

ผลของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน เอสตราไดโอด เทสโทสเตอโรน และคอร์ติซอล ในการ
ขยายพันธุ์ของนกกระสาคอดำ (*Ephippiorhynchus asiaticus*)

Result of Progesterone 17-β Estradiol Testosterone and Cortisol to Breeding Black-necked
Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*)

ชัยณรงค์ ปิ่นคง ปิ่นอนงค์ ทองนพคุณ นิตยา เพชรสุกร และอุฬาริกา กองพรหม

Chainarong Punkong, Pin-arnong Thongnopakhun, Nittaya Petsukorn and Urarikha Kongprom

งานวิจัย ฝ่ายอนุรักษ์ วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว 235 หมู่ 7 ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี 20110

บทคัดย่อ

กระบวนการขยายพันธุ์นกกระสาคอดำในสภาพการเพาะเลี้ยงมีปัจจัยหลายอย่างทำให้การจับคู่ขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จได้ยาก เช่น ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ รวมถึงความเครียดในสัตว์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนเพศ และฮอร์โมนคอร์ติซอลในมูลของนกกระสาคอดำเพื่อประโยชน์ในการเพาะขยายพันธุ์ต่อไป โดยศึกษาในนกกระสาคอดำที่เป็นเพศผู้ 4 ตัว และเพศเมีย 3 ตัว จากการศึกษาระดับฮอร์โมนเพศพบว่านกกระสาคอดำเพศเมียมีค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเท่ากับ 77.8 ± 1.91 นาโนกรัมต่อกรัมของมูลแห้ง (Mean±SEM) ในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์พบว่านกกระสาคอดำเพศเมียที่จับคู่ทำรังวางไข่มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่จับคู่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดโอดระหว่างเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้กับกลุ่มที่ไม่จับคู่ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยนกกระสาคอดำเพศเมียมีค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮอร์โมนเอสตราไดโอดเท่ากับ 21.87 ± 0.87 นาโนกรัมต่อกรัมของมูลแห้ง ทั้งนี้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเพศผู้ พบว่ามีแนวโน้มที่ไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นช่วงฤดูกาล แต่ในเพศผู้ที่จับคู่แล้วจะมีระดับของฮอร์โมนนี้สูงกว่าเพศผู้ในกลุ่มที่ยังจับคู่ไม่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีระดับฮอร์โมนโดยเฉลี่ยทั้งปีเท่ากับ 205.60 ± 13.10 และ 128.71 ± 4.76 นาโนกรัมต่อกรัมของมูลแห้งตามลำดับ ทั้งนี้การศึกษาความสัมพันธ์ทางสถิติ พบว่านกกระสาคอดำโดยรวมมีระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลสัมพันธ์กับระดับของอุณหภูมิในทิศทางบวก ซึ่งในช่วงฤดูร้อนระดับฮอร์โมนนี้จะสูงกว่าช่วงเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในกลุ่มนกที่ไม่จับคู่จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของอะดรีโนคอร์ติโคโทรปิกฮอร์โมน (ACTH) พบว่าไม่แสดงถึงภาวะความเครียดที่ผิดปกติ โดยสรุปข้อมูลพื้นฐานของระดับฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนคอร์ติซอลของนกกระสาคอดำจะเป็นประโยชน์ในการจัดการกรเลี้ยงเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

คำสำคัญ: นกกระสาคอดำ โปรเจสเตอโรน 17-β เอสตราไดโอด เทสโทสเตอโรน คอร์ติซอล

Abstract

There are many factors that involving with unsuccessful breeding Black-necked storks in captivity such as, infertility and stress. In the present study describes a project initialed to establish basic reproductive parameters and stress in this species, with the ultimate aim of achieving better breeding success in breeding programs. The study used 4 males and 3 females Black-necked storks for comparison study of hormonal levels between breeding and non-breeding groups. The results showed that the progesterone concentrations in breeding season of all females were significantly different between paired female and non-paired females, with paired female had higher than two non-paired females ($P < 0.05$) but non-significant different in another time with non-breed season during a year period ($P > 0.05$). For all females (out of breeding time) were

baseline concentrations of fecal progesterone averaged (Mean \pm SEM) 77.8 ± 1.91 ng/g of dry feces. When compared mean average 17- β Estradiol concentration in females, there was non-significant different in paired and non-paired (non-breeding) group ($P > 0.05$), however 17- β Estradiol level in paired female to be seem higher than in non-paired females. Baseline concentrations of fecal 17- β Estradiol averaged (Mean \pm SEM) 21.87 ± 0.87 ng/g of dry feces. The results of the testosterone in Black-necked stork males are contrast to females, there was no evidence of seasonality in testicular activity. Overall mean fecal testosterone concentrations were higher ($P < 0.05$) in the paired male (205.60 ± 13.10 ng/g of dry feces) than in non-paired males (128.71 ± 4.76 ng/g of dry feces). The study also found that cortisol level was highest in summer season ($P < 0.05$). However, an adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge in males and females demonstrated that the clearance rate of cortisol metabolites not to showed erratic stress level. Finally, knowledge of the reproductive and stress hormone of individual Black-necked storks are important for breeding management to be appropriate for ensure sustainable conservation of endangered species.

