ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัดสายพันธุ์หางมงกุฎ (*Betta splendens* Regan)

EFFECT OF TEMPERATURE ON GONADAL DEVELOPMENT AND SEX DETERMINATION IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens* Regan), VARIETY CROWN TAIL

นรงค์ กมลรัตน์

NARONG KAMOLRAT

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

KMITL-2007-AG-M-018-126

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัดสายพันธุ์หางมงกุฎ (*Betta splendens* Regan)

EFFECT OF TEMPERATURE ON GONADAL DEVELOPMENT AND SEX DETERMINATION IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens* Regan), VARIETY CROWN TAIL

ณรงค์ กมลรัตน์

NARONG KAMOLRAT

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....77953
วัน,เดือน,ปี.....12 ก.พ. 2551

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

KMITL – 2007 – AG – M – 018 - 126

EFFECT OF TEMPERATURE ON GONADAL DEVELOPMENT AND SEX DETERMINATION IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens* Regan), VARIETY CROWN TAIL

NARONG KAMOLRAT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2007

KMITL – 2007 – AG – M – 018 - 126

COPYRIGHT 2007

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัดสายพันธุ์หางมงกุฎ

Effect of Temperature on Gonadal Development and Sex Determination in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens Regan*), Variety Crown Tail

ชื่อนักศึกษา นายณรงค์ กมลรัตน์

รหัสประจำตัว 47062805

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การประมง

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.สมชาย	หวังวิบูลย์กิจ	
ผศ.ดร.นงนุช	เลาหะวิสุทธิ์	
ดร.อัจฉรี	เรืองเดช	
ดร.สมศรี	งามวงศ์ชน	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 22 ตุลาคม 2550 เวลา 09.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A209 ตึกเจ้าคุณทหาร (ชั้น 2 โซน A)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัดสายพันธุ์ หางมงกุฎ (*Betta splendens* Regan)
นักศึกษา	นายณรงค์ กมลรัตน์
รหัสประจำตัว	47062805
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2550
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดวัยอ่อน เริ่มพบการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เมื่อลูกปลากัดอายุ 10 วัน ซึ่งอยู่ในระยะต้นๆ เมื่อลูกปลากัดอายุ 20 วันพบการพัฒนาของรังไข่และอัณฑะมากขึ้น ลูกปลากัดอายุ 30 วัน เพศผู้จะมีความพร้อมในการผสมพันธุ์ ซึ่งดูจากลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้อยู่ในระยะ spermatid ส่วนเพศเมียไข่อยู่ในระยะ tertiary yolk globule ซึ่งมีการสะสมตัวของหยดไขมันมากขึ้น

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศ อุณหภูมิทั้ง 7 ระดับคือ 20, 23, 26, 29, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส ให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยลูกปลาเพศผู้และเพศเมียมีจำนวนสูงที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (13.67$\pm$2.84 และ 21.33$\pm$1.45 ตัว) อัตรารอดตายของลูกปลาในแต่ละชุดการทดลอง 26.00$\pm$5.03, 39.33$\pm$1.76, 51.33$\pm$5.93, 50.11$\pm$0.67, 72.00$\pm$6.11, 45.60$\pm$2.00 และ 46.26$\pm$6.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระดับอุณหภูมิที่มีอัตรารอดดีที่สุดคือ 32 องศาเซลเซียส

อัตราการเจริญเติบโตของลูกปลาในแต่ละระดับอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ลูกปลามีขนาดใกล้เคียงกัน ทั้งน้ำหนักและความยาว การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ลูกปลากัดในแต่ละชุดการทดลองไม่พบความแตกต่าง โดยมีระยะการพัฒนาการใกล้เคียงกันในทุกระดับอุณหภูมิ

Thesis	Effect of Temperature on Gonadal Development and Sex Determination in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan), Variety Crown Tail.
Student	Mr. Narong Kamolrat
Student ID.	47062805
Degree	Master Degree of Science
Program	Fisheries Science
Year	2550
Thesis Advisor	Assist. Prof. Nongnuch Laohavisuti

ABSTRACT

The gonadal development in juvenile *Betta splendens* Regan had been investigated in the fish at the age between 1-30 day post fertilization. The gonadal development initially found in day 10 and clearly found in day 15-20, the ovary stage is in primary oocyte and secondary yolk globule stage, and moreover it was also found primary spermatogonia and primary spermatocyte stage in testis. The development showed spermatid stage in testis and tertiary yolk globule stage in ovary at day 30.

The investigation on the effect of temperature on sex determination showed that the treatment at 32 degree celsius provided the highly significant number of male and female (13.67$\pm$2.84 and 21.33$\pm$1.45 respectively). Survival rate in all treatments were 26.00+5.03, 39.33+1.76, 51.33+8.93, 50.11+0.67, 72.00+6.11, 45.60+2.00 and 46.26+6.93 percentage respectively. The sex ratio and survival rate were significant difference ($P<0.05$). In this study it is suggested that the optimum temperature for sex ratio, survival rate is 32 degree celsius. There were not significant difference ($P>0.05$) in growth performance and gonadal development.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาของข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้การดูแล และให้คำปรึกษาต่างๆ ในการทดลอง ตลอดจนชี้ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ให้คำปรึกษาชี้แนะ จนทำให้เกิดขบวนการทางความคิดเพื่อใช้ในการแก้ปัญหาการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านคำแนะนำต่างๆ สารเคมี ตลอดจนอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณ เพื่อนร่วมรุ่น น้องๆ ปริญญาโท และ น้องๆ ประมงรุ่น 10 และ 11 ทุกท่านที่ให้กำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆเรื่อง

ขอขอบคุณ คุณ เบญญาภา แสงจันทร์ ที่ค่อยเป็นกำลังใจให้เสมอมา รวมทั้งผู้ที่อยู่เบื้องหลังความสำเร็จในครั้งนี้ทุกๆท่าน

และสุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณ น้องสาวทั้ง 2 และญาติพี่น้องทุกๆท่านที่เป็นกำลังใจ คอยให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน

ณรงค์ กมลรัตน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VII

สารบัญภาพ..... VIII

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะของปลากัด..... 3

2.2 การศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา..... 5

2.2.1 การเกิดอวัยวะสืบพันธุ์..... 5

2.2.1.1 รังไข่ (ovary)..... 5

2.2.1.2 อัณฑะ (testis)..... 7

2.2.2 การควบคุมการสืบพันธุ์..... 8

2.2.3 การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์..... 9

2.2.4 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์..... 11

2.3 สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการกำหนดเพศในปลา..... 11

2.3.1 อุณหภูมิ (temperature)..... 11

2.3.2 ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)..... 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.3.3 ปัจจัยทางสังคม (social)..... 13

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย..... 14

3.1 สัตว์ทดลอง..... 14

3.2 อุปกรณ์..... 14

3.3 วิธีดำเนินการ..... 14

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดวัยอ่อน..... 14

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัด..... 16

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 18

3.5 สถานที่ทำการวิจัย..... 18

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย..... 18

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 19

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดวัยอ่อน..... 19

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัด..... 28

4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลากัด..... 28

4.2.2 อัตราการเจริญเติบโต..... 30

4.2.3 อัตรารอด..... 33

4.2.4 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัด..... 34

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 38

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บรรณานุกรม..... 40

ภาคผนวก..... 44

ภาคผนวก ก. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ..... 45

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมีและสีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ..... 48

ภาคผนวก ค. ข้อมูลแสดงผลการเจริญเติบโต อัตรารอด และเพศของลูกปลากัด.. 50

ภาคผนวก ง. การพัฒนาอวัยวะภายในลูกปลากัดอายุ 1-10 วัน..... 56

ประวัติผู้เขียน..... 61

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 จำนวนลูกปลากัดเพศผู้-เพศเมียและอัตรารอด ที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน 29

4.2 อัตราส่วนลูกปลากัดเพศผู้ต่อเพศเมียที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน..... 30

4.3 น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลากัด (มิลลิกรัม) ตั้งแต่อายุ 1-90 วัน..... 31

