ผลของสารสกัดหยาบกระเทียม กวาวเครือขาว และกวาวเครือแดงต่อการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กบนา (*Rana rugulosa*) หลังผสมพันธุ์วางไข่

Effects of *Allium sativum*, *Pueraria mirifica* and *Butea superba* Crude Extract on Oocyte Development of Female Common Lowland Frog (*Rana rugulosa*) Broodstocks after Spawning

ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม[1*], สมบูรณ์ หน่อคำ[1], เทพพิทักษ์ บุญทา[1], อภินันท์ สุวรรณรักษ์[1] และ รักพงษ์ เพชรคำ[2]

Khajornkiat Srinuansom[1*], Somboon Norkham[1], Teppitag Boonta[1], Aphinun Suvarnaraksha[1] and Rakpong Petkam[2]

บทคัดย่อ: การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบกระเทียม กวาวเครือขาว และกวาวเครือแดงต่อการพัฒนาไข่ (oocyte) ของแม่พันธุ์กบนา (*Rana rugulosa*) หลังผสมพันธุ์วางไข่ โดยสุ่มแม่พันธุ์กบนาที่เพิ่งผสมพันธุ์วางไข่ จำนวน 36 ตัว มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 297.58 ± 8.77 ก. มาเลี้ยงด้วยอาหารปลาดุกสำเร็จรูป ระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 30% จำนวน 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ คือ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารปลาดุกสำเร็จรูป (CF) (ชุดควบคุม) และชุดการทดลองที่ 2-4 อาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบกระเทียม (CFA) กวาวเครือขาว (CFP) และกวาวเครือแดง (CFB) ที่ความเข้มข้น 200 มล./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน โดยเมื่อสิ้นสุดการทดลองเก็บตัวอย่างแม่พันธุ์กบนาในแต่ละชุดการทดลองมาชั่งน้ำหนักตัว ศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศ ระยะพัฒนาของไข่ และปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) ในพลาสมา ผลการศึกษาพบว่าแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงด้วยอาหาร CFP มีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศและปริมาณฮอร์โมน E_2 เฉลี่ยมากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีการพัฒนาไข่ดีกว่าแม่พันธุ์กบนาในชุดการทดลองอื่น โดยพบระยะพัฒนาของไข่ส่วนใหญ่เจริญอยู่ในระยะ vitellogenic และ fully grown stage

คำสำคัญ: แม่พันธุ์กบนา, การพัฒนาไข่, กระเทียม, กวาวเครือขาว, กวาวเครือแดง

ABSTRACT: This study was aimed to investigate effects of *Allium sativum*, *Pueraria mirifica* and *Butea superba* crude extract on oocyte development of female common lowland frog (*Rana rugulosa*) broodstock after spawning. A total of 36 spawned female broodstocks, with 297.58 ± 8.77 g initial weight, were fed with catfish pellet feed (> 30% crude protein) which were divided into 4 treatments with 3 replications. Treatment 1 catfish pellet feed (CF) (controlled), treatment 2-4 catfish pellet feed mixed with *A. sativum* (CFA), *P. mirifica* (CFP) and *B. superba* (CFB) crude extract (200 ml/1 kg of catfish pellet feed), respectively, on a 20 days experimental period. At the end of the experiment, female broodstocks in each treatment were weighed and gonadosomatic index (GSI), oocyte development and 17β-estradiol (E_2) were evaluated. It was found that GSI and hormone E_2 level of female *R.rugulosa* broodstock which were fed with CFP were significantly higher than that of other treatments ($P<0.05$) and majority of oocytes were at vitellogenic and fully grown stages.