Keywords: Black-necked storks Progesterone 17- β Estradiol Testosterone Cortisol

1. บทนำ

นกกระสาคอดำ (*Ephippiorhynchus asiaticus*) จัดเป็นหนึ่งในนกที่มีความสูงมากที่สุดในกลุ่มนกกกระสาที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในปัจจุบัน นกกระสาคอดำมีถิ่นอาศัยในเขตพื้นที่ชุ่มน้ำต่างๆ และแพร่กระจายพันธุ์อยู่ในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ยกเว้นประเทศมาเลเซีย, อินโดนีเซีย และฟิลิปปินส์) รวมถึงบางส่วนของทวีปออสเตรเลียด้วย นกกระสาคอดำ แบ่งออกเป็นสองสายพันธุ์ย่อย (subspecies) คือ สายพันธุ์ *Ephippiorhynchus asiaticus asiaticus* ที่พบได้ในประเทศแถบเอเชีย อีกสายพันธุ์คือ *Ephippiorhynchus asiaticus australis* ที่พบได้ในพื้นที่ทางเหนือของทวีปออสเตรเลีย และทางใต้ของนิวกินี (Hancock, Kushlan and Kahl, 1992) ถูกจัดสถานภาพอยู่ในกลุ่มประชากรที่เสี่ยงต่อการถูกคุกคาม “Near Threatened” ในบัญชีแดงของ IUCN อันเนื่องมาจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย (Sundar, 2003) สำหรับในประเทศไทยนกกกระสาคอดำได้ถูกจัดว่าสูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติ สาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการสูญพันธุ์คือประสบปัญหาจากการถูกล่าอย่างต่อเนื่องและถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลายจากการพัฒนาประเทศ เช่นเดียวกับกับกลุ่มประชากรในพื้นที่ทางภาคตะวันออกเฉียงที่มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญอันเนื่องมาจากมีการเปลี่ยนแปลงของพื้นที่ชุ่มน้ำอันเป็นที่อาศัย (Neble, Porter and Kingsford, 2008) โดยพบว่าพื้นที่ชุ่มน้ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของออสเตรเลียได้ (South Australia) ถูกบุกรุกทำลายนับตั้งแต่ชาวยุโรปอพยพมาตั้งถิ่นฐานในครั้งอดีต (Hill, 2003) ทั้งนี้พบว่าในประเทศไทยยังมีจำนวนประชากรเล็กน้อยหลงเหลืออยู่ในสภาพของกรงเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว องค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ซึ่งถือเป็นกลุ่มประชากรชุดสุดท้ายที่มีความสำคัญต่อการอนุรักษ์และรักษาไว้ซึ่งกลุ่มของนกกกระสาชนิดนี้ แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการขยายพันธุ์นกกกระสาคอดำในกรงเลี้ยง เป็นเรื่องที่มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การขยายพันธุ์ประสบความสำเร็จได้ยาก ไม่ว่าจะเป็นภาวะความไม่สมบูรณ์พันธุ์ การไม่สามารถจับคู่ได้ รวมถึงการจัดการทางด้านโภชนาการอาหารที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิต โดยในการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาแรกต่อริบยถึงฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์และฮอร์โมนความเครียดด้วยการตรวจวิเคราะห์และติดตามการเปลี่ยนแปลงของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในตัวอย่างมูลสัตว์ ด้วยกระบวนการตรวจทาง EIA ที่อาจมีความไวในการตรวจได้เทียบเท่าหรือดีกว่าการตรวจทาง RIA (Czekala *et al.*, 1986) โดยจัดเป็นการศึกษาแบบไม่ทำการจับบังคับหรือรบกวนตัวสัตว์ (Noninvasive methods) ที่มีความเหมาะสมสำหรับสัตว์ที่อยู่ในสภาพของกรงเลี้ยง (Plame *et al.*, 2005) ทั้งนี้ในการศึกษาดังกล่าวสามารถที่จะใช้ในการพิสูจน์ทราบสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ และการทำงานของต่อมอดรีนัลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้วางแผนในการจัดการกรงเลี้ยงได้อย่างเหมาะสมให้นกกกระสาคอดำมีคุณภาพชีวิตที่ดีสามารถขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ อันเป็นการส่งเสริมการอนุรักษ์นกกกระสาที่ใกล้สูญพันธุ์ชนิดนี้ได้อย่างยั่งยืนต่อไป

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนในนกกระสาอคดำด้วยวิธีการสกัดจากมูล เพื่อใช้ประเมินการจัดการกรงเลี้ยง
- 2.2 เพื่อประเมินสภาพทางสรีระวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในสัตว์แต่ละตัวในแต่ละช่วงการสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย
- 2.3 เพื่อเปรียบเทียบระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลในกลุ่มนกที่จับคู่และไม่จับคู่