4.4 ความยาวเฉลี่ยของลูกปลากัด (เซนติเมตร) ตั้งแต่อายุ 1-90 วัน..... 31

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปลากัดจีน	4
2.2	ปลากัดหางมงกุฎ (crown tail)	4
2.3	ตำแหน่งอวัยวะภายในและอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา	5
2.4	ไข่ในระยะ alveolus oocytes ของปลาfathead minnow (*Pimephales promelas*)	6
2.5	ชนิดของเซลล์ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลา	7
2.6	ระยะการพัฒนาของอัณฑะในปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*)	8
2.7	ตำแหน่งจุดไข่นำ และ ลักษณะของท้อง ในปลากัดเพศเมีย	10
3.1	วิธีการเทียบคู่	15
3.2	ภาชนะพลาสติกสำหรับทำการผสมพันธุ์และเลี้ยงลูกปลากัด	15
4.1	ลูกปลากัดอายุ 10 วัน ตำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์และลักษณะของเซลล์	21
4.2	ลูกปลากัดอายุ 15 วัน เซลประสาทกับไขสันหลัง	22
4.3	ลูกปลากัดอายุ 15 วัน ไตส่วนหน้าและท่อไต	22
4.4	ลูกปลากัดอายุ 15 วัน อวัยวะสืบพันธุ์ในระยะเริ่มแรก	23
4.5	ลูกปลากัดอายุ 20 วัน เนื้อเยื่อชั้น mucosa และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้	24
4.6	ลูกปลากัดอายุ 20 วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ	24
4.7	ลูกปลากัดอายุ 20 วัน อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย	25
4.8	ลูกปลากัดอายุ 20 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ	25
4.9	ลูกปลากัดอายุ 25 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ	26
4.10	ลูกปลากัดอายุ 25 วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ	26
4.11	ลูกปลากัดอายุ 30 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ	27
4.12	ลูกปลากัดอายุ 30 วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ	27
4.13	ลูกปลาเพศผู้และเพศเมียเฉลี่ยที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.14	น้ำหนักของลูกปลากัด (มิลลิกรัม) ที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิน้ำที่ต่างกัน.....	32
4.15	ความยาวของลูกปลากัด (เซนติเมตร) ที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิน้ำที่ต่างกัน...	32
4.16	อัตรารอดของลูกปลาที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน.....	34
4.17	รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 29 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม).....	35
4.18	รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 20 องศาเซลเซียส.....	35
4.19	รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 38 องศาเซลเซียส.....	36
4.20	อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 29 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม).....	36
4.21	อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 20 องศาเซลเซียส.....	37
4.22	อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 38 องศาเซลเซียส.....	37

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากัด *(Betta splendens* Regan) เป็นปลาสวยงามที่มีการส่งออกมากเป็นอันดับต้นๆ ของปลาสวยงามที่มีการส่งออกในแต่ละปี โดยเฉพาะปลาเพศผู้ที่มีลักษณะรูปร่างและสีสันที่สวยงามกว่าปลาเพศเมีย ในปัจจุบันมีปลากัดสายพันธุ์ใหม่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก เช่น ปลากัดหางมงกุฎ (crown tail) ปลากัดหางพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (half moon) และ ปลากัดยักษ์ เป็นต้น ซึ่งปลากัดสายพันธุ์เหล่านี้มีลักษณะสวยงามแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามปัญหาสำคัญในการเพาะเลี้ยงปลากัดสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้น คือ ปลาที่ได้ลักษณะสวยงามตามต้องการในแต่ละรุ่นมีน้อยทำให้มีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด (วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และคณะ. 2531) แม้ว่าผู้เลี้ยงปลากัดไม่ประสบปัญหาในการเพาะพันธุ์ แต่ยังพบปัญหาในเรื่องเพศปลา โดยปลาเพศผู้เท่านั้นเป็นที่ต้องการของตลาดและสามารถขายได้ราคาดี ซึ่งการเพาะพันธุ์ปลากัดตามธรรมชาตินั้นจะได้ปลาเพศผู้น้อยกว่าปลาเพศเมีย โดยทั่วไปจะได้ปลาเพศผู้ 30-40 เปอร์เซ็นต์ และปลาเพศเมีย 60-70 เปอร์เซ็นต์ (มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และคณะ. 2531) มีการศึกษาการเปลี่ยนปลากัดเพศเมียเป็นปลากัดเพศผู้ได้สำเร็จโดยใช้ฮอร์โมน Fluoxymesterone แต่ยังคงมีปัญหาจากการใช้ฮอร์โมนเปลี่ยนแปลงเพศเนื่องจากปลากัดเพศเมียที่เปลี่ยนมาเป็นเพศผู้ ไม่สามารถแพร่ขยายพันธุ์ได้ (มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และคณะ. 2531) และการศึกษาต่อมานิยมใช้ฮอร์โมนเพศเมีย (estrogen) มาทำการแปลงปลาเพศผู้ให้เป็นเพศเมีย เพื่อนำปลาที่เปลี่ยนเพศไปผสมพันธุ์กับปลาเพศผู้ปกติ เป็นการเพิ่มสัดส่วนปลาเพศผู้ให้มากขึ้น พบได้ในปลาหลายชนิดเช่น ปลาหางนกยูง (*Poecilia racticulata*) (Kavumpurath and Pandian. 1992) และ ปลากัด (*Betta splendens* Regan) (นงนุช เลาหะวิสุทธิ์และคณะ. 2536) เป็นต้น

การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อ และการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัด ทำให้ทราบถึงระยะการเจริญพันธุ์ที่ชัดเจน เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาวิเคราะห์ร่วมกับการใช้ฮอร์โมน หรืออิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเปลี่ยนเพศปลา ทำให้สามารถกำหนดเพศปลาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลากระดี่ เนื่องจากมีความต้องการปลาเพศเมียมากกว่าปลาเพศผู้ ซึ่งปลากระดี่ขนาดเล็กนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศได้จากการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อทำให้ทราบระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ที่ชัดเจน และสามารถนำฮอร์โมนมาใช้เปลี่ยนเพศปลาก่อนระยะการเจริญพันธุ์ ทำให้ได้ปลาที่มีเพศตามที่ต้องการได้ (นวลมณี พงศ์ธนา และบัญชา ทองมี. 2538)

การกำหนดเพศของปลาขึ้นกับ 2 ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ องค์ประกอบของสารพันธุกรรม (gene) และ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ช่วงแสง ความเค็ม ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (Jobling. 1995) อุณหภูมิ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อกำหนดเพศในปลาซึ่งมีการศึกษาในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Baroiller and Cotta. 2001) ปลาทอง (*Carassius auratus*) (Kazeto *et al.* 2006) และปลา southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) (Luckenbach *et al.* 2003)

ดังนั้นการศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัด และผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลากัด รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของปลาที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิน้ำที่ระดับต่างกัน เป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงปลากัดให้ได้เพศปลาตามที่ตลาดต้องการ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าทางการค้าของปลากัดต่อไปในอนาคต

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดวัยอ่อน

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการกำหนดเพศปลากัด

1.2.3 เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและอัตรารอดของลูกปลากัดหลังจากแช่ที่อุณหภูมิน้ำต่างกัน

1.2.4 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์ของปลากัดหลังจากแช่ที่อุณหภูมิน้ำต่างกัน

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทำให้ทราบถึงขั้นตอนการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดวัยอ่อน

1.3.2 ทำให้ทราบระดับของอุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศผู้และเพศเมียในลูกปลากัด

1.3.3 นำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปพัฒนาวิธีการ เพิ่มผลผลิตลูกปลากัดเพศผู้ต่อไป

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะของปลากัด

ปลากัดมีชื่อสามัญว่า Siamese fighting fish มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Betta splendens* Regan จัดอยู่ใน Subfamily Macropodinae Family Belontiidae (Nelson. 1994)