Keywords: female *Rana rugulosa* broodstock, oocyte development, *A. sativum*, *P. mirifica*, *B. superba*

[1] คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

[2] ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University

* Corresponding author: menakorn12@gmail.com

บทนำ

กบนา (*R. rugulosa*) เป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เกษตรกรนิยมนำมาเพาะเลี้ยง เพราะเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว และใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้น อีกทั้งได้รับความนิยมนำมาบริโภคอย่างแพร่หลาย เพราะเนื้อมีรสชาติอร่อย และสามารถนำกบนาตั้งแต่ระยะลูกอ๊อด ลูกกบเล็ก และกบขนาดใหญ่มาประกอบอาหารได้หลากหลายเมนู อย่างไรก็ตามจากปัญหาการใช้สารเคมีในภาคเกษตรกรรม และสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้ปัจจุบันกบนาในธรรมชาติมีปริมาณลดน้อยลงไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการส่งเสริมเพาะพันธุ์กบนามากยิ่งขึ้น โดยปัจจัยที่สำคัญต่อประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์กบนา คือ ความพร้อมสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ เฉพาะอย่างยิ่งแม่พันธุ์กบนาต้องมีไข่ที่พัฒนาสมบูรณ์เต็มที่ (เทพพิทักษ์, 2559; สุนิสา, 2552) ทั้งนี้พ่อแม่พันธุ์กบนาผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน หรือช่วงต้นฤดูฝน จากนั้น 2-3 เดือน แม่พันธุ์กบนาอาจมีการฟอร์มไข่ใหม่และผสมพันธุ์วางไข่อีกครั้ง (เทพพิทักษ์, 2559) ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ช่วงแสงในรอบวัน และปริมาณน้ำฝน เป็นต้น (Sretarugsa et al., 2001; Vu and Trudeau, 2016)

ทั้งนี้ Iela et al. (1986), Varriale et al. (1988) และ Vu and Trudeau (2016) รายงานว่ากลไกควบคุมการผลิตและหลั่งไวเทลโลเจนินหรือโปรตีนไข่แดง (egg yolk vitellogenin) และการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ถูกควบคุมการทำงานโดยฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) ด้วยเหตุนี้การศึกษาที่ผ่านมา นักวิจัยจึงมีการใช้ฮอร์โมน E_2 สังเคราะห์หรือพืชสมุนไพร เช่น กวาวเครือขาว ที่มีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) อยู่หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง miroestrol ซึ่งเป็นสารกลุ่ม chromenes ที่สามารถออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนได้แรงที่สุดของกวาวเครือขาว (เกรียงไกร และคณะ, 2552; ปุญมณี และคณะ, 2549; วสันต์, 2557) มาทดลองศึกษาการผลิตไวเทลโลเจนินและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกบหรือสัตว์น้ำชนิดอื่น ดังตัวอย่างผลการศึกษาของ Selcer and Verbanic (2014) พบการฉีดฮอร์โมน E_2 ระดับความเข้มข้น 1 มก./น้ำหนักตัวของกบ 1 กก. ในกบ *R. pipiens* สามารถกระตุ้นระดับไวเทลโลเจนินในซีรั่มกบให้มีปริมาณสูงขึ้น และ อรพินท์ และคณะ (2543) ทดลองเสริมหัวกวาวเครือขาวป่นแห้งในอาหารปลาสลิดเพศเมียที่ความเข้มข้น 100, 200 และ 400 ppm ตามลำดับ พบปลาสลิดมีการพัฒนาของรังไข่เพิ่มขึ้น (4.72, 6.17 และ 8.37 ตามลำดับ) ตามปริมาณหัวกวาวเครือขาวป่นแห้งที่เพิ่มขึ้นในอาหาร

สำหรับกวาวเครือแดงซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนแอนโดรเจน (phytoandrogen) นั้น (Chaiyasit and Wiwnaitkit, 2012; Malaivijitnond et al., 2010) นักวิจัยได้รายงานการตรวจพบสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนในกวาวเครือแดง (Bradbury and White, 1954; Cherdshewasart et al., 2010) ซึ่งอาจมีผลต่อการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่นเดียวกับกวาวเครือขาว อีกทั้ง Malaivijitnond et al. (2010) รายงานว่ากวาวเครือแดงมีผลทำให้สมองส่วนไฮโปทาลามัสมีการหลั่งของฮอร์โมน gonadotropin-releasing hormone (GnRH) เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ระดับฮอร์โมน GnRH ที่เพิ่มขึ้น มีผลโดยตรงต่อกระบวนสังเคราะห์และสะสมโปรตีนไข่แดงในไข่ (vitellogenesis) และการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำผ่าน hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis (Vu and Trudeau, 2016) นอกจากนี้ วชิรนนท์ และคณะ (2554) รายงานว่ากวาวเครือขาวและกวาวเครือแดงผสมในอาหาร ปริมาณ 20 ก./อาหาร 1 กก. สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตและพัฒนาของลูกอ๊อดกบนาดีกว่าชุดควบคุม และ เทพพิทักษ์ และคณะ (2555) รายงานว่ากบนา (*R. rugulosa*) ที่ได้รับอาหารผสมกระเทียม 5% มีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศสูงกว่ากบนาที่ได้รับอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลินาและสาหร่ายไกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ดังนั้นจากผลการศึกษาที่กล่าวมาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษาเบื้องต้นผลของสารสกัดหยาบกระเทียม กวาวเครือขาว และกวาวเครือแดงต่อการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กบนาหลังผสมพันธุ์วางไข่ เพื่อหาแนวทางความเป็นไปได้ในการกระตุ้นให้แม่พันธุ์กบนาที่ผสมพันธุ์วางไข่เรียบร้อยแล้ว มีการฟอร์มไข่ใหม่อีกครั้งและไข่มีการพัฒนาสมบูรณ์เร็วขึ้น ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์กบนาเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างแม่พันธุ์กบนา

นำแม่พันธุ์กบนาที่เพิ่งผสมพันธุ์วางไข่ (ปล่อยไข่หมดแล้ว) จำนวน 36 ตัว มาพักให้ปรับตัวในบ่อซีเมนต์ เป็นเวลา 2 วัน ให้อาหารปลาดุกสำเร็จรูประดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 30% เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงแม่พันธุ์กบนา โดยให้อัตรา 5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง เวลาประมาณ 09.00 น. และ 17.00 น.

การเตรียมสารสกัดหยาบกระเทียม กวาวเครือขาว และกวาวเครือแดง

ชั่งตัวอย่างกระเทียมแห้งบดละเอียด และผงกวาวเครือขาวและกวาวเครือแดงบดละเอียด ปริมาณอย่างละ 100 ก. จากนั้นนำแต่ละตัวอย่าง (100 ก.) มาแช่ใน absolute ethanol 99.9% v/v (C_2H_5OH) (AR, ACS, Reag. PhEur) ปริมาตร 300 มล. แล้วนำไปตั้งบนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง เอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารสกัดหยาบ ปริมาตร 200 มล. ฉีดพ่นบนอาหารปลาดุกสำเร็จรูปปริมาณ 1 กก. แล้วผึ่งลมให้แห้ง หลังจากนั้นเก็บอาหารที่ผสมสารสกัดหยาบเรียบร้อยแล้วที่อุณหภูมิ 4 °C (ดัดแปลงตามวิธีของ จิราพร, 2555; อโนชา และคณะ, 2557)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยแบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ คือ ชุดการทดลองที่ 1 อาหารปลาดุกสำเร็จรูป (CF) (ชุดควบคุม) และชุดการทดลองที่ 2-4 อาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบกระเทียม (CFA) กวาวเครือขาว (CFP) และกวาวเครือแดง (CFB) ที่ความเข้มข้น 200 มล./อาหาร 1 กก. ตามลำดับ

จากนั้นสุ่มคัดเลือกแม่พันธุ์กบนา (มีน้ำหนักตัว 220 – 420 ก.) ที่พักไว้ให้ปรับตัวในบ่อซีเมนต์ จำนวน 36 ตัว มาชั่งน้ำหนักเริ่มต้น และสุ่มปล่อยในบ่อซีเมนต์ขนาด 1x1.5 ตร.ม. จำนวน 12 บ่อๆ ละ 3 ตัว เลี้ยงเป็นระยะเวลา 20 วัน (ระหว่างวันที่ 11-30 สิงหาคม 2560; ฤดูฝน) โดยให้อาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบ (CF, CFA, CFP และ CFB) แต่ละชุดการทดลอง อัตรา 5% ของน้ำหนักตัว/วัน วันละ 2 ครั้ง เวลาประมาณ 09.00 น. และ 17.00 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง 20 วัน เก็บตัวอย่างแม่พันธุ์กบนาในแต่ละชุดการทดลองมาชั่งน้ำหนักตัว ศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศ ระยะพัฒนาของไข่ และปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol (E_2) ในพลาสมา

การศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI)

นำตัวอย่างแม่พันธุ์กบนาในแต่ละชุดการทดลองมาชั่งน้ำหนักตัว ผ่าท้องเปิดช่องลำตัวและตัดเอารังไข่ออกมาชั่งน้ำหนัก โดยใช้เครื่องชั่งดิจิตอล (ยี่ห้อ Ohaus รุ่น AR2140) และคำนวณค่า GSI ดัดแปลงตามวิธีของ Jahan et al. (2014) และ Sretarugsa et al. (2001) ดังสมการ

$$GSI\ (\%) = \frac{\text{น้ำหนักของรังไข่}}{\text{น้ำหนักตัวของแม่พันธุ์กบนา}} \times 100$$

การศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal histology)

เก็บตัวอย่างรังไข่บางส่วน (บริเวณส่วนต้น กลาง และปลาย) ของแม่พันธุ์กบนาทั้งหมด มาแช่ในสารละลายฟอร์มาลีน 10% เพื่อรักษาสภาพ จากนั้นเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อรังไข่ตามขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (tissue preparation) นำไปฝังในพาราฟิน (paraffin-embedding) และตัดเนื้อเยื่อ (sectioning) ขนาดความหนา 4-6 ไมโครเมตร (ขึ้นอยู่กับลักษณะรังไข่) หลังจากนั้นย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย haematoxylin และ eosin (H&E) แล้วนำสไลด์เนื้อเยื่อรังไข่ที่ได้ มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ยี่ห้อ Olympus, รุ่น CH30) ที่กำลังขยาย 100 และ 400 เท่า (Humason, 1979) เพื่อศึกษาระยะพัฒนาของไข่ (oocyte) ตามวิธีของ Sretarugsa et al. (2001) ต่อไป

การเก็บตัวอย่างพลาสมา (blood plasma) และวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน E_2

นำตัวอย่างแม่พันธุ์กบนามาทำให้สลบโดยแช่ในน้ำแข็ง ประมาณ 10 นาที จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มล. และเข็มฉีดยาเบอร์ 26Gx1 ที่กลั้วด้วย EDTA (ความเข้มข้น 0.5 M) เจาะเลือดแม่พันธุ์กบนาจากเส้นเลือด ventral abdominal vein นำเลือดที่ได้ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. นำ

ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge; universal 32R) ที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที (Nozu et al., 2009) แล้วดูดแยกตัวอย่างพลาสมาใส่ในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อเตรียมนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน E_2 ด้วยวิธี chemi luminescent microparticle immunoassay (CMIA) โดยใช้ชุดทดสอบ ARCHITECT Estradiol 7K72-25 reagent kit (lower detection limit 10 พิโคกรัม/มล.) (ยี่ห้อ Architect, Abbott Laboratory, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียวของข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง (One-way analysis of variance: One-Way ANOVA) เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยข้อมูลแต่ละชุดการทดลอง ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS version 15.0

ผลการศึกษา

การศึกษาเบื้องต้นผลของสารสกัดหยาบกระเทียมกวาวเครือขาว และกวาวเครือแดง ต่อค่า GSI ปริมาณฮอร์โมน E_2 และการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กบนาหลังผสมพันธุ์วางไข่ แสดงใน Table 1 และ Figure 1

จาก Table 1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (20 วัน) พบแม่พันธุ์กบนาในชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 278.34 ± 20.63, 316.38 ± 23.29, 288.52 ± 19.21 และ 275.04 ± 20.35 ตามลำดับ ส่วนค่า GSI และปริมาณฮอร์โมน E_2 พบแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว (CFP) มีค่าเฉลี่ยมากที่สุด คือ 4.45 ± 0.49 และ 1,845.33 ± 1,102.46 พิโคกรัม/มล. ตามลำดับ ขณะที่แม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารปลาดุกสำเร็จรูป (CF) มีค่าเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 1.88 ± 0.43 และ 341.67 ± 172.80 พิโคกรัม/มล. ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบค่า GSI และปริมาณฮอร์โมน E_2 ของแม่พันธุ์กบนาในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า GSI และปริมาณฮอร์โมน E_2 พบค่า GSI มีความสัมพันธ์แปรผันตามปริมาณฮอร์โมน E_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.628^*$)