3. วิธีการศึกษา

3.1 การเก็บตัวอย่างมูลนกกระสาอคดำ

สุ่มเก็บตัวอย่างมูลของนกกระสาอคดำแต่ละตัว เฉลี่ยสัปดาห์ละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 12-24 เดือน มูลที่ได้จะถูกเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิแช่แข็ง -20°C จนกว่าจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการต่อไป

(กรณีทดสอบการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Adrenal) ในนกกระสาอคดำที่ไม่จับคู่ จะใช้กระบวนการเพิ่มเติมโดยการฉีดกระตุ้นด้วยอะดรีโนคอร์ติโคโทรปิกฮอร์โมน (ACTH) และเก็บตัวอย่างมูลทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์)

3.2 เก็บรักษาตัวอย่างหรือทำให้แห้ง

นำตัวอย่างที่แช่แข็งเก็บรักษาสภาพมาทำให้แห้งด้วยการไล่ความชื้นออกจากตัวอย่างด้วยการนำเข้าสู่อบ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักไม่เปลี่ยนแปลงอีก จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างไว้ในที่เย็นและมีดป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสเตียรอยด์ (Möstl, Rettenbacher and Palme, 2005; Ziegler and Wittwer, 2005) เพื่อร่อนนำไปสกัดฮอร์โมนต่อไป

3.3 การสกัดสเตียรอยด์ฮอร์โมนจากอุจจาระ

ทำการสกัดด้วยวิธีการต้ม (Dry and Wet Weight Fecal Extraction-Boiling Method) และเก็บสารละลายที่ได้ไว้ใน dilution buffer แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส รอการวิเคราะห์

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน

ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA ตามกระบวนการของ Brown และคณะ (2004) ค่าเฉลี่ยข้อมูลแสดงในรูปของ Mean \pm SEM. ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยฐานปริมาณฮอร์โมนในสัตว์ที่ไม่ได้ตั้งท้องจะใช้วิธีการคำนวณซ้ำๆ แบบ iterative process (Brown *et al.*, 2001)

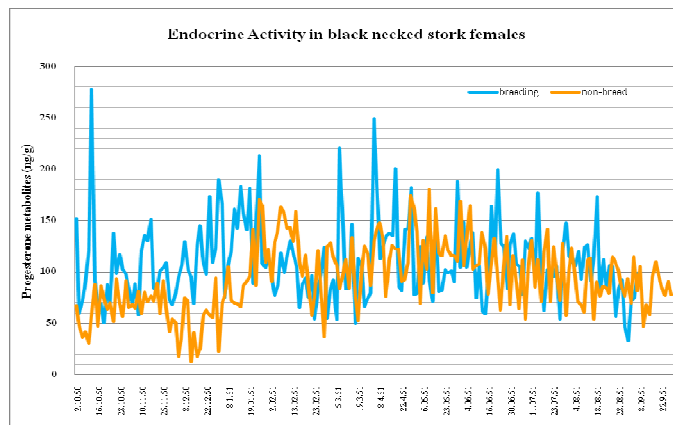
4. สรุปผลการศึกษา

จากการประเมินปัญหาอุปสรรคในการขยายพันธุ์นกกระสาอคดำ (*Ephippiorhynchus asiaticus*) ในกรงเลี้ยง โดยวิธีศึกษาปริมาณฮอร์โมน และโภชนาการ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

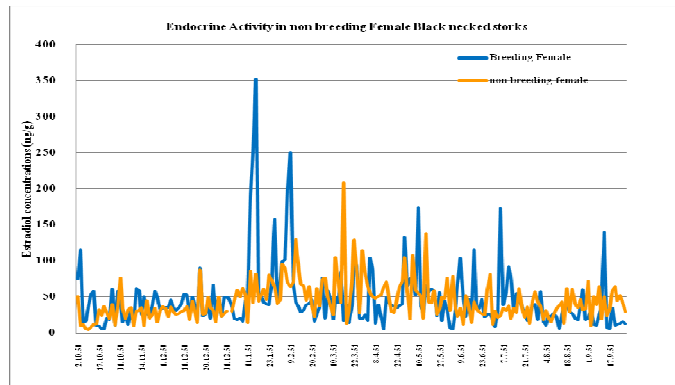
4.1 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเพศ

จากการศึกษาปริมาณฮอร์โมนในเพศเมียทั้งหมด พบว่ามีข้อบ่งชี้ที่แสดงให้เห็นถึงการทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศเมียที่แสดงถึงความแตกต่างในบางช่วงเดือนของรอบปี โดยเฉพาะช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ (เดือนตุลาคม-พฤศจิกายน หรือ มกราคม-กุมภาพันธ์) จากการศึกษาในเพศเมีย มีเพียงตัวเดียวที่ประสบความสำเร็จในการจับคู่และให้ลูกได้ตลอดช่วงระยะเวลา 3 ปีของการศึกษา (2550-2553) ส่วนที่เหลือไม่ประสบความสำเร็จในการจับคู่ขยายพันธุ์ จากการศึกษาไม่พบความแตกต่าง ($P>0.05$) ของช่วงอายุระหว่างเพศเมียที่จับคู่ได้และจับคู่ไม่ได้ (paired and non-paired females) ทั้งนี้พบว่าปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ของนกกระสาอคดำระหว่างเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้กับกลุ่มที่ไม่จับคู่ (ภาพที่ 1) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเพศเมียที่จับคู่ได้และมีพฤติกรรมขยายพันธุ์มีปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่าเพศเมียอีก 2 ตัว ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่จับคู่ สำหรับในช่วงเดือนอื่นๆ ที่ไม่ใช่ฤดูกาลสืบพันธุ์ของ