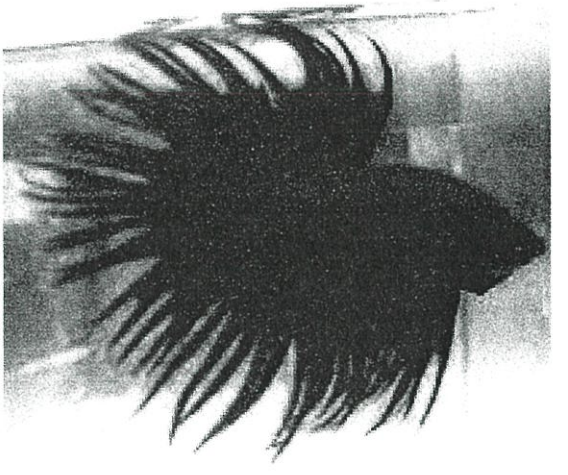
ปลากัดเป็นปลาพื้นเมืองของไทย พบแพร่กระจายไปทุกภาคของประเทศ อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีระดับน้ำตื้นๆ น้ำค่อนข้างใส น้ำนิ่งหรือไหลเอื่อยๆ มีพรรณไม้น้ำขึ้นประปราย ชอบว่ายน้ำช้าๆ บริเวณผิวน้ำ เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก ขนาดเฉลี่ยประมาณ 5 เซนติเมตร ปลากัดเลี้ยงมีอายุเฉลี่ย 2 ปี หรือน้อยกว่า ปลากัดพันธุ์ดั้งเดิมในธรรมชาติ มีสีน้ำตาลขุ่นหรือสีเทาแกมเขียว มีลายตามตัว ครีบและครีบหางสั้น ปลาเพศผู้มีครีบและครีบหางยาวกว่าเพศเมียเล็กน้อย ลำตัวยาว แบนข้าง หัวเล็ก ปากขนาดเล็กเชิดขึ้นข้างบนเล็กน้อย (วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2528) มีฟันที่ขากรรไกรบนและขากรรไกรล่าง มีเกล็ดปกคลุมหัวและลำตัว ความยาวจากปลายจงอยปากถึงโคนครีบหาง 2.9-3.3 เท่าของความกว้างลำตัว และ 3.0-3.3 เท่าของความยาวหัว จุดเริ่มต้นของครีบหลังอยู่ค่อนไปทางด้านหางหลังจุดเริ่มต้นของครีบก้น ครีบหลังมีก้านครีบเดี่ยว 1-2 ก้าน ก้านครีบแขนง 7-9 ก้าน ครีบก้นมีฐานครีบยาวมาก เริ่มจากครีบท้องไปสุดที่โคนครีบหาง มีก้านครีบเดี่ยว 2-4 ก้าน และก้านครีบแขนง 21-24 ก้าน ครีบอกมีขนาดเล็กกว่าครีบอื่นๆ ปลากัดไม่มีเส้นข้างลำตัว กระดูกที่อยู่ด้านนอกของตา (preorbital) มีขอบเรียบ มีอวัยวะพิเศษช่วยหายใจนอกจากเหงือก เรียก labyrinth organ อยู่ในโพรงอากาศหลังช่องเหงือก มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่มีรอยหยักและมีเส้นเลือดฝอยมาหล่อเลี้ยงมากมายทำให้ปลากัดสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนในน้ำ แต่ในปลาวัยอ่อนจะไม่พบอวัยวะช่วยหายใจดังกล่าว ปลากัดจะเริ่มมีอวัยวะดังกล่าวเมื่ออายุประมาณ 10 วัน เนื่องจากปลากัดต้องใช้อวัยวะช่วยในการหายใจทำให้ต้องโผล่ขึ้นมาฮุบอากาศที่ผิวน้ำเสมอ ปลากัดเป็นปลาที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อไว้ดูเล่น เพื่อกีฬากัดปลาและเป็นที่รู้จักกันดีในต่างประเทศมานานเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงและเพาะพันธุ์ได้ง่าย ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลากัดกันแพร่หลาย จากการเพาะพันธุ์และการคัดเลือกพันธุ์ติดต่อกันมานาน ทำให้ได้ปลากัดที่มีสีสวยงามหลายสี อีกทั้งลักษณะครีบก็แผ่กว้างใหญ่สวยงามกว่าพันธุ์ดั้งเดิมมาก และจากสาเหตุนี้ทำให้มีการจำแนกพันธุ์ปลากัดออกไปได้เป็นหลายชนิด เช่น ปลากัดหม้อ ปลากัดทุ่ง ปลากัดจีน ปลากัดเขมร เป็นต้น (วันเพ็ญ มีนกาญจน์และคณะ. 2531)

ปลากัดครีบยาว หรือ ปลากัดจีนมีการพัฒนาสายพันธุ์มาจากปลากัดพื้นบ้านครีบสั้นจนได้ลักษณะครีบหางยาวคล้ายปลาพู่กันจีน (comb tail) (ภาพที่ 2.1) ต่อมามีการนำปลากัดจีนไปปรับปรุงพันธุ์จนได้ปลาที่มีลักษณะครีบใหญ่และสวยงามขึ้น คือ ปลากัดหางมงกุฎ (crown tail)

และ ปลากัดหางพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว (half moon) ซึ่งปลากัดทั้ง 2 ชนิดนี้มีราคาสูงกว่าปลากัดบ้านและปลากัดจีน และยังเป็นที่ต้องการของตลาด ปลากัดหางมงกุฎถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1997 ที่ประเทศอินโดเนเซีย ผู้ที่ทำการผสมพันธุ์ขึ้นมาคือ Achmad Yusuf มีชื่อเรียกเป็นภาษาท้องถิ่นว่า "cupang serit" หลังจากนั้น Henry Yin ได้นำปลากัดหางมงกุฎ ไปแสดงในงาน IBC show และได้เปลี่ยนชื่อเป็น "crown tail" (Pamell. 2007) ส่วนประเทศไทยเรียกปลากัดหางมงกุฎ (ภาพที่ 2.2) ว่า ปลากัดหนามเตย ซึ่งมาจากลักษณะปลายหางที่เป็นแฉกแหลมคล้ายหนามแหลมที่จับเม็ดพลอยบนแหวนหรือที่เรียกว่า หนามเตย (สันธนะ พันธุมะโชติ. 2550)

ภาพที่ 2.1 ปลากัดจีน

ที่มา : http://home.kku.ac.th/pracha/Betta.htm



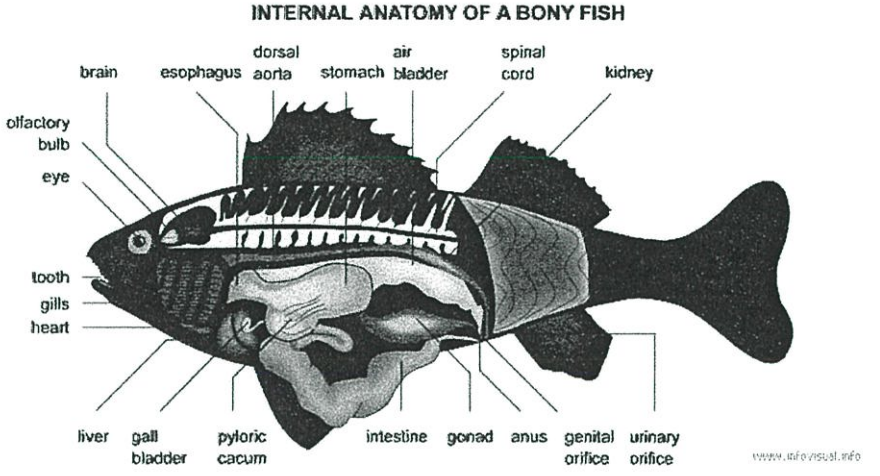
ภาพที่ 2.2 ปลากัดหางมงกุฎ (crown tail)

ที่มา : http://home.kku.ac.th/pracha/Betta.htm

2.2 การศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา

2.2.1 การเกิดอวัยวะสืบพันธุ์

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลา อยู่ในบริเวณช่องว่างตอนปลายของลำตัวใต้ไตส่วนปลาย โดยอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ติดกับเยื่อบุช่องท้องซึ่งปกคลุมไตอยู่ โดยมีเยื่อ mesenteries ยึดอวัยวะสืบพันธุ์ไว้กับเยื่อบุช่องท้อง (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ. 2530) โดยปกติอวัยวะสืบพันธุ์มี 2 ส่วนวางขนานกันแบบสมมาตร (symmetry) แต่ในปลาบางชนิดอาจมีการรวมอวัยวะสืบพันธุ์ทั้ง 2 ข้างเข้าไว้ด้วยกัน หรือ อวัยวะสืบพันธุ์ข้างใดข้างหนึ่งหดหายไปเหลือเพียงร่องรอยให้เห็น (Balon. 1983) (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 ตำแหน่งอวัยวะภายในและอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา

ที่มา : http://www.infovisual.info/02/033_en.html

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเกิดจาก เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ (primordial germ cell) โดยมีการพัฒนาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือในส่วนที่เป็นเปลือก (cortex) จะเจริญเป็นสันไปตามความยาวของผนังช่องท้องและเจริญไปเป็นส่วนของรังไข่ (ovary) ส่วนที่เป็นเนื้อ (medulla) เจริญในส่วนตรงกลางกลายเป็นส่วนของอัณฑะ (testis) ซึ่งลูกปลาแต่ละตัวมีการเจริญของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดแตกต่างกันไป เป็นการกำหนดเพศของปลาว่าเป็นเพศใดเพศหนึ่ง การที่กำหนดว่า primordial germ cell ส่วนใดจะเจริญขึ้นอยู่กับฮอร์โมน (hormone) 2 ชนิดที่เป็นตัวกำหนดเพศคือ แอนโดรเจน (androgen) ที่กำหนดให้เป็นเพศผู้และ เอสโตรเจน (estrogen) ที่กำหนดให้เป็นเพศเมีย อวัยวะสืบพันธุ์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการเซลล์สืบพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Balon. 1983)

2.2.1.1 รังไข่ (ovary)