สำหรับผลการศึกษาการพัฒนาของไข่ (Figure 1) พบแม่พันธุ์กบนาในชุดการทดลองที่ 1 (CF) มี oocyte พัฒนาช้าที่สุด คือ oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ในระยะ previtellogenic stage (stage I และ II) (Figure 1a) ขณะที่แม่พันธุ์กบนาในชุดการทดลองที่ 3 (CFP) มีการพัฒนาของ oocyte เร็วที่สุด คือ oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ในระยะ vitellogenic (stage V) และ fully grown stage (stage VI) (Figure 1c)

Table 1 Gonadosomatic index (GSI) and E_2 hormone levels of female *R. rugulosa* broodstocks (mean+SE) (n = 9 in each treatments) (20 days experimental period)

Treatments	Initial body weight (g)	Body weight (g)	GSI (%)	E_2 (pg/ml)
CF	296.67 ± 22.17^a	278.34 ± 20.63^a	1.88 ± 0.43^{ab}	341.67 ± 172.80^b
CFA	311.25 ± 18.17^a	316.38 ± 23.29^a	3.11 ± 0.93^{ab}	1,659.33 ± 871.82^a
CFP	291.67 ± 20.40^a	288.52 ± 19.21^a	4.45 ± 0.49^a	1,845.33 ± 1,102.46^a
CFB	291.00 ± 11.87^a	275.04 ± 20.35^a	3.16 ± 1.03^{ab}	845.00 ± 735.00^{ab}
p-value	0.852	0.513	0.042	0.043

Note; Values with different superscripts in the same column are significantly different ($p<0.05$)

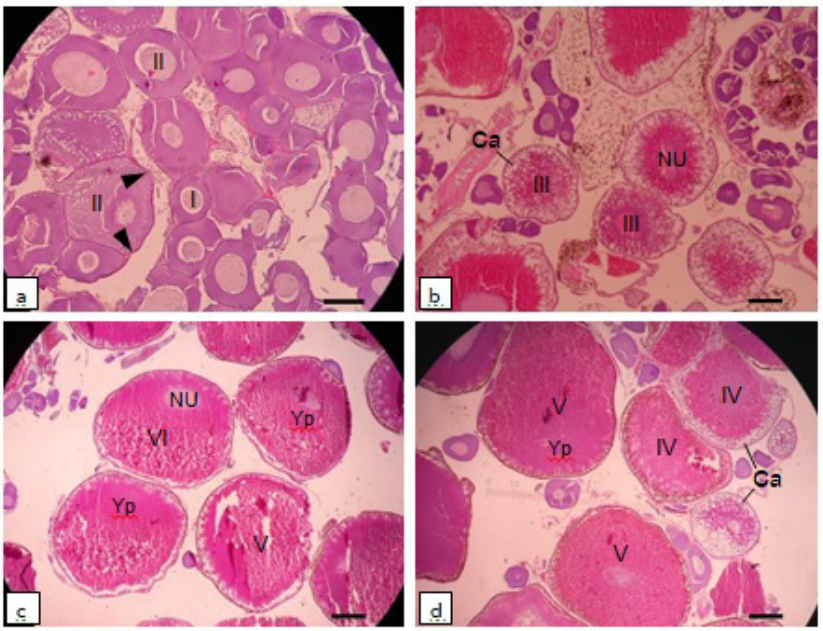

Figure 1 Transverse sections of female *R. rugulosa* broodstock ovary. a-d ovarian fragments showing histology of stage I, II, III, IV, V and VI oocytes in Treatment 1 (CF), 2 (CFA), 3 (CFP) and 4 (CFB), respectively. Arrowhead, cortical alveolus (Ca); NU, nucleus; Yp, yolk platelets. H&E stain, Olympus; model CH30 x 40. Scale bar = 250 µm.