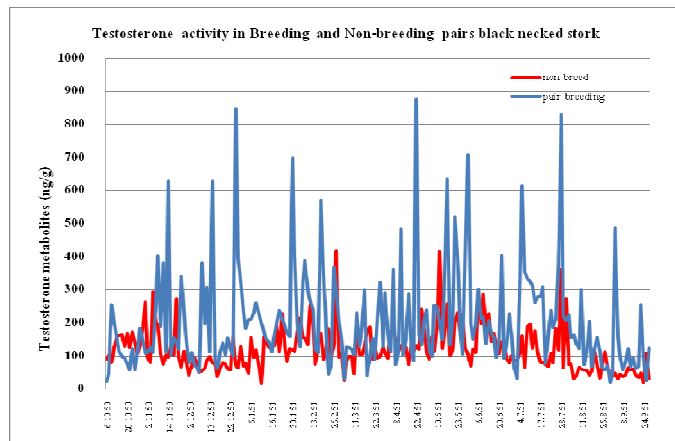
ปีพบว่าระดับของปริมาณฮอร์โมนมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สำหรับการศึกษาค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (baseline concentrations of fecal progesterone) ของเพศเมียทั้งหมด (ไม่นับรวมช่วงเวลาที่มีการสืบพันธุ์) พบว่านกกระสาคอดำเพศเมียมีค่าเฉลี่ยพื้นฐานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยเท่ากับ 77.8 ± 1.91 นาโนกรัมต่อกรัมของมูลแห้ง (ng/g of dry feces) พิสัย 12 - 180 ng/g สำหรับการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอสตราไดออล (17- β Estradiol) ในนกกระสาคอดำเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่าแบบแผนของฮอร์โมนดังกล่าวค่อนข้างที่จะแปรปรวนสูง มีการขึ้นและลงสลับกัน (ภาพที่ 2) แต่มีแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในช่วงที่มีการวางไข่ในช่วงเดือนมกราคมที่ระดับของฮอร์โมนสูงมากกว่าช่วงอื่นๆ อย่างมีความสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดออล ระหว่างเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้กับกลุ่มที่จับคู่ไม่ได้พบที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีความสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยในเพศเมียที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้มีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดออลสูงกว่ากลุ่มเพศเมียที่จับคู่ไม่ได้เล็กน้อย ค่าเฉลี่ยพื้นฐาน (baseline concentrations) ตลอดทั้งช่วงปีเท่ากับ 17.91 ± 0.86 ng/g of dry feces พิสัย 5.26 - 352.36 ng/g ในการศึกษาโครงสร้างอายุของนกกระสาคอดำเพศผู้จำนวน 4 ตัว พบว่าเพศผู้ที่จับคู่และขยายพันธุ์ได้จะมีอายุมากกว่าเพศผู้อีก 3 ตัวที่จับคู่ไม่ได้อย่างมีความสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งแตกต่างกับที่พบในเพศเมีย ทั้งนี้ในการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเพศผู้คือ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Fecal Testosterone) ที่สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 3 พบว่าแนวโน้มโดยเฉลี่ยของปริมาณฮอร์โมนไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของ Testicular ที่เป็นช่วงฤดูการ (seasonality in testicular activity) แต่ในเพศผู้ที่จับคู่แล้วมีระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงกว่าเพศผู้ในกลุ่มที่ยังจับคู่ไม่ได้และมีอายุน้อยกว่าอย่างมีความสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยทั้งหมดในรอบปีเท่ากับ 205.60 ± 13.10 ng/g of dry feces (พิสัย 21-877 ng/g) และ 128.71 ± 4.76 ng/g of dry feces (พิสัย 8-1,042 ng/g) ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบเฉพาะในกลุ่มของเพศผู้ที่ไม่จับคู่จำนวน 3 ตัวพบว่ามีความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)



ภาพที่ 1 กราฟเปรียบเทียบแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในมูลนกกระสาคอดำเพศเมียที่จับคู่แล้วและยังจับคู่ไม่ได้



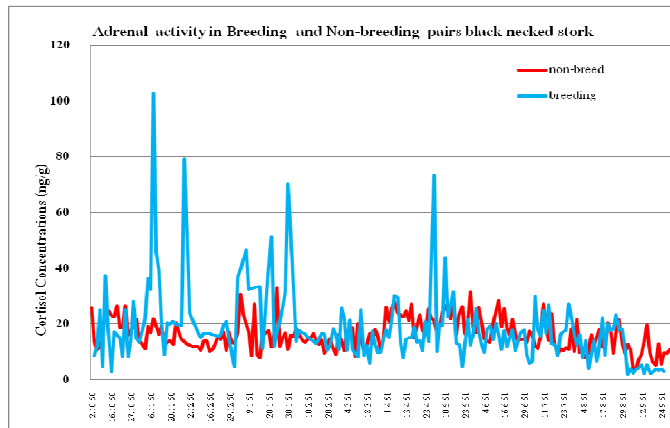
ภาพที่ 2 กราฟเปรียบเทียบแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมน 17-β เอสตราไดโอดอล ในมูลนก กระสาคอดำเพศเมียที่จับคู่แล้วและยังจับคู่ไม่ได้