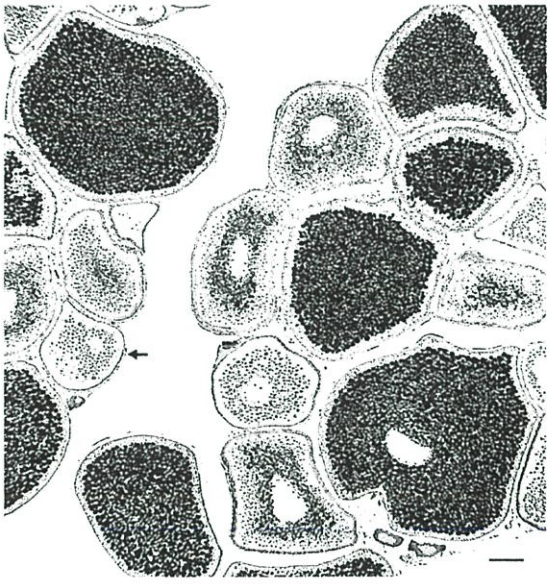
รังไข่เป็นอวัยวะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือไข่ มีรูปร่างเรียวยาวไปตามความยาวของลำตัว หรืออาจเป็นรูปสามเหลี่ยมปรากฏอยู่ในช่องท้องด้านบนแต่คล้อยไปทางด้านหลัง มีเยื่อ

ยึดติดกับผนังช่องท้อง เรียกว่า mesovarium ภายในรังไข่ประกอบไปด้วยถุงสร้างไข่ (ovarian follicle) ที่พัฒนามาจาก germinal epithelium ที่หุ้มรังไข่ทั้งภายนอกและภายใน เยื่อบุผิวชั้นในของช่องว่างในรังไข่จะมีลักษณะเป็นคลื่น เรียกว่า ovigerous fold ไข่ปลาที่สร้างจากถุงสร้างไข่เรียกว่า oocyte ซึ่ง oocyte สะสมไข่แดง (vitellogenin) ไว้มากและขยายตัวขึ้น ทำให้รังไข่ขยายตัวตามด้วย ปริมาณไข่ปลามีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ไข่ปลาได้รับฮอร์โมนมากระตุ้นให้เกิดการสุกและหลุดออกมาจากถุงสร้างไข่เข้าไปในกรวยนำออกสู่ภายนอกร่างกาย โดยผ่านท่อนำไข่ (oviduct) ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อมีช่องเปิดทั้ง 2 ข้าง ใช้สำหรับรับไข่จากรังไข่เข้าสู่ภายในช่องท้องและเปิดออกสู่ภายนอกทางทวาร (cloaca) และยังทำหน้าที่สร้างเปลือกไข่ด้วย (Blaxter. 1969) รังไข่สามารถแบ่งตามการเจริญของ oocyte มีด้วยกัน 3 ลักษณะคือ

(1) synchronous รังไข่มี oocyte อยู่ในระยะการเจริญพร้อมกันทั้งหมด พบในปลาที่วางไข่เพียงครั้งเดียว เช่น ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus* sp.)

(2) group synchronous รังไข่มี oocyte ที่มีการเจริญและพัฒนาอย่างน้อย 2 ช่วงเวลาในรอบปี ส่วนใหญ่เป็นปลาที่วางไข่ปีละครั้งและช่วงฤดูวางไข่สั้นพบในปลา flounder (*Liopsetta abscura*) และปลา rainbow trout (*Salmo gairdner*)

(3) asynchronous รังไข่มี oocyte ที่เจริญทุกระยะ ปลาที่มีรังไข่แบบนี้จะวางไข่ได้ปีละหลายครั้งและช่วงฤดูวางไข่ยาวนาน พบในปลาทอง (*Carassius auratus*) ปลากัด (*Betta splendens* Regan) และปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) (ภาพที่ 2.4)

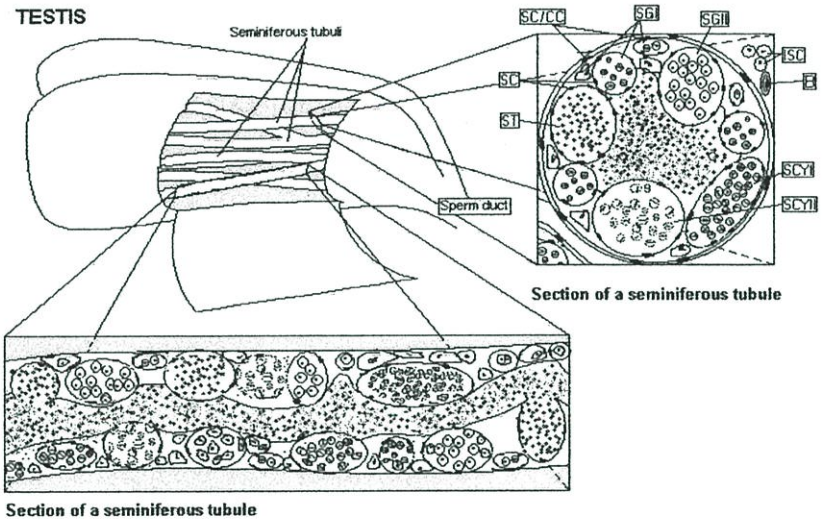


ภาพที่ 2.4 ไข่ในระยะ alveolus oocyte (ปลายลูกศรชี้) ของปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) ขนาด 165 μm.

ที่มา : Leino *et al.* (2005)

2.2.1.2 อัณฑะ (testis)

อัณฑะเป็นอวัยวะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พู อยู่ภายในช่องท้อง ติดกับผนังช่องท้องด้านบน โดยมีเยื่อบางๆ ยึดเอาไว้ ปลายด้านหนึ่งของทั้ง 2 พูจะมาเชื่อมรวมกัน เป็นท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ซึ่งมีขนาดสั้นๆ และไปเปิดออกสู่ยูโรเจนิทอล พอร์ (urogenital pore) ซึ่งเป็นช่องเปิดร่วมของปัสสาวะและน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกตัวปลา (อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538) ขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) เรียกว่า spermatogenesis โดยเริ่มจากเซลล์ใน spermatogonia จะมีการแบ่งเซลล์แบบธรรมดา (mitosis) ทำให้มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ละเซลล์เจริญและพัฒนาไปเป็นระยะ primary spermatocyte จากนั้นเซลล์ spermatocyte จะมีการแบ่งตัวแบบ meiosis ทำให้ chromosome ลดลงครึ่งหนึ่ง กลายเป็น spermatocyte ขั้นที่ 2 (secondary spermatocyte) เซลล์ทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และจะทำการแบ่งเซลล์แบบ mitosis อีกครั้งหนึ่ง ทำให้ได้เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatid) เป็น 4 เท่าของจำนวนเซลล์ spermatogonia (Billard *et al.* 1982) (ภาพที่ 2.5 และ 2.6)



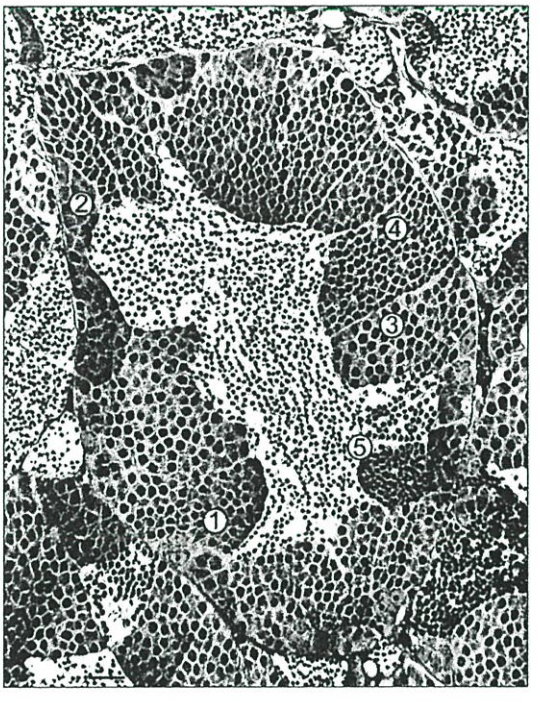
ภาพที่ 2.5 ชนิดของเซลล์ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลา connective tissue cells (CC), sertoli cells (SC), primary spermatogonia (SGI), spermatogonia (SGII), primary spermatocytes (SCYI), secondary spermatocytes (SCYII), spermatids (ST) และ finally spermatozoa (S) ด้านนอกประกอบไปด้วย interstitional cells (ISC) และ blood vessels (B)

ที่มา : Foberg. (2003)

โครงสร้างของอัณฑะในปลากระดูกแข็งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา Billard *et al.* (1982) ได้อธิบายลักษณะอัณฑะของปลา โดยจำแนกตามการเจริญของ germinal tissue ได้ 2 แบบ คือ