วิจารณ์

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบกระเทียม กวาวเครือขาว และกวาวเครือแดง ต่อการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กบนาหลังผสมพันธุ์วางไข่ พบอาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบทั้ง 3 ชนิด คือ CFA, CFP และ CFB (ชุดการทดลองที่ 2-4) สามารถกระตุ้นให้แม่พันธุ์กบนามีค่าเฉลี่ย GSI ปริมาณฮอร์โมน E_2 และการพัฒนาของไข่ดีกว่าแม่พันธุ์กบนาที่เลี้ยงด้วยอาหาร CF (ชุดการทดลองที่ 1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพืชสมุนไพร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกวาวเครือขาวและกวาวเครือแดงมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (วสันต์, 2557; Bradbury and White, 1954; Cherdshewasart et al., 2010) ที่สามารถกระตุ้นการผลิตไวเทลโลเจนินและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Selcer and Verbanic, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ เทพพิทักษ์ และคณะ (2555), วชิรนนท์ และคณะ (2554) และ อรพินท์ และคณะ (2543) กล่าวคือ การเสริมพืชสมุนไพรเหล่านี้ในอาหารกบหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นส่งผลให้กบหรือสัตว์น้ำมีความสมบูรณ์เพศ การพัฒนาระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารในชุดควบคุม และสอดคล้องกับ จิราพร (2555) ที่รายงานว่าสารสกัดสมุนไพรจากกระเทียม และกวาวเครือขาวมีประสิทธิภาพในการเร่งการเจริญพันธุ์ของสัตว์น้ำได้ อย่างไรก็ตามพืชสมุนไพรบางชนิดโดยเฉพาะกระเทียมยังไม่มีการรายงานถึงสารออกฤทธิ์ที่มีผลต่อการพัฒนาของไข่หรือระบบสืบพันธุ์ในแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำหรือสัตว์น้ำ ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมวิเคราะห์ชนิดหรือประเภทของสารออกฤทธิ์

เมื่อเปรียบเทียบค่า GSI ปริมาณฮอร์โมน E_2 และการพัฒนาไข่ของแม่พันธุ์กบนาในชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ที่ได้รับอาหาร CFA, CFP และ CFB ตามลำดับ พบแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 3 (CFP) มีค่า GSI และปริมาณฮอร์โมน E_2 เฉลี่ยมากที่สุด (4.45 $\pm$ 0.49 และ 1,845.33 $\pm$ 1,102.46 พิโคกรัม/มล. ตามลำดับ) และมีการพัฒนาของ oocyte เร็วที่สุด คือ oocyte ส่วนใหญ่เจริญอยู่ในระยะ vitellogenic (stage V)

และ fully grown stage (stage VI) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในสารสกัดกวาวเครือขาวมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) อยู่หลายชนิด เช่น สารกลุ่ม isoflavonoid ได้แก่ daidzein, genistein และ kwakhurin สารกลุ่ม Isoflavonoid glycoside ได้แก่ daidzin, genistin, mirificin และ puerarin สารกลุ่ม chromenes ได้แก่ miroestrol, deoxymiroestrol และ isomiroestrol โดย miroestrol เป็นสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนได้แรงที่สุดของกวาวเครือขาว (วสันต์, 2557) ซึ่งในแม่พันธุ์กลุ่มสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมน E_2 มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญพัฒนาของไข่และระบบสืบพันธุ์ โดยควบคุมกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงภายในเซลล์ไข่ (vitellogenesis) ซึ่งไปออกฤทธิ์กระตุ้นให้เซลล์ตับสังเคราะห์และหลั่งไวเทลโลเจนินหรือโปรตีนไข่แดง (egg yolk vitellogenin) แล้วเปลี่ยนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กออกสู่กระแสเลือดและกลับเข้ามาสะสมภายในเซลล์ไข่ ผ่านตัวรับสัญญาณ vitellogenin receptor ที่ผิวเซลล์ไข่ ส่งผลทำให้ไข่เจริญพัฒนาขึ้น (Vu and Trudeau, 2016) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ คือ แม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 3 (CFP) มีค่า GSI ปริมาณฮอร์โมน E_2 และการพัฒนาของไข่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบในชุดการทดลองอื่น และดัชนีความสมบูรณ์เพศของแม่พันธุ์กบนามีความสัมพันธ์แปรผันตามปริมาณฮอร์โมน E_2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.628^*$) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Iela et al. (1986), Selcer and Verbanic (2014) และ Varriale et al. (1988) กล่าวคือ การพัฒนารังไข่ของกบ Mexican leaf frog (*Pachymedusa dacnicolor*) มีความสัมพันธ์แปรผันตามกับปริมาณฮอร์โมน E_2 ในพลาสมา (Iela et al., 1986) และฮอร์โมน E_2 มีผลต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินในตับและปริมาณไวเทลโลเจนินในพลาสมาและเซลล์ไข่ของกบ *R. esculenta* (Varriale et al., 1988) นอกจากนี้การฉีดฮอร์โมน E_2 ระดับความเข้มข้น 1 มก./น้ำหนักตัวของกบ 1 กก. ในกบ *R. pipiens* สามารถกระตุ้นระดับไวเทลโลเจนินในซีรั่มกบให้มีปริมาณสูงขึ้น (Selcer and Verbanic, 2014)