ภาพที่ 3 กราฟเปรียบเทียบแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในมูลนก กระสาคอดำเพศผู้ที่จับคู่แล้วและยังจับคู่ไม่ได้

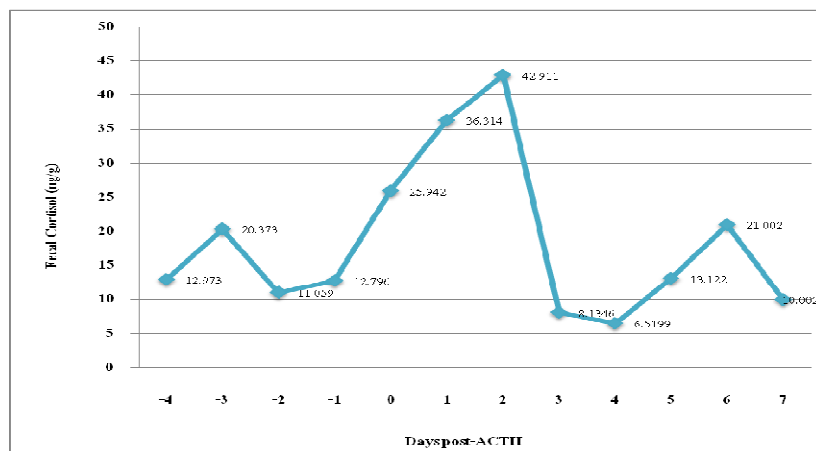
4.2 การตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอล

จากการศึกษาพบว่าในนกกระสาคอดำเพศผู้และเพศเมียที่ไม่ได้จับคู่มีระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอล (Fecal Cortisol) หรือที่เรียกว่าฮอร์โมนความเครียด (stress hormone) สูงสุดในช่วงฤดูร้อน ส่วนเพศผู้ที่จับคู่แล้วจะมีระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอล (Fecal Cortisol) สูงสุดในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ (ภาพที่ 4) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเพศเมียที่จับคู่ได้กับกลุ่มที่จับคู่ไม่ได้ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเพศเมียที่จับคู่ได้มีระดับความเข้มข้นของคอร์ติซอลต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่ได้จับคู่ ซึ่งมีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยทั้งปีเท่ากับ 17.58 ± 1.04 ng/g และ 23.57 ± 1.03 ng/g of dry feces ตามลำดับ



ภาพที่ 4 กราฟเปรียบเทียบแบบแผนการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอล ในนกกระสาอ่ามเพศผู้ที่จับคู่แล้วและยังจับคู่ไม่ได้ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

และจากการประเมินการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Adrenal) ของนกกระสาอ่ามที่จับคู่ไม่ได้ด้วยการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนในกลุ่มกลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) กับการกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอลโดยทดลองฉีดอะดรีโนคอร์ติโคโทรปิกฮอร์โมน (Adrenocorticotropic hormone, ACTH) พบว่า ต่อมไร้ท่อยังคงแสดงถึงภาวะที่ยังคงทำงานอยู่ (active) ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลในนกกระสาอ่ามที่จับคู่ไม่ได้ยังคงอยู่ในระดับที่ไม่สูงผิดปกติ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol metabolites) ในช่วงที่มีการทดสอบโดยการกระตุ้นด้วย ACTH

5. อภิปรายผลการศึกษา

รายงานการศึกษานี้ถือเป็นรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณฮอร์โมนที่สกัดจากมูลของกลุ่มนกกระสาอ่ามที่อยู่ในสภาพการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์เป็นครั้งแรกของภูมิภาคนี้ โดยได้ทำการศึกษาฮอร์โมนความเครียดและฮอร์โมนเพศจากเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งการศึกษาปริมาณฮอร์โมนความเครียดในการศึกษานี้ได้ใช้วิธีการตรวจวัดระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol) แทนการตรวจวัดฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเดียวกันคือกลุ่ม “กลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoids)” ที่พบว่าสามารถทำการตรวจวัดได้ ถึงแม้ว่าในกลุ่มนกส่วนใหญ่จะมีอนุพันธ์ของฮอร์โมน Corticosterone