(1) lobular ประกอบด้วยพูเล็กๆ (lobules) เป็นจำนวนมากแต่ละพูแยกออกจากกันด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous connective tissue) แต่ละพูมี primary spermatogonia แบ่งตัวแบบ mitosis ซึ่งภายในบรรจุด้วย spermatogonial cell ในช่วงระยะการเจริญพันธุ์ germ cell ทั้งหมดภายในถุงจะอยู่ในระยะเดียวกัน เมื่อเกิดขบวนการสร้างเชื้อตัวผู้ ถุงจะขยายใหญ่และในที่สุดจะแตกออก น้ำเชื้อไหลลงสู่ lobular lumen ซึ่งเชื่อมต่อกับ sperm duct พบได้ในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ เช่น ปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) (ภาพที่ 2.6)

(2) tubular ประกอบด้วยท่อเล็กๆ (tubules) primary spermatogonia เกิดอยู่ที่ปลายของ tubules เมื่ออยู่ในระยะการเจริญพันธุ์ ท่อเล็กๆทำหน้าที่ขับน้ำเชื้อให้เคลื่อนที่มาอยู่กลางอัณฑะและผ่านออก vas efferens (efferent duct) พบในปลากลุ่ม atheriniform เช่น ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*)



ภาพที่ 2.6 ระยะการพัฒนาของอัณฑะในปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*)

(1) primary spermatogonia, (2) secondary spermatogonia, (3) primary spermatocyte, (4) secondary spermatocyte, and (5) spermatids

ที่มา : Leino *et al.* (2005)

2.2.2 การควบคุมการสืบพันธุ์

การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ เป็นตัวกระตุ้นให้อวัยวะรับสัมผัส (sensory organ) ส่งสัญญาณไปยังสมอง (central nervous system , CNS) สัญญาณเหล่านี้ถูกส่งต่อไปยังสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ซึ่งตอบสนองโดยสร้าง รีลีสซิงฮอร์โมน

(releasing hormone) และปล่อยไปกระตุ้นต่อมใต้สมอง (pituitary gland หรือ hypophysis) urohormone ให้สร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) เป็นสารประกอบโปรตีน มีโมเลกุลขนาดเล็กปล่อยไปตามกระแสเลือดไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะสืบพันธุ์ ฮอร์โมนนี้กระตุ้นให้อวัยวะสืบพันธุ์สร้างฮอร์โมนเพศ แต่ในขณะเดียวกันก็ผลิต ฮอร์โมน อีกชนิดคือ GRIF (gonadotropin release inhibitory factor) เป็นกลุ่ม dopamine ซึ่งเป็นตัวยับยั้งไม่ให้ต่อมใต้สมองผลิต gonadotropin hormone (GTH) ส่งไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ต่อไป (Goetz. 1983)

ต่อมใต้สมองจะผลิตฮอร์โมน GTH ขึ้นมาหลังจากที่ได้รับฮอร์โมน GnRH ที่มากระตุ้นจากสมองโดยตรง ซึ่งจะส่งไปยังอัณฑะและรังไข่ให้มีการสะสมและสร้างน้ำเชื้อ และไข่ขึ้นมา และผลิตฮอร์โมน GH (growth hormone) ส่งไปยังอัณฑะกระตุ้นให้สร้างฮอร์โมน testosterone ซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญหรือการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเพศภายนอก เช่น pearl organs tubercles gonopodium ครีบ ติ่งเพศ สีและรูปทรงของลำตัว ทั้งนี้ยังควบคุมการแสดงออกของพฤติกรรมในการสืบพันธุ์อีกด้วยเช่น ความก้าวร้าว การป้องกันอาณาเขต การสร้างรังวางไข่ การดูแลตัวอ่อน เป็นต้น และยังผลิตฮอร์โมน GTHII ส่งไปยังรังไข่เพื่อกระตุ้นให้รังไข่สร้างฮอร์โมน estradiol ขึ้นมาแล้วส่งไปยังตับเพื่อกระตุ้นให้ตับสร้าง vitelloprotein ส่งไปตามกระแสเลือดไปสะสมไว้ที่ไข่แดงใน yolk sac หรือส่วนที่จะมีการสร้างเป็นไข่ขึ้นมา (Goetz. 1983)

2.2.3 การเจริญและพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์

การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาประกอบด้วยระยะต่างๆ (Donaldson and Hunter. 1983) ได้แก่

ระยะที่ 1 ปลายังมีอายุน้อยอวัยวะยังไม่พัฒนาอาจมองเห็นเป็นเส้นเล็กมาก

ระยะที่ 2 ปลาเริ่มมีการพัฒนาของอวัยวะเพศเป็นเส้นขนาดเล็กที่เริ่มขยายตัวออกมาให้มองเห็นชัดเจนด้วยตาเปล่า

ระยะที่ 3 อวัยวะเพศพัฒนามากกว่าเดิมสามารถมองเห็นไข่ในรังไข่ที่ขยายตัวโป่งออกมา อัณฑะจะเปลี่ยนจากสีใสเป็นสีขาวขุ่น มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงที่รังไข่และอัณฑะมากพอสมควร

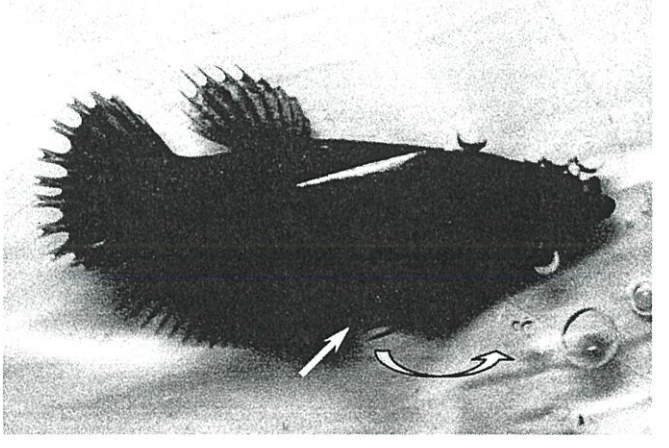
ระยะที่ 4 รังไข่และอัณฑะพัฒนามากที่สุด จนถึงขั้นที่ไข่ในรังไข่นั้นเริ่มสุก และน้ำเชื้อในอัณฑะพร้อมที่จะใช้ผสมพันธุ์ได้ มีเส้นเลือดมาเลี้ยงที่รังไข่และอัณฑะเป็นจำนวนมาก สามารถมองเห็นได้ชัดเจน

ระยะที่ 5 ไข่และน้ำเชื้อตัวผู้ที่พร้อมแล้วจะถูกปล่อยออกมาผสมกันภายนอกและรังไข่และอัณฑะจะลดขนาดลง

ระยะที่ 6 เป็นระยะหลังจากได้มีการสืบพันธุ์ไปแล้ว ทั้งรังไข่และอัณฑะจะเหี่ยว ไม่มีไข่เหลืออยู่เลยในพวกที่มีการสืบพันธุ์ปีละครั้ง แต่ในพวกที่มีการสืบพันธุ์เป็นช่วงๆ จะมีไข่อ่อนอยู่ในรังไข่บางส่วน และเส้นเลือดที่มาเลี้ยงก็จะลดขนาดลงไป

นวลมณี พงศ์ธนา และบัญชา ทองมี (2538) ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสลิด ตั้งแต่อายุ 5 วันจนถึงอายุ 60 วัน พบการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสลิดเมื่อปลามีอายุ 10 วัน และความแตกต่างระหว่างเพศของปลาสลิดได้โดยดูจากลักษณะภายนอกเมื่อปลามีอายุ 25 วัน การศึกษาการพัฒนาเนื้อเยื่อของปลาบึกวัยอ่อนอายุ 1-12 วัน (สุปราณี ชินบุตร และคณะ. 2531) และ ปลากะพงขาววัยอ่อน อายุ 1–27 วัน (ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ. 2528) ไม่พบการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ในช่วงอายุดังกล่าว ส่วนการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาที่มีขนาดใหญ่และช่วงอายุยืนยาว จากการศึกษาเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลากะรัง (*Epinephelus malabaricus*) พบการพัฒนารังไข่ของปลากะรังเมื่อมีอายุ 15 เดือน และคาดว่าปลาอายุ 22 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 3.7 กิโลกรัม สามารถวางไข่ได้ และอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้สมบูรณ์ครั้งแรกเมื่ออายุ 34 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 6 กิโลกรัม ทำให้ทราบว่าการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เกิดขึ้นเมื่อถึงอายุช่วงหนึ่งก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (เรณู ยาชิโร และคณะ. 2536)

