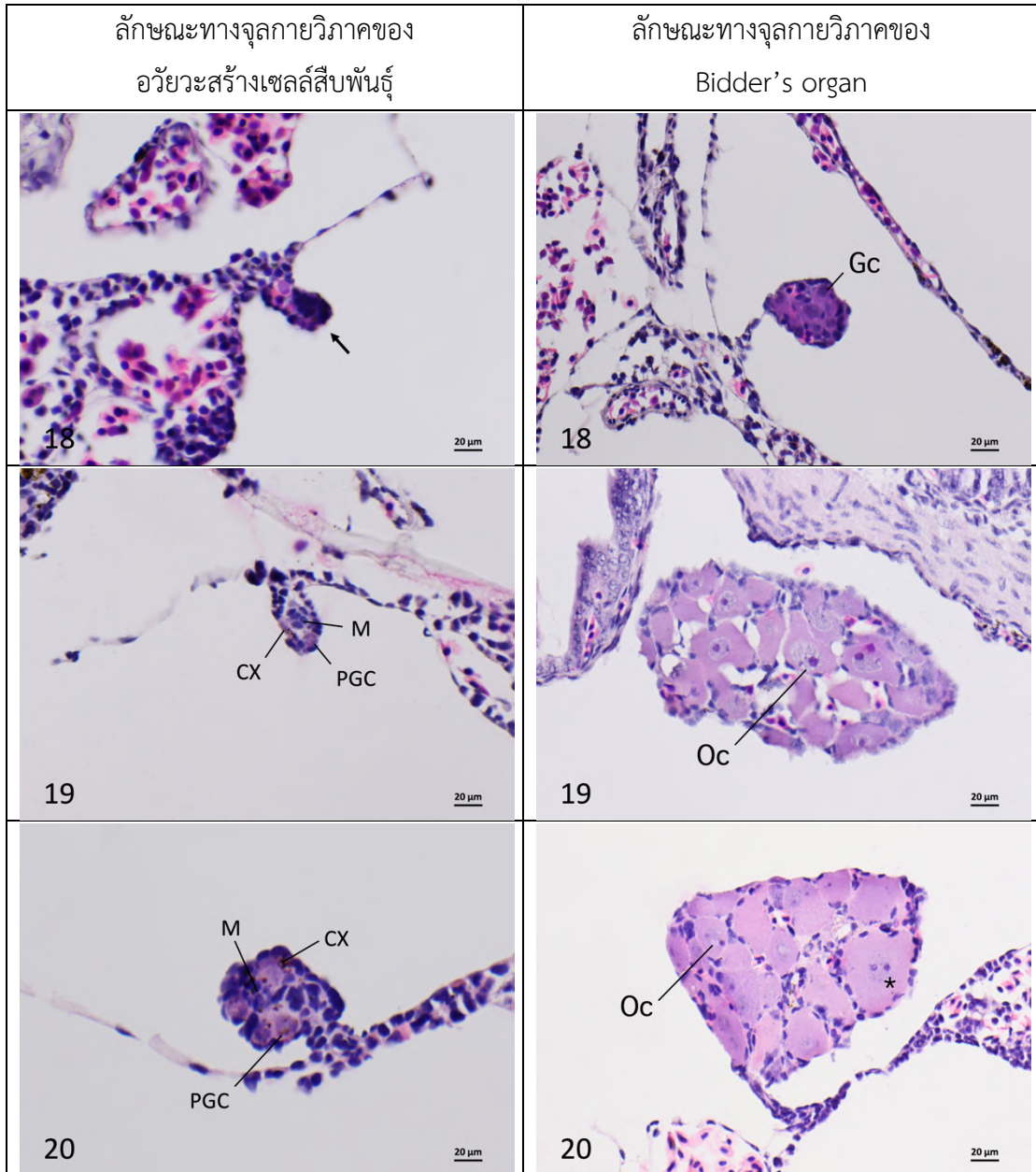
ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