เมื่อพิจารณาแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารชุดการทดลองที่ 4 (CFB) พบมีความสมบูรณ์เพศดีกว่าแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหาร CFA แต่มีความสมบูรณ์เพศช้ากว่าแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหาร CFP เนื่องจากกวาวเครือแดงมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนเช่นเดียวกับกวาวเครือขาว แต่มีปริมาณสารออกฤทธิ์น้อยกว่า (Bradbury and White, 1954; Cherdshewasart et al., 2010) อีกทั้งในกวาวเครือแดงยังมีสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนแอนโดรเจน จึงส่งผลทำให้การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กบนาช้ากว่าแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว (Chaiyasit and Wiwnaitkit, 2012; Malaivijitnond et al., 2010)

ดังนั้นจากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้แม่พันธุ์กบนาที่ผสมพันธุ์วางไข่เรียบร้อยแล้ว มีความสมบูรณ์เพศและการเจริญพัฒนาของไข่สมบูรณ์เร็วขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาคณะผู้วิจัยใช้สารสกัดหยาบในการทดลอง ซึ่งมีกระบวนการแยกสารออกฤทธิ์ที่ไม่ซับซ้อน มีขั้นตอนง่ายที่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกบนาหรือสัตว์น้ำสามารถนำไปประยุกต์ได้ ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลพื้นฐานการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์กบนาเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุป

อาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว มีผลกระตุ้นให้แม่พันธุ์กบนาหลังผสมพันธุ์วางไข่ มีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ ปริมาณฮอร์โมน E_2 และการพัฒนาของไข่ดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแม่พันธุ์กบนาที่ได้รับอาหารปลาดุกสำเร็จรูปผสมสารสกัดหยาบในชุดการทดลองอื่น

เอกสารอ้างอิง

เกรียงไกร สีตะพันธุ์, สุธิดา โสีะบีน, พีระวี พุ่มแจ้ง, เทพพิทักษ์ บุญทา, สุทัศน์ อินปลี, นภ การะบุตร, อดิเรก ดวงประเสริฐ, และ สราวุธ เตียเจริญ. 2552. ผลของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*)

ต่อประสิทธิภาพการวางไข่ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในฤดูหนาว. วารสารนเรศวรพะเยา 2: 141-146.

จิราพร โรจน์ทินกร. 2555. คู่มือสารสกัดสมุนไพรสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

เทพพิทักษ์ บุญทา. 2559. คู่มือการเพาะเลี้ยงกบครบวงจร. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

เทพพิทักษ์ บุญทา, ชนกันต์ จิตมนัส, และ จงกล พรมยะ. 2555. ผลของอาหารผสมสาหร่ายสไปรูลินา สาหร่ายไก และกระเทียมต่อการเติบโต ความสมบูรณ์เพศและการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกบนา (*Rana rugulosa*). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 6(1): 23-35.

ปุญมณี กาญจนวรกุล, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, อรพินท์ จินตสถาพร, และ ส่งศรี มหาสวัสดิ์. 2549. ผลของกวาวเครือขาวต่อการเจริญ เติบโต และการใช้ประโยชน์อาหารในปลาดุกลูกผสม. น. 535-544. ใน: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 44 (สาขาประมง). วันที่ 30 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2549. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ.