การพัฒนารังไข่ของปลากัดไทยประกอบด้วย chromatin-nucleolus oocyte, perinucleolus oocyte, cortical alveoli oocyte, vitellogenic oocyte และ maturing oocyte ในลูกปลาวัยอ่อนพบไข่ในระยะ chromatin-nucleolus oocyte จนถึง ระยะ perinucleolus และปลาที่สมบูรณ์เพศ พบการพัฒนาของไข่ในระยะ vitellogenic oocyte และ maturing oocyte มากขึ้น จึงทำให้ทราบว่าปลากัดเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์สามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี ทั้งนี้ความสมบูรณ์ของไข่และความดกของไข่จะขึ้นอยู่กับอายุของปลากัด ซึ่งอยู่ในช่วงอายุ 4-10 เดือน (นันทริกา ชันซื่อและคณะ. 2546) และความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลากัดสามารถดูได้จากลักษณะภายนอก เช่น ขอบเหงือก เส้นข้างตัวมีสีเข้มขึ้นหรือที่เรียกว่า ลายชะโด บริเวณรูก้นมีลักษณะเป็นจุดสีขาวคล้ายเม็ดไข่ หรือที่เรียก ไข่นำ (ภาพที่ 2.7) และ ขนาดของลำตัวที่ขยายใหญ่ขึ้น (ชัย เกียรติ์นีรนาท และบุญชัย อัศวกิจวานิช. 2548)



ภาพที่ 2.7 ตำแหน่งจุดไข่นำ และ ลักษณะของท้อง ในปลากัดเพศเมีย

2.2.4 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์

ปลาวางไข่ในสภาพที่เหมาะสมโดยการเลือกช่วงเวลา ในการวางไข่ของปลาขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของอาหารสำหรับลูกปลา การเลือกช่วงเวลาที่เหมาะสมเป็นการเพิ่มอัตรารอดให้กับลูกปลา โดยระดับความสมบูรณ์ของอาหารสำหรับลูกปลาวัยอ่อน ขึ้นอยู่กับฤดูกาลในรอบปี ปลาแต่ละชนิดจะมีช่วงการวางไข่อาจเป็นช่วงสั้นๆ หรือระยะเวลายาวนานเกือบตลอดปี ดังนั้นไข่และน้ำเชื้อปลามีการเจริญพัฒนามาก่อนหน้านั้นโดยมีสิ่งแวดล้อมเป็นตัวควบคุมและกระตุ้นการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ช่วงระยะเวลาของแสง อุณหภูมิ และปริมาณอาหาร (Bye. 1983)

2.3 สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการกำหนดเพศในปลา

สิ่งแวดล้อมเป็นตัวกำหนดเพศที่สำคัญอย่างหนึ่ง (environmental sex determination, ESD) ซึ่งในการเลี้ยงปลาเพื่อให้ได้ลักษณะตามต้องการ การควบคุมสภาพแวดล้อมเป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปลา โดยการปรับสภาพแวดล้อมให้ต่างออกไปหรือให้ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่ทำให้เกิดเพศใดเพศหนึ่งสูงที่สุด การกำหนดเพศปลามีหลายปัจจัย ปัจจัยหลักของการกำหนดเพศในปลา คือ อุณหภูมิ รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความหนาแน่นของประชากรและปัจจัยทางสังคม ตามลำดับ (Baroiller and Cotta. 2001)

2.3.1 อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญในการกำหนดเพศของลูกปลา Devlin and Nagahama (2002) พบว่าอุณหภูมิมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบโปรตีนในสารสเตอรอยด์ที่เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเพศที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนเพศ และปลาที่เกิดการเปลี่ยนเพศมักมีระดับของสเตอรอยด์ฮอร์โมนเพศเปลี่ยนแปลงไปด้วย (Nagahama. 1983) ในช่วงต้นของชีวิต ลูกปลายังไม่กำหนดเพศที่แน่ชัด ถ้ามีระดับของ สเตอรอยด์ฮอร์โมนชนิด แอนโดรเจน หรือ เอสโตรเจน ที่พบในร่างกายชนิดใดชนิดหนึ่งสูงกว่าจะส่งผลให้ลูกปลาเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย ขบวนการที่เกิดขึ้นโดยสเตอรอยด์ฮอร์โมน จะเข้าไปกระตุ้นต่อมพิทูอิตารี (pituitary) ให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนไปกระตุ้นให้ ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) หลั่งฮอร์โมนไปกระตุ้นให้อวัยวะสืบพันธุ์หลั่ง แอนโดรเจน หรือ เอสโตรเจน โดยที่ปริมาณฮอร์โมนแต่ละชนิดที่หลั่งออกมาให้อวัยวะสืบพันธุ์ พัฒนาไปเป็นรังไข่ หรือ อัณฑะ ต่อไป เอ็นไซม์บางชนิดทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการสร้างสารสเตอรอยด์ฮอร์โมน หรือเป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมนเพศ ที่ทำการศึกษากันมากคือ อะโรมาเทส (aromatase) ซึ่งเป็นเอ็นไซน์ของฮอร์โมนเอสโตเจนในเพศเมีย ซึ่งสร้างจากเนื้อเยื่อสมอง และรังไข่ โดยระดับของอะโรมาเทส จะเพิ่มหรือลดขึ้นกับอุณหภูมิ และยังขึ้นกับชนิดของปลาด้วย ส่วนใหญ่การใช้สิ่งแวดล้อมเปลี่ยนเพศปลาจะใช้อุณหภูมิเป็นตัวหลักในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนเพศในลูกปลา ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับเรื่องดังกล่าวในปลาเขตหนาวมีมากกว่าปลาเขตร้อนเนื่องจากความ

แตกต่างของอุณหภูมิของฤดูกาลในเขตหนาวมีมากกว่าในเขตร้อน Luckenbach *et al.* (2003) ได้ทดลอง เลี้ยงลูกปลา southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 18, 23 และ 28 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่า ลูกปลาเปลี่ยนเป็นเพศผู้ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับ Baroiller and Cotta (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเปลี่ยนเพศลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิพื้นฐานและ 36 องศาเซลเซียส พบว่า ลูกปลานิลเปลี่ยนเป็นเพศผู้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไปที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ต่อมา Baras *et al.* (2001) ทดลองผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของเพศในลูกปลานิลวัยอ่อน (*O. niloticus*) จากการเพิ่มอุณหภูมิ จาก 20.4 ถึง 39.0 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง แล้วลดระดับกลับมาให้อยู่ที่ระดับ 27 องศาเซลเซียส ภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าช่วงอุณหภูมิ 35-38 องศาเซลเซียส ทำให้ลูกปลานิลเป็นเพศผู้มากขึ้น สอดคล้องกั Desprez and Melard (1998) นำลูกปลา blue tilapia (*O. aureus*) ระยะ fry (อายุ 9 วันหลังจากออกจากไข่ ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส) เลี้ยงที่อุณหภูมิ 21, 27 และ 34 องศาเซลเซียส พบว่าลูกปลาอายุ 60 วัน มีอัตราส่วนเพศผู้สูงถึง 97.8 และ 63 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 34 และ 27 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ลูกปลาไม่สามารถระบุเพศที่ชัดเจนได้เนื่องจากลูกปลามีอัตรารอดต่ำ แต่แนวโน้มมีความเป็นไปได้ว่าเป็นเพศเมีย เมื่อพิจารณาจากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาในชุดการทดลองเปรียบเทียบกับอวัยวะสืบพันธุ์ปลาเพศเมียที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

Kazeto *et al.* (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศในปลาทองเพศเมีย (*Carassius auratus*) (กลุ่มประชากรเพศเมีย : XX female – XX male) โดยนำไข่ปลาทองไปฟักและเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23±0.5 องศาเซลเซียส จนลูกปลามีอายุ 12 วัน ทำการทดลองโดยเพิ่มระดับอุณหภูมิ 0.5 องศาทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง พบว่า ลูกปลาทองเปลี่ยนเป็นเพศเมีย 94.6, 100, 94.6, 90.5, 46.5, 15.5 และ 7.7 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 15, 17, 20, 23, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงระดับของอุณหภูมิส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลา ปลาแต่ละชนิดมีขีดจำกัดในการปรับตัวตามระดับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ซึ่งถ้าเกินระดับที่ลูกปลาสามารถทนได้ก็ส่งผลทำให้เกิดอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น เช่น ลูกปลานิลระยะ Juvenile ตายที่ระดับอุณหภูมิ 38.5-39.0 องศาเซลเซียส (Baras *et al.* 2001) และจากการศึกษาการกำหนดเพศในปลา blue tilapia (*O. aureus*) พบว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำ 21องศาเซลเซียส ลูกปลามีอัตรารอดเพียง 44.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าอัตรารอดปกติคือที่ 73.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่สามารถนำผลการทดลองไปใช้อ้างอิงในเรื่องอัตราส่วนเพศได้ (Desprez and Melard. 1998)

2.3.2 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH)