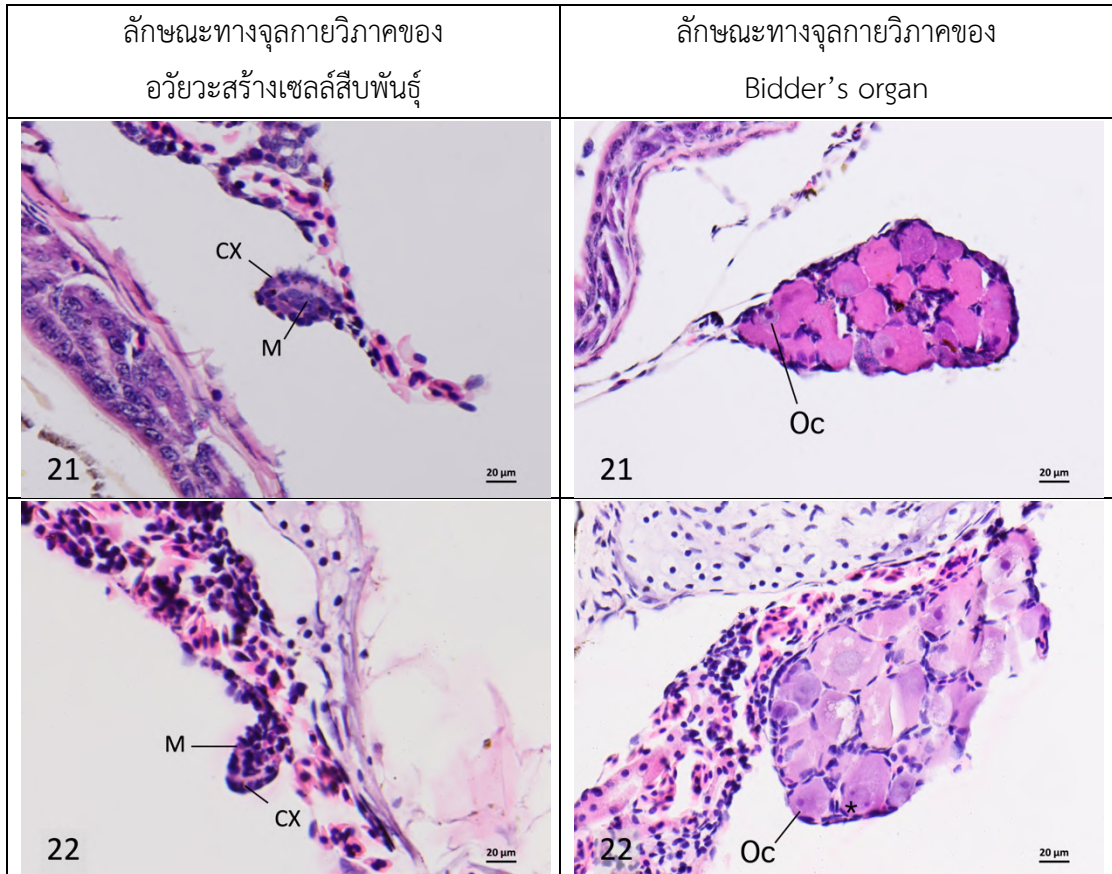
ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



ตารางที่ 4-4 (ต่อ) การเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus*



บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะที่ 46 ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส พบว่าประชากรคางคกบ้านทั้งหมด 30 ตัว ยังไม่สามารถระบุเพศในแต่ละตัวได้ คิดเป็น 100% เนื่องจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะ indifferent gonad ลักษณะสำคัญที่สังเกตได้ คือ เนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ เนื้อเยื่อชั้นนอก (cortex) และเนื้อเยื่อชั้นใน (medulla) และพบ primordial germ cell ซึ่งลักษณะที่ปรากฏในแต่ละตัวจะมีความแตกต่างกันออกไป แต่ทั้งหมดยังไม่แยกเป็น ovary หรือ testis จากการศึกษาการเจริญเพื่อแยกเพศในคางคก *Bufo bufo* ของ Falconi และคณะ (2004) พบว่าการเจริญของ genital bodies เริ่มต้นขึ้นในระยะที่ 29 ซึ่งมีการสร้างช่องว่างที่หนาเกิดขึ้นจากเซลล์ร่างกายและเซลล์สืบพันธุ์บริเวณ mesogonium แต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จนถึงระยะที่ 39 และเริ่มมีการแยกเพศในระยะที่ 40 เป็นต้นไป ซึ่งแตกต่างจากผลที่ได้ในคางคกบ้าน *D. melanostictus* เช่นเดียวกับการศึกษาการเจริญของรังไข่ในระยะตัวอ่อนของ *Bufo viridis* ของ Beccari (1925) ที่พบการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เริ่มต้นขึ้นในระยะที่ 29 และเริ่มมีการแยกเพศในระยะที่ 40 เป็นต้นไป จึงเป็นไปได้ว่าการเจริญเพื่อแยกเพศของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในคางคกบ้านนั้น มีการเจริญที่ช้ากว่าสปีชีส์อื่น ๆ ในกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน

สำหรับผลการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศตามการศึกษาของ Witschi (1929) พบว่าประชากรทั้งหมด เมื่อสิ้นสุดเมทาโมอร์โฟซิส มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็น indifferent gonad ทำให้ไม่สามารถระบุรูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศของคางคกบ้านได้ที่ระยะดังกล่าว เนื่องจากไม่สามารถระบุเพศเพื่อนำไปสู่การหาสัดส่วนของเพศเมียต่อเพศผู้ในประชากรได้ จากรายงานการศึกษาของ Katti และ Ghodageri (2012) ที่ทำการศึกษการเปลี่ยนรูปของ Bidder's organ สู่รังไข่ในคางคกบ้าน *Bufo melanostictus* จากการได้รับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อเป็นเวลานาน พบว่ามีการยุติการทดลองเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือนหลังจากสิ้นสุดกระบวนการเมทาโมอร์โฟซิสของลูกอ๊อดคางคกบ้าน ซึ่งสัดส่วนเพศเมียต่อเพศผู้ในประชากรชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ คิดเป็น 60:40 แต่ไม่ได้มีการระบุจำนวนประชากรในการทดลอง อาจสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่า รูปแบบการกำหนดเพศในคางคกบ้าน *D. melanostictus* เป็นแบบ differentiated type ตามการศึกษาของ Witschi (1929) นั่นคือเมื่อเกิดกระบวนการเมทาโมอร์โฟซิสสมบูรณ์จะพบอวัยวะสร้างเซลล์

สืบพันธุ์ที่สามารถแยกเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยที่อัตราส่วนของเพศผู้และเพศเมียจะใกล้เคียงกัน แต่สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ได้มีการยุติการทดลองเมื่อลูกอ๊อดคางคกบ้านเจริญจนถึงระยะสิ้นสุดเมทาเมอร์โพซิสแล้วเท่านั้น ซึ่งเป็นช่วงสิ้นสุดของระยะที่ 45 เข้าสู่ระยะที่ 46 ตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) ไม่ได้มีการติดตามการเจริญภายหลังระยะดังกล่าว จึงควรมีการศึกษาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะหลังสิ้นสุดเมทาเมอร์โพซิส เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบของการเจริญเพื่อแยกเพศที่แน่ชัด

จากผลการศึกษาจุลกายวิภาคของ Bidder's organ ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะที่ 46 ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดเมทาเมอร์โพซิส พบว่า Bidder's organ เป็นโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ จำนวน 2 พู อยู่ทางด้าน anterior ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ไม่พบโครงสร้างของเนื้อเยื่อ cortico-medullary และการสร้าง primary gonadal cavity เหมือนในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ส่วนของเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) ที่มีการกระจายอยู่ท่ามกลางเซลล์ร่างกาย (somatic cell) จะมีการขยายขนาดและเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ไข่ ขณะที่เซลล์ร่างกายเกิดการเสื่อมสลายไปพร้อม ๆ กัน ส่วนของรูปร่าง ขนาด และการเจริญของ Bidder's organ นั้นมีความแตกต่างกันออกไปในแต่ละตัว ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการบรรยายลักษณะของ Bidder's organ ที่มีการศึกษาใน *Bufo japonicus formosus* โดย Tanimura และ Iwasawa (1986, 1987) นอกจากนี้ยังได้มีการอธิบายเพิ่มเติมถึงการเจริญที่สามารถพบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในระยะที่ 24-25 ของตัวอ่อนตามเกณฑ์ของ Gosner (1960) เมื่อเกิดช่องว่างเล็ก ๆ บริเวณตรงกลางของ Bidder's organ จะเกิดเหตุการณ์การสร้าง secondary ovarian cavity ขึ้นภายในรังไข่ไปพร้อม ๆ กัน เมื่อถึงระยะก่อนเมทาเมอร์โพซิส เซลล์สืบพันธุ์จะมีการเพิ่มขนาดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายกับเซลล์ไข่ในระยะ diplotene และเพิ่มจำนวนจนกระทั่งเข้าสู่ระยะเมทาเมอร์โพซิส จากนั้นจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ซึ่งระยะเวลาในการเจริญภายในเพศเมียและเพศผู้มี ความใกล้เคียงกัน