เป็นหลักก็ตาม (Möstl, Rettenbacher and Palme, 2005) ซึ่งตามปกติคอร์ติซอลจะถูกหลั่งออกมาในร่างกายเมื่อเกิดความเครียด จึงถูกเรียกว่า “ฮอร์โมนความเครียด (Stress Hormone)” แม้ว่าความเครียดจะไม่ใช่เหตุผลเดียวที่ทำให้เกิดการหลั่งคอร์ติซอลเข้าสู่กระแสเลือดก็ตาม (Scott, 2006) โดยจากการศึกษาพบว่านกกระสาคอดำเพศผู้และเพศเมียมีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนคอร์ติซอลเท่ากับ 16.65 ng และ 20.57 ng ต่อกรัมของมูลแห้งตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าในช่วงฤดูร้อน ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลจะสูงกว่าช่วงเวลาอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกันกับในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ระดับคอร์ติซอลที่พบในมูลของนกกระสาคอดำเพศผู้ที่จับคู่จะสูงกว่าช่วงเวลาอื่น อันสามารถแสดงได้ว่า เพศ, สภาพอากาศ, ฤดูกาล และพฤติกรรมมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอลในปริมาณที่แตกต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Goymann และ Eiermann (2005), Wingfield และคณะ (2003) ที่ได้รายงานถึงปัจจัยความแตกต่างทางด้านชนิดพันธุ์ (species), เพศ (sex), ฤดูกาล (season) และสภาพแวดล้อม (environment) ล้วนแล้วแต่มีผลต่อระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในนก เช่นฮอร์โมนในกลุ่ม Glucocorticoids (GC) เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของคอร์ติซอล กับระดับของอุณหภูมิของสภาพอากาศในแต่ละช่วงเดือน ด้วยวิธีการทางสถิติแบบ Pearson (Two-tailed) พบว่าโดยรวมนกกระสาคอดำเพศผู้มีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลสัมพันธ์กับระดับของอุณหภูมิในทิศทางบวก สำหรับในเพศเมียระดับของฮอร์โมนคอร์ติซอลสัมพันธ์กับระดับของช่วงอุณหภูมิสูง (max temp) เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานของ Wingfield และคณะ (2003) ที่ระบุถึงระดับของอุณหภูมิและช่วงเวลาที่ให้มีแสง (photoperiod) มีผลต่อระดับฮอร์โมนของสัตว์ในกลุ่มนกต่างๆ รวมถึงรายงานการศึกษาของ Beebe, Bently และ Hau (2005) ที่พบว่าช่วงเวลาที่ให้มีแสงมีผลต่อการทำงานของต่อมเพศของนกในเขตร้อนหลายชนิดเช่นเดียวกัน จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่นกในเขตร้อน (tropical) บางชนิดแสดงพฤติกรรมบางอย่างที่คล้ายๆ กันในช่วงเดือนเดียวกันในทุกๆ ปี หรืออีกนัยหนึ่งคือการแสดงพฤติกรรมการขยายพันธุ์ ผลัดขน หรือมีการเปลี่ยนแปลงของร่างกายในช่วงเดือนเดียวกันในแต่ละปี โดยการศึกษาปริมาณฮอร์โมนเพศในนกกระสาคอดำพบว่า นกกระสาคอดำเพศเมียมีระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) ที่เป็นค่าเฉลี่ยพื้นฐาน (baseline concentrations) เท่ากับ 77.8 ng ต่อกรัมของมูลแห้ง โดยพบว่าเพศเมียที่จับคู่และมีพฤติกรรมขยายพันธุ์ได้มีปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงในช่วงที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์มากกว่ากลุ่มที่ไม่จับคู่ขยายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับพฤติกรรมขยายพันธุ์ ส่วนนอกช่วงฤดูผสมพันธุ์มีระดับค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนใกล้เคียงกัน ซึ่งในช่วงต้นของฤดูกาลสืบพันธุ์คือเดือนตุลาคมพบว่าบางช่วงวันระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูง สันนิษฐานว่าในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกันกับการวางไข่ครั้งแรก คล้ายคลึงกันกับรายงานการศึกษาในนกขมิ้น หรือ นก “canaries” ที่พบว่าในช่วงที่มีการวางไข่ใบแรกระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดออล (17-B Estradiol) ขึ้นสูงมากที่สุด (Sackman and Schwabl, 1999) และเมื่อนกมีการฟักไข่ระดับของฮอร์โมนจะลดลง เช่นเดียวกันกับในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคมที่นกกระสาคอดำมีพฤติกรรมฟักไข่ โดยพบว่านกกระสาคอดำเพศเมียมีระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยเฉลี่ยต่ำที่สุด สอดคล้องกับรายงานดังกล่าวเช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษาฮอร์โมน 17-B Estradiol ที่เป็นอีกหนึ่งในฮอร์โมนเพศเมียนั้นพบว่าค่อนข้างที่จะมีความแปรปรวนสูง มีการขึ้นและลงสลับกัน โดยพบแนวโน้มที่แสดงถึงความแตกต่างเฉพาะ ในบางช่วงของปีที่เป็นฤดูกาลสืบพันธุ์ ส่วนช่วงเดือนอื่นๆ มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีระดับความเข้มข้นเฉลี่ยตลอดทั้งปี (Mean±SD) เท่ากับ 44.91 ng ต่อกรัมของมูลแห้ง ทั้งนี้ในช่วงเดือนที่นกกระสาคอดำเพศเมียมีระดับฮอร์โมน 17-B Estradiol สูงแตกต่างช่วงเวลาอื่นๆ นั่นคือบางช่วงวันในเดือนตุลาคมและบางช่วงวันในเดือนมกราคมซึ่งตรงกับช่วงที่พบว่านกมีการวางไข่ และไข่ที่ปลอ่ยให้พ่อแม่ฟักเองนั้นฟักออกมาเป็นตัวตามลำดับ และพ่อแม่แสดงพฤติกรรมเลี้ยงดูลูกในช่วงสั้นๆ ก่อนที่จะมีการนำลูกนกออกมาเลี้ยงอนุบาลด้วยมือโดยเจ้าหน้าที่บำรุงเลี้ยง อันมีแนวโน้มคล้ายคลึงกันกับรายงานการศึกษาของ Sackman และ Schwabl (1999) ที่กล่าวถึงข้างต้น สำหรับการตรวจวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในนกกระสาคอดำเพศผู้ พบแนวโน้มโดยเฉลี่ยของปริมาณฮอร์โมนที่ไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงเป็นช่วงฤดูกาล แต่ในเพศผู้ที่จับคู่แล้วจะมีระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงกว่าเพศผู้ในกลุ่มที่ยังจับคู่ไม่ได้และมีอายุน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยเท่ากับ