ความเป็นกรด-ด่างของน้ำ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการกำหนดเพศในปลา ซึ่งช่วงของค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำนั้นแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา Rubin (1985) ได้ทำการเลี้ยง ปลาหมอสี 5 สายพันธุ์ *Pelvicachromis pulcher, P. laeniatus, P. subcellatus, Apistogramma borelli, A. caucaloides* และ ปลาสอด (*Xiphopholus helleri*) เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ระดับ pH 2 ระดับคือ ช่วง pH ต่ำ (pH 5.05, 5.40, 5.50, 5.80, 5.80 และ 6.20) และ ช่วง pH เป็นกลางถึง pH สูง (pH 6.90, 7.00, 7.00, 7.10, 7.10 และ 7.80) พบว่าที่ pH ต่ำ ลูกปลาเป็นเพศผู้ร้อยละ 96, 89, 87, 91, 92 และ 100 ตามลำดับ ส่วนช่วง pH กลาง ถึง pH สูง ลูกปลาเป็นเพศผู้ร้อยละ 20, 11, 11, 9, 13 และ 3 ตามลำดับ

2.3.3 ปัจจัยทางสังคม (social)

การเปลี่ยนเพศในปลาหลายชนิดเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพทางสังคม เช่น เมื่อเพศผู้ในฝูงตายลงหรือหนีไปอยู่ที่อื่น ปลาเพศเมียที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้แทน การเปลี่ยนแปลงนี้จะใช้เวลาประมาณ 4 วันเท่านั้น ในธรรมชาติปลาเพศเมียมักจะมีจำนวนมากกว่าเพศผู้เสมอ ดังนั้นอัตราการเปลี่ยนเพศเป็นเพศผู้ที่สูงขึ้น จึงมีประโยชน์มากต่อการเพิ่มจำนวนประชากร การเปลี่ยนเพศเป็นเพศเมียสามารถพบได้ในปลาหลายชนิดเช่น ปลาการ์ตูน (anemone fish) ซึ่งจะอยู่กันเป็นฝูงเล็ก มีเพียงเพศเมียที่มีขนาดใหญ่ที่สุดและเพศผู้ที่ผสมพันธุ์ได้เท่านั้น และปลาเพศเมียจะมีมากกว่าเพศผู้ ถ้าปลาเพศเมียตัวที่ใหญ่ที่สุดตายลง ปลาเพศผู้จะเปลี่ยนเป็นเพศเมียแทน ลูกปลาที่ตัวใหญ่ที่สุดจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้แล้วไปผสมพันธุ์กับปลาเพศเมียที่เพิ่งเปลี่ยนเพศมา นอกจากข้อดีต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว การเปลี่ยนเพศก็มีข้อเสียเช่นกัน ในช่วงการเปลี่ยนแปลง ไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ อีกทั้งต้องใช้พลังงานมากและไม่สามารถดูแลฝูงและอาณาเขตได้ (Devlin and Nagahama. 2002)

ปลาบางชนิดมีการเปลี่ยนแปลงเพศมากกว่า 1 ครั้ง ได้แก่ ปลาที่อาศัยอยู่ตามแนวปะการังอย่างน้อย 3 ชนิด red head goby (*Paragobiodon echinocephalus*), yellow hawk fish (*Cirrhitichthys aureus*), okinawa rubble goby (*Trimma okinawae*) ที่เปลี่ยนเพศหลายครั้ง ปลา okinawa rubble goby ปลาเพศเมียจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้เมื่อไม่มีปลาเพศผู้อยู่ในฝูง แต่ปลาเพศผู้ที่เพิ่งเปลี่ยนเพศนี้จะเปลี่ยนกลับไปเป็นปลาเพศเมียเมื่อมีปลาตัวผู้ขนาดใหญ่กว่าเข้ามาในฝูง ความถี่ของการเปลี่ยนเพศจะขึ้นอยู่กับเสถียรภาพของระบบสังคมภายในฝูง (Devlin and Nagahama. 2002)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ปลากัดสายพันธุ์หางมงกุฎ ที่มีความสมบูรณ์เพศ อายุ 3-4 เดือน เพศผู้และเพศเมียมีขนาดใกล้เคียงกัน สภาพแข็งแรง ไม่มีอาการติดเชื้อโรค อย่างละ 30 ตัว จากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลากัดหางมงกุฎใน ตำบลโพรงมะเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ภาชนะพลาสติกทรงสีเหลี่ยมขนาด 25.5 X 18.5 X 22 เซนติเมตร ความจุ 5 ลิตร (ภาพที่ 3.1)

3.2.2 ขวดแก้วความจุ 750 มิลลิลิตร

3.2.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิร้อน (water bath) และ เย็น (chiller)

3.2.4 ชุดอุปกรณ์ให้อากาศ (ปั๊มลม)

3.2.5 บีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.2.6 เทอร์โมมิเตอร์

3.2.7 เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome)

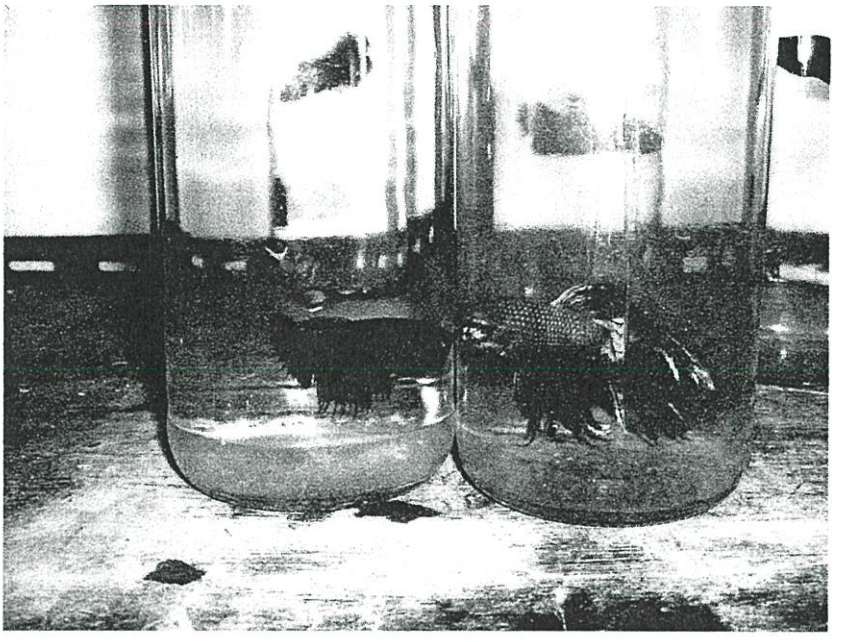
3.3 วิธีดำเนินการ

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดวัยอ่อน

3.3.1.1 นำพ่อแม่พันธุ์ปลากัดมาทำการเทียบคู่ (ภาพที่ 3.1) โดยแยกเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 750 มิลลิลิตร 1 ขวดต่อ 1 ตัว นำขวดมาวางคู่กัน เป็นเวลา 7-15 วันเพื่อให้เกิดความคุ้นเคยและช่วยกระตุ้นให้เพศเมียพัฒนาไข่พร้อมผสมพันธุ์ เมื่อพ่อแม่พันธุ์มีความพร้อมในการผสมพันธุ์ ให้นำลงมาเลี้ยงร่วมกันในภาชนะพลาสติก 1 ใบต่อ 1 คู่ (ภาพที่ 3.2)

3.3.1.2 หลังจากพ่อแม่พันธุ์ปลากัดผสมพันธุ์และวางไข่จนเสร็จสิ้น สังเกตได้จากเพศผู้จะไล่เพศเมียให้ห่างออกจากฟองอากาศที่เพศผู้สร้างขึ้นหรือที่เรียกว่า หวอด และที่หวอดจะพบไข่สีเหลืองอ่อน ให้นำแม่พันธุ์ปลากัดออกจากภาชนะพลาสติกเหลือเพียงพ่อพันธุ์ปลากัดไว้ให้ดูแลไข่เป็นเวลา 4 วัน

3.3.1.3 เมื่อลูกปลากัดมีอายุได้ 4 วันนับจากวันที่ออกจากไข่ ให้นำพ่อพันธุ์ปลากัดออกจากภาชนะพลาสติก ลูกปลากัดในช่วงอายุ 1-2 สัปดาห์แรกให้ไรแดงเป็นอาหาร ลูกปลากัดอายุ 3-8 สัปดาห์ให้ไส้เดือนน้ำเป็นอาหาร เมื่อลูกปลากัดอายุ 2 เดือนขึ้นไป เปลี่ยนอาหารมาเป็นอาหารเม็ดขนาดเล็ก