Ogielska (2009) กล่าวว่า Bidder's organ สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายในคางคกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย เนื่องจากโครงสร้างดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกับรังไข่มากกว่าอณฑะ ด้วยเหตุนี้เอง Bidder's organ จึงมักนำมาใช้ในการอธิบายลักษณะของคางคกเพศผู้ในเบื้องต้น แม้ว่า Bidder's organ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกจะเป็นที่รู้จักมาอย่างยาวนาน ตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 แต่ข้อมูลเกี่ยวกับอวัยวะดังกล่าวยังคงขาดแคลนอยู่และยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัดถึงหน้าที่ การเจริญ รวมไปถึงโครงสร้างของอวัยวะดังกล่าว อาจเป็นเพราะเมื่อ diplotene oocyte ในรังไข่ปรากฏขึ้น เซลล์ไข่ใน Bidder's organ จะค่อย ๆ เสื่อมสภาพลง จึงทำให้บทบาทและหน้าที่ของเซลล์เหล่านั้นยังไม่เป็นที่ทราบได้ อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอณฑะกับ Bidder's organ โดยการเอาอณฑะของเพศผู้ออกทั้งสองข้าง และมีการให้

gonadotropin เพื่อกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนและเซลล์สืบพันธุ์ใน Bidder's organ ปรากฏว่า เซลล์ไข่สามารถเข้าสู่ระยะ pre-vitellogenic ได้ แต่ไม่ได้มีการเจริญต่อในระยะถัดไป นำไปสู่ข้อสันนิษฐานที่ว่า Bidder's organ น่าจะมีตัวรับ gonadotropin และมีการตอบสนองที่คล้ายคลึงกับรังไข่ แต่หน้าที่ดังกล่าวนั้นถูกยับยั้งด้วยอินทชะ (Pancak-Roessler and Norris, 1991)

สำหรับ Bidder's organ ในคางคกบ้าน *D. melanostictus* พบประวัติการศึกษาลักษณะ สัณฐาน และขนาดในระยะตัวเต็มวัย โดย Alexander (1932) ได้มีการเปรียบเทียบขนาดของ Bidder's organ ในตัวอย่างคางคกบ้าน จำนวน 68 ตัว โดยศึกษาในเพศเมียจำนวน 47 ตัวและเพศผู้ 21 ตัว ซึ่งสามารถพบอวัยวะดังกล่าวได้ทุกตัวในตัวอย่างเพศผู้ แต่จะพบได้เฉพาะบางตัวเท่านั้นในเพศเมีย อาจจะเป็นไปได้ถึงแนวโน้มของ Bidder's organ ในคางคกบ้านที่อาจจะเจริญไปเป็นเพศเมียจะพบการเจริญน้อยกว่าในเพศผู้

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ในระยะที่ 46 ซึ่งเป็นระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส จำนวนทั้งหมด 30 ตัว จากแหล่งน้ำบริเวณ คณะครุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บตัวอย่างคางคกบ้านในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ ระหว่างเดือนตุลาคม ถึง เดือนพฤศจิกายน ปี พ.ศ. 2562 พบว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็น indifferent gonad ที่อยู่ในช่วงของการสร้าง genital ridge เท่ากับ 30/30 ตัว (100%) ลักษณะสำคัญที่พบ ได้แก่ เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ เนื้อเยื่อชั้นใน (medulla) และเนื้อเยื่อชั้นนอก (cortex) อีกทั้งยังสามารถสังเกตเห็น primordial germ cell ปรากฏอยู่บริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอก (cortex) ซึ่งโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะดังกล่าว ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศ จึงไม่สามารถระบุได้ว่ารูปแบบการเจริญเพื่อแยกเพศของคางคกบ้าน *D. melanostictus* เป็นรูปแบบใดที่ระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิส

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานของลักษณะทางจุลกายวิภาคในคางคกบ้าน *D. melanostictus* สำหรับการศึกษาที่ใช้คางคกบ้านในระยะที่มีความใกล้เคียงกันกับการทดลองนี้