205.60 ng และ 128.71 ng ต่อกรัมของน้ำหนักมูลแห้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่สามารถระบุถึงความสัมพันธ์ของปริมาณฮอร์โมนกับการแสดงพฤติกรรมก้าวร้าวได้แตกต่างจากรายงานการศึกษาในนก “Downy woodpeckers (*Picoides pubescens*)” ของ Kellama, Wingfield และ Lucas (2004) ที่พบว่าช่วงที่ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่ำ พบความถี่ของพฤติกรรมก้าวร้าวระหว่างเพศผู้ต่อเพศผู้ด้วยกันต่ำเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ในรายงานดังกล่าวยังพบว่าระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนยังเกี่ยวข้องกับแสดงพฤติกรรมเลือกจับคู่ผสมพันธุ์และการรักษาพันธะหรือปฏิสัมพันธ์ระหว่างคู่อีกด้วย และจากการพิจารณาการให้อาหารนกกระสาอดคำที่อยู่ในสถานที่เพาะเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว นั้นพบว่าอาหารหลักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์คือ ปลาข้างเหลือง บางครั้งเป็นปลาหูขนาดเล็ก ซึ่งมีขนาดความยาวลำตัว ประมาณ 7-10 เซนติเมตร อันถือเป็นขนาดที่มีความเหมาะสมต่อการกินของนกกระสาอดคำที่ในธรรมชาติพบว่าอาหารจำพวกปลาที่นกกระสาอดคำกินนั้นมีขนาดลำตัวยาวตั้งแต่ 4 – 10 เซนติเมตร (Maheswaran and Rahmani, 2007) และ 2.5-7.5 เซนติเมตร (Hancock, Kushlan and Kahl, 1992) นอกจากอาหารจำพวกปลาแล้วนกกระสาอดคำสามารถกินอาหารอื่นๆ ได้อีกหลายชนิดแต่พฤติกรรมหรือความถี่ในการเลือกกินจะน้อยกว่าอาหารประเภทปลาทะเลซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความคุ้นชินกับการถูกเลี้ยงด้วยอาหารประเภทปลาข้างเหลืองและปลาที่เป็นอาหารหลักมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของอาหารทั้งหมด (คุณค่าทางโภชนาการเกือบทั้งหมดได้จากปลา) ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่านกกระสาอดคำที่จับคู่ขยายพันธุ์ได้มีพฤติกรรมหากินและการกินอาหารมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้จับคู่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$, $P = 0.001$) เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณการกินอาหาร พบว่าในแต่ละช่วงเดือนนกกระสาอดคำโดยรวมมีค่าเฉลี่ยปริมาณการกินได้ใกล้เคียงกัน (ไม่มีนัยสำคัญ, $P > 0.05$) แต่มีแนวโน้มถึงในช่วงเดือนมกราคมคู่พ่อแม่ที่เลี้ยงลูกเอง (ในช่วงสั้นๆ) จะมีปริมาณการกินอาหารมากกว่าช่วงเดือนอื่นๆ เล็กน้อย โดยแสดงพฤติกรรมหากินและกินอาหารมากที่สุดในช่วงเช้าหรือค่ำและช่วงสายของวัน ซึ่งช่วงนี้นกกระสาอดคำที่อยู่ในสภาพของการเพาะเลี้ยง ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีความถี่ในการแสดงพฤติกรรมก้าวร้าวมากที่สุด สอดคล้องกับรายงานของ Maheswaran และ Rahmani (2007) ที่รายงานถึงนกกระสาอดคำในธรรมชาติมักแสดงพฤติกรรมก้าวร้าวมากที่สุดในช่วงเวลา 06.00 น. ถึง 10.00 น. โดยอาจมีสาเหตุมาจากช่วงเวลาดังกล่าวในธรรมชาติมักมีนกกินปลาชนิดอื่นๆ มาหากินอยู่ด้วยซึ่งเป็นช่วงที่นกกระสาอดคำมีพฤติกรรมหากินและกินอาหารสูงที่สุดเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะในช่วงของฤดูผสมพันธุ์ ทำรังวางไข่ของนกกระสาอดคำที่อยู่ในสภาพของการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมนในแต่ละช่วงเดือนของปีหรือแต่ละช่วงเวลาของการสืบพันธุ์ สำหรับในกลุ่มนกที่ไม่จับคู่และมีปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลอยู่ในระดับที่ไม่สูงผิดปกตินั้นจำเป็นที่จะต้องศึกษาปัจจัยอื่นๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะในเรื่องของการจัดการกรงเลี้ยงและการเทียบคู่ที่เหมาะสม รวมถึงความเป็นไปได้ในการนำเอาเทคโนโลยีช่วยทางการสืบพันธุ์มาใช้ ซึ่งสามารถใช้พื้นฐานการศึกษาปริมาณฮอร์โมนนี้ช่วยในการจัดการเพาะขยายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นได้ เพิ่มโอกาสในการฟื้นฟูประชากรนกกระสาอดคำให้คงความหลากหลายทางชีวภาพได้ต่อไป.