วชิรนนท์ แก้วตาปี, ประธาน วาดวิจิตร, และยุทธนา สมิตะสิริ. 2554. การกระตุ้นการเจริญเติบโตของลูกอ๊อดกบนาด้วยกวาวเครือขาวและกวาวเครือแดง. แก่นเกษตร. 39 (ฉบับพิเศษ): 260-264.

วสันต์ มะโนเรือง. 2557. ฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนและฤทธิ์คุมกำเนิดของกวาวเครือขาวที่เก็บไว้เป็นเวลา 25 ปี ในหนูขาว. วารสารวิจัย มสด สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 7(3): 61-73.

สุนิสา ทองสกุล. 2552. การศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตของกบ. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร, ชุมพร.

อรพินท์ จินตสถาพร, อุทัยวรรณ คันโธ, ศรีน้อย ชุ่มคำ, ทัศนีย์ สุวรรณยอด, อรวรรณ สัตยาลัย, และ พัฒนพงศ์ ชูแสง. 2543. ผลของกวาวเครือขาวต่อการเติบโต และระดับฮอร์โมนบางชนิดในปลาสลิด. น. 186-193. ใน: การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 38 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ.

อโนชา กิริยากิจ, มนัส คงศักดิ์, กิติพงษ์ สุวรรณเกตุ, และดุสิต ศรีวิไล. 2557. ประสิทธิภาพของกวาวเครือขาวในการผลิตปลาหมอไทยเพศเมียล้วน. http://journal.rmutto.ac.th/template/design/file_article/article.482pdf. ค้นเมื่อ 10 พฤศจิกายน 2561.

Bradbury, R.B., and D.E. White. 1954. Estrogens and related substances in plants. P.207-230. In: R.S. Harris, G.F. Marrian, and K.V. Thimann. Vitamins and hormones advances in research and applications. Academic Press, New York.

Chaiyasit, K., and V. Wiwnaitkit. 2012. Hyperandrogenemia due to ingestion of *Butea superb*. Indian Journal of Endocrinology and Metabolism. 16(3): 485-486.

Cherdshewasart W., T. Mahapanichkul, and C. Boonchird. 2010. Estrogenic and anti-estrogenic activities of the Thai traditional herb, *Butea superb* Roxb. Bioscience, Biotechnoloy, and Biochemistry. 74(11): 2176-2182.

Humason, G.L. 1979. Animal tissue technique. W. H. Freeman Co, San Francisco. 661 p.

Iela, L., R.K. Rastogi, G. Delrio, and J.T. Bagnara. 1986. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolar*. III. the female. 1986. General and Comparative Endocrinology. 63: 381-392.

Jahan, D.A., J. Rashid, M.M. Khan, and Y. Mahmud. 2014. Reproductive biology and gonad histology of mud eel, *Monopterus cuchia* (Hamilton, 1822). International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Reserch. 3(1): 231-239.

Malaivijitnond, S., A. Ketsuwan, G. Watanabe, K. Taya, and W. Cherdshewasart. 2010. Luteinizing hormone reduction by the male potency herb, *Butea superb* Roxb. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 43: 843-852.

Nozu, R., Y. Kojima, and M. Nakamura. 2009. Short term treatment with aromatase inhibitor induces sex change in the protogynous wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. General and Comparative Endocrinology. 161: 360–364.

Selcer, K.W., and J.D. Verbanic. 2014. Vitellogenin of the northern leopard frog (*Rana pipiens*): Development of an ELISA assay and evaluation of induction after immersion in xenobiotic estrogens. Chemosphere. 112: 348-354.

Sretarugsa, P., W. Weerachatyanukul, J. Chavadej, M. Kruatrachue, and P. Sobhon. 2001. Classification of developing oocytes, ovarian development and seasonal variation in *Rana tigerina*. ScienceAsia 27: 1-14.

Varriale, B., R. Pierantoni, L.D. Matteo, S. Minucci, M. Milone, and G. Chieffi. 1988. Relationship between estradiol-17β seasonal profile and annual vitellogenin content of liver, fat body, plasma, and ovary in the frog (*Rana esculenta*). General and Comparative Endocrinology. 69: 328-334.

Vu, M., and V.L. Trudeau. 2016. Neuroendocrine control of spawning in amphibians and its practical applications. General and Comparative Endocrinology. 234: 28-39.