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

จากการศึกษาในครั้งนี้ ยังไม่สามารถทราบได้ว่ารูปแบบการเจริญเพื่อกำหนดเพศของคางคกบ้าน *D. melanostictus* ที่ระยะสิ้นสุดเมตามอร์โฟซิสเป็นรูปแบบใดตามการศึกษาของ Witschi (1929) อาจจะต้องมีการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มเติมที่ระยะถัดจากเมตามอร์โฟซิสสมบูรณ์ ซึ่งอาจจะใช้เวลา 25-30 วัน หลังจากเข้าสู่ระยะที่ 46 ของคางคกบ้าน *D. melanostictus* เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงเพื่อแยกเพศของโครงสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีคำถามที่น่าสนใจเกี่ยวกับการเจริญ รวมไปถึงหน้าที่ของ Bidder's organ ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานหรือคำอธิบายที่ชัดเจนถึงหน้าที่ของอวัยวะดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมจาก

ที่กล่าวไว้ข้างต้น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกกลุ่มคางคกไปเป็น สัตว์ทดลองที่ดีต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ภาษาอังกฤษ

- Alexander, G. 1932. Bidder's Organ in *Bufo melanostictus* Schneider. Copeia. 1932(2): 78-80.
- Alexander, G. 1933. Secondary Sexual Characters of *Bufo melanostictus* Schneider. Copeia. 1933(4): 204-207. doi:10.2307/1435557.
- Altig, R. and McDiarmid, R. W. (Eds.). 1999. Tadpoles: the biology of anuran larvae. University of Chicago Press.
- Gomes, A. Giri, B., Alam, A., Mukherjee, S., Bhattacharjee, P. and Gomes, A. 2011. Anticancer activity of a low immunogenic protein toxin (BMP1) from indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract. Toxicon. 58(1): 85-92.
- Eggert, C. 2004. Sex determination: the amphibian models. Reproduction Nutrition Development. 44: 539-549.
- Falconi, R., Dalpiaz, D. and Zaccant, F. 2004. Ultrastructural aspects of gonadal morphogenesis in *Bufo bufo* (Amphibia Anura) 1. Sex differentiation. Journal of Experimental Zoology. 301A: 378-388.
- Fernando, V. A. K., Weerasena, J., Lakraj, G. P., Perera, I. C., Dangalle, C. D., Handunnetti, S., Premawansa, S. and Mayuri R, W. 2016. Lethal and sub-lethal effects on the Asian common toad *Duttaphrynus melanostictus* from exposure to hexavalent chromium. Aquatic Toxicology. 177: 98-105.
- Flament, S., Chardard, D., Chesnel, A., and Dumond, H. 2011. Sex determination and sexual differentiation in amphibians. In Hormones and Reproduction of Vertebrates. (pp. 1-19). Academic Press.
- Flament, S. 2016. Sex Reversal in Amphibians. Sexual development. 10: 267-278.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetologica. 16(3): 183-190.
- Goswami, G., Baruah, B. K. and Sengupta, S. 2016. Effect of municipal wastewater on Catalase enzyme in the larval stages of *Duttaphrynus melanostictus* (Schneider 1799). International Multidisciplinary Journal. 5(2): 21-23.