6. บรรณานุกรม

- Beebe, K., Bentley, G.E., Hau, M. 2005. A seasonally breeding tropical bird lacks absolute photorefractoriness in the wild, despite high photoperiodic sensitivity. *Functional Ecology* 19, 505-512.
- Brown, J., Bellem, A.C., Fouraker, M., Wildt, D.E. and Roth, T.L. 2001. Comparative Analysis of Gonadal and Adrenal Activity in the Black and White Rhinoceros in North America by Noninvasive Endocrine Monitoring. *Zoo Biology*, Vol. 20, pp. 463-486.
- Brown, J., Walker, S, and Steinman, K. 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species, Second Edition, USA: Smithsonian institution.

- Czekala, N.M., Gallusser, S., Meier, M.E., Lasley, B.L. 1986. The development and application of an enzyme immunoassay for urinary estrone conjugates. *Zoo Biology*. 5: 1-16.
- Goymann, W. and Eiermann, S.J. 2005. Analysis of Hormones in Droppings and Egg Yolk of Birds. Introduction to the European Science Foundation Technical Meeting. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046, 1-4. New York Academy of Sciences.
- Hancock, J.A., Kushlan, J.A. and Kahl, M.P. 1992. STROKS, IBISES and SPOONBILLS of the World. Brehm Foundation, Harcourt Brace Jovanovich, London. pp 109-113.
- Hill, H.J. 2003. Wetlands Strategy for South Australia. Retrieved July 13, 2010 from http://www.environment.sa.gov.au/biodiversity/pdfs/wetlands/wetlands_strategy.pdf
- Kellama, J.S., Wingfield, J.C. and Lucas, J.R. 2004. Nonbreeding season pairing behavior and the annual cycle of testosterone in male and female downy woodpeckers, *Picoides pubescens*. *Hormones and Behavior* 46, 703–714.
- Maheswaran, G. and Rahmani, A.R. 2007. Activity Budget of the Black-necked Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*) during Non-breeding Season in India. *Zoos' Print Journal* 22(11), 2875-2878.
- Möstl, E., Rettenbacher, S. and Palme, R. 2005. Measurement of Corticosterone Metabolites in Bird's Droppings: An Analytical Approach. *New York Academy of Science*, 1046: 17-34.
- Neble, S., Porter, J.L. and Kingsford, R.T. 2008. Long-term Trends of Shorebird Populations in Eastern Australia and Impacts of Freshwater Extraction. *SciencDirect. Biological Conservation* (141), 971-980.
- Plame, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr S. M. and Möstl, E. 2005. Stress Hormones in mammals and birds Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040, 162–171.
- Scott, E. 2006. Cortisol and stress: How to stay healthy. Retrieved March 8, 2006 from http://stress.about.com/od/stress_health/a/cortisol.html.
- Sockman, K.W. and Schwabl Hubert. 1999. Daily Estradiol and Progesterone Levels Relative to Laying and Onset of Incubation in Canaries. *General and Comparative Endocrinology* 114, 257–268.
- Sundar, K.S.G. 2003. Notes on the Breeding Biology of the Black-necked Stork (*Ephippiorhynchus asiaticus*) in Etawah and Mainpuri Districts, Uttar Pradesh, India. *FORKTAIL* 19, 15-20.
- Wingfield, J.C., Hahn, T.P., Maney, D.L., Schoech, S.J., Wada, M. and Morton, M.L. 2003. Effects of temperature on photoperiodically induced reproductive development, circulating plasma luteinizing hormone and thyroid hormones, body mass, fat deposition and molt in mountain white-crowned sparrows (*Zonotrichia leucophrys oriantha*). *General and Comparative Endocrinology* 131, 143-158.
- Ziegler, T.E. and Wittwer, D.J. 2005. Fecal Steroid Research in the Field and Laboratory Improved Methods for Storage, Transport, Processing, and Analysis. University of Wisconsin. *American Journal of Primatology* 67, 159-174.