ภาพที่ 3.1 วิธีการเทียบคู่

ภาพที่ 3.2 ภาชนะพลาสติกสำหรับทำการผสมพันธุ์และเลี้ยงลูกปลากัด

3.3.1.4 ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลากัด โดยเริ่มเก็บในช่วงอายุ 1, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 วัน ตามลำดับนับจากวันที่ฟักเป็นตัว ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 ตัว แช่ในน้ำยา buffer formalin 10 % ซึ่งเป็นน้ำยาเก็บรักษาตัวอย่างก่อนจะนำไปใช้ศึกษาเนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ข.1)

3.3.1.5 นำตัวอย่างลูกปลากัดที่ทำการแช่ในน้ำยา buffer formalin 10 % นาน 24 ชั่วโมง มาแช่น้ำโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆ นาน 2-4 ชั่วโมง และนำไปใส่ในตลับใส่เนื้อเยื่อ ถ้าตัวอย่างมีขนาดใหญ่เกิน ให้ทำการตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อจนได้ขนาดที่พอเหมาะกับขนาดของตลับใส่เนื้อเยื่อ ลูกปลากัดในช่วงอายุ 30 วันที่มีขนาดใหญ่ ให้ทำการแช่น้ำยาย่อยกระดูก (Decalcification solution) ก่อนที่จะนำลงตลับใส่เนื้อเยื่อ (ภาคผนวก ข.1) หลังจากนั้นนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) (ภาคผนวก ก.1)

3.3.1.6 นำแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อลูกปลากัดแทรกอยู่ ไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อที่ความหนา 4-5 ไมครอน และวางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ดังกล่าวไปย้อมสีตามขั้นตอนของเทคนิคการย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Humason (1979) (ภาคผนวก ก.1)

3.3.1.7 ศึกษาการพัฒนาของอวัยวะภายในของลูกปลากัดวัยอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากสไลด์ที่ทำการย้อมสีแล้ว

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัด

3.3.2.1 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design : RCBD) ปรับระดับอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ทดสอบลูกปลาที่ 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 และ 41 องศาเซลเซียส โดยที่ระดับ 29 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มควบคุม (control) แบ่งการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ทดสอบที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 135 นาที
ชุดการทดลองที่ 2 ทดสอบที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
ชุดการทดลองที่ 3 ทดสอบที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
ชุดการทดลองที่ 4 ทดสอบที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มควบคุม
ชุดการทดลองที่ 5 ทดสอบที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที
ชุดการทดลองที่ 6 ทดสอบที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที
ชุดการทดลองที่ 7 ทดสอบที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 135 นาที
ชุดการทดลองที่ 8 ทดสอบที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 180 นาที

โดยทำการทดลองเป็นระยะเวลา 3 เดือน

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.3.2.2 วิธีการทดลอง

(1) ทำการเพาะพันธุ์ลูกปลาตามขั้นตอนที่ 3.3.1.1-3.3.1.3

(2) นำลูกปลาที่มีอายุ 4-5 วัน ใส่ลงในบีกเกอร์ ขนาด 500 มล. จำนวน 8 ใบ ใบละ 50 ตัว

(3) นำบีกเกอร์ 7 ใบ ที่มีลูกปลาใส่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิทั้งชุดอุณหภูมิเย็น (Chiller) และ ร้อน (water bath) และบีกเกอร์อีก 1 ใบ ตั้งทิ้งไว้ที่ระดับอุณหภูมิห้อง 29 องศาเซลเซียส และให้เป็นกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิของอากาศในช่วงเวลาที่ทำการทดลอง) ติดตั้งเครื่องให้อากาศ (ปั๊มลม) และตัวกระจายอากาศ (หัวทราย) ใส่ลงในบีกเกอร์ เปิดลมในระดับความแรงระดับต่ำ เพื่อให้น้ำเกิดการหมุนให้อุณหภูมิมีการกระจายตัวทั่วถึงและเป็นการให้ออกซิเจนกับลูกปลา

(4) ปรับระดับอุณหภูมิของอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 29 องศาเซลเซียส ให้เพิ่ม/ลด 1 องศาเซลเซียส ทุกๆ 15 นาที (ระยะเวลาในการทดลองแสดงไว้ในหัวข้อ 3.3.2.1)

(5) บีกเกอร์ที่ได้ระดับอุณหภูมิตามที่ต้องการคือ 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38 และ 41 องศาเซลเซียส ให้นำออกจากอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิน้ำในบีกเกอร์มีระดับเท่ากับอุณหภูมิห้องก่อนจะนำลูกปลากัดไปลงเลี้ยงต่อในภาชนะพลาสติก

(6) ทำการทดลองตั้งแต่ขั้นตอนการทดลองที่ (1) จนถึงขั้นตอนที่ (5) จนครบ 3 ครั้ง

(7) เมื่อลูกปลาอายุ 1 เดือนทำการเก็บตัวอย่างลูกปลาในแต่ละชุดอุณหภูมิตามขั้นตอน 3.3.1.5 จนถึงขั้นตอน 3.3.1.7 เพื่อนำมาศึกษาความแตกต่างของการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์

(8) การให้อาหารลูกปลากัดอายุ 1-2 สัปดาห์ จะให้ไรแดงเป็นอาหาร และลูกปลากัดอายุ 3-8 สัปดาห์จะให้ไส้เดือนน้ำเป็นอาหาร เมื่อลูกปลากัดอายุครบ 2 เดือนขึ้นไป จะเปลี่ยนมาเป็นอาหารเม็ดขนาดเล็ก

(9) ดูดตะกอนในภาชนะเลี้ยงทุกๆ 2 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำ 50 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 1 สัปดาห์

3.3.2.3 การเก็บข้อมูล

(1) ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวลูกปลากัดครั้งแรกเมื่อมีอายุ 1 วัน และเมื่อครบทุก 1 เดือน จนครบ 3 เดือน

(2) เมื่อลูกปลากัดมีอายุครบ 3 เดือนทำการตรวจสอบเพศปลา โดยดูจากลักษณะภายนอกของลูกปลาแต่ละตัวในแต่ละชุดการทดลอง พร้อมทั้งตรวจสอบอัตรารอดของลูกปลาจนครบทั้ง 3 ซ้ำ

77953

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลการเจริญเติบโต อัตรารอด ลักษณะเพศของปลากัด มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (one way analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย Least Significant Difference (LSD)

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปลาสวยงาม ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ตึกเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เดือนพฤษภาคม 2549 – เดือนกรกฎาคม 2550

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดวัยอ่อน

จากการศึกษาสภาพทางเนื้อเยื่อวิทยาในแต่ละอายุของลูกปลากัดทำให้ทราบถึงการพัฒนาของอวัยวะต่างๆรวมทั้งอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลากัด โดยลำดับขั้นการพัฒนาอวัยวะต่างๆในลูกปลากัดมีดังนี้

ลูกปลากัดอายุ 1-10 วัน ระบบประสาทเริ่มมีการพัฒนา ตามีการแบ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ พบเม็ดสี (pigment) ในตากระจายโดยรอบ หัวใจพบเป็นถุงบางๆ อยู่ใต้ช่องเหงือกด้านล่างของส่วนหัว ส่วนของกระดูกสันหลังยังคงพบโนโตคอร์ด (notochord) ในช่วงอายุ 5 วันมีการพัฒนาอวัยวะภายในและระบบย่อยอาหารขึ้นมาทดแทนถุงสะสมอาหาร ระบบหายใจมีการพัฒนามากขึ้น พบเหงือกทุกคู่เจริญมากขึ้นเห็นเป็นซี่เหงือกยื่นออกไปชัดเจน เมื่อลูกปลากัดมีอายุ 10 วัน พบตับมีการพัฒนามากขึ้น กระเพาะอาหารและลำไส้แบ่งเป็นชั้น และมีลักษณะยกตัวสูงขึ้นขยายเข้าสู่ภายในหลอดอาหาร (lumen) พบเซลล์ของกระเพาะอาหาร (gastric gland) กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นเนื้อเยื่อของผนังกระเพาะอาหาร หัวใจแบ่งเป็นห้องต่างๆ เห็นได้อย่างชัดเจน (ภาคผนวก ง.)

ลูกปลากัดอายุ 10 วัน พบเซลล์ลักษณะคล้ายเซลล์ของอวัยวะสืบพันธุ์ในตำแหน่งช่องท้องด้านท้าย (ภาพที่ 4.1) แต่จากข้อมูลของ Yuniarti *et al.* (2005) พบอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เมื่อลูกปลากัดมีอายุ 3 วัน โดยพบว่ามีลักษณะเป็น ฟอลิเคล เซลล์ (follicle cells) มีนิวเคลียสอยู่ภายใน และเมื่อลูกปลากัดอายุ 12 วันจะพบรังไข่ ส่วนอัณฑะจะพบเมื่อลูกปลามีอายุ 13 วัน ไม่สอดคล้องกับรายงานของ อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล (2544) ซึ่งพบอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลากัดอายุ 15 วัน