- Katti, P. and Ghodageri, M. 2012. Transformation of Bidder's organ into ovary in tadpoles of *Bufo melanostictus* chronically exposed to endocrine disrupters. Biology of Reproduction. 87(Suppl_1): 166-166.
- Khan, M.S. 1991. Morphoanatomical specialization of the buccopharyngeal region of the anuran larvae and its bearing on the mode of larval feeding. Unpublished Ph.D. dissertation, University of the Punjab, Lahore, Pakistan.
- Mogali, S. M., Saidapur, S. K., & Shanbhag, B. A. 2011. Levels of predation modulate antipredator defense behavior and metamorphic traits in the toad *Bufo melanostictus*. Journal of Herpetology. 45(4): 428-431.
- Ogielska, M. 2009. Bidder's organ. Reproduction of amphibians. 4: 42-43.
- Pressnell, J.K. and Schreibman, M.P. 1997. Humason's Animal Tissue Techniques. 5Th ed. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.
- Pancak-Roessler, M.K. and Norris, D.O. 1991. The Effects of Orchidectomy and Gonadotropins on Steroidogenesis and Oogenesis in Bidder's Organs of the Toad *Bufo Woodhousii*. The Journal of experimental zoology. 260(3): 323-336. <https://doi.org/10.1002/jez.1402600307>
- Piprek, R. P., Kloc, M., and Kubiak, J. Z. 2014. Bidder's organ – structure, development and function. The International Journal of Developmental Biology. 58: 819-827.
- Neerati, R., Meesala, A., Talari, S., Neearti, P. and Yanamala, V. 2014. Cardiotoxic activity of parotoid gland secretion of common Indian toad *Bufo melanostictus* on isolated heart of frog. The Journal of Pharmacy. 4: 61-67.
- Sharma, A. and Purkait, B. 2013. Quality assessment of serially ultradiluted and agitated drug digitalis purpurea by emission spectroscopy and clinical analysis of Its effect on the heart rate of Indian *Bufo melanostictus*. Journal of Pharmaceutics. 2013: doi.org/10.1155/2013/571464.
- Taninura, A. and Iwasawa, H. 1986. Development of gonad and Bidder's organ in *Bufo japonicus formosus*: Histological observation. Science report of Nigata University. (23)D: 11-21.
- Taninura, A. and Iwasawa, H. 1987. Germ cell kinetics in gonadal development in the toad *Bufo japonicus formosus*. Zoological science. 4: 657-664.

- 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.
- van Dijk, P.P. and Iskandar, D. 2004. *Duttaphrynus melanostictus* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of threatened species. 2004: e.T54707A86445591.
- Witschi, E. 1929. Study on sex differentiation and sex determination in amphibians. Journal of Experimental Zoology. 54(2): 164-189.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 สูตรการเตรียมสารเคมีและสีย้อม

การเตรียม 10% neutral buffered formalin

- | | | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-----------|
| 1) 10% formalin | 1,000 | มิลลิลิตร |
| (จากการผสม Formalin หรือ 40% formaldehyde ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เข้ากับน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร) | | |
| 2) NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 4 | กรัม |
| 3) Na ₂ HPO ₄ | 6.5 | กรัม |

การเตรียม Delafield's hematoxylin

- | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1) hematoxylin | 4.0 | กรัม |
| 2) absolute ethanol | 25 | มิลลิลิตร |
| 3) ammonium aluminium sulfate
NH ₄ Al(SO ₄) ₂ · H ₂ O | ประมาณ 1 ส่วน alum ต่อ 11 ส่วนของน้ำกลั่น
หรือประมาณ 6 กรัม/น้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร | |

จากนั้นนำสารที่เตรียมได้เก็บใส่ flask นำไปตั้งทิ้งไว้ในที่มีแสงเป็นเวลา 3 - 5 วัน นำมากรอง แล้วเติม glycerine 100 มิลลิลิตร และ methanol 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อให้สีย้อมคงตัวและเก็บสีย้อมไว้ในขวดเก็บสารเคมีที่ปิดสนิท

(Humason, 1967)

การเตรียม 1% eosin

- | | | |
|------------------------------|------|-----------|
| 1) eosin Y (C.I.45380, BDH®) | 1.0 | กรัม |
| 2) 70% ethanol | 1000 | มิลลิลิตร |
| 3) lacial acetic acid | 5 | มิลลิลิตร |

สีย้อมที่นำมาใช้คือ 0.5% eosin เตรียมได้จาก

1% eosin มาเจือจางด้วย 70% ethanol แล้วเติม acetic acid 2-3 หยด

(Humason, 1967)

สารเคมีสำหรับการทำสไลด์ถาวรด้วยวิธี paraffin method

- 10% neutral buffered formalin
- 70% ethanol
- 90% ethanol
- 95% ethanol
- n-butanol
- xylene
- paramat extra (Paraffin wax blended with synthetic polymer and DMSO, Gurr[®])
- egg albumin solution (เตรียมจาก egg albumin ปริมาณ 1 หยด ต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

สารเคมีสำหรับการย้อมสี hematoxylin และ eosin

- xylene
- n-butanol
- 95% ethanol
- 90% ethanol
- 70% ethanol
- hematoxylin
- eosin
- differentiation (เตรียมจาก conc. HCl ปริมาณ 4 หยด ลงใน 70% ethanol ปริมาณ 100 มิลลิลิตร)
- Permount[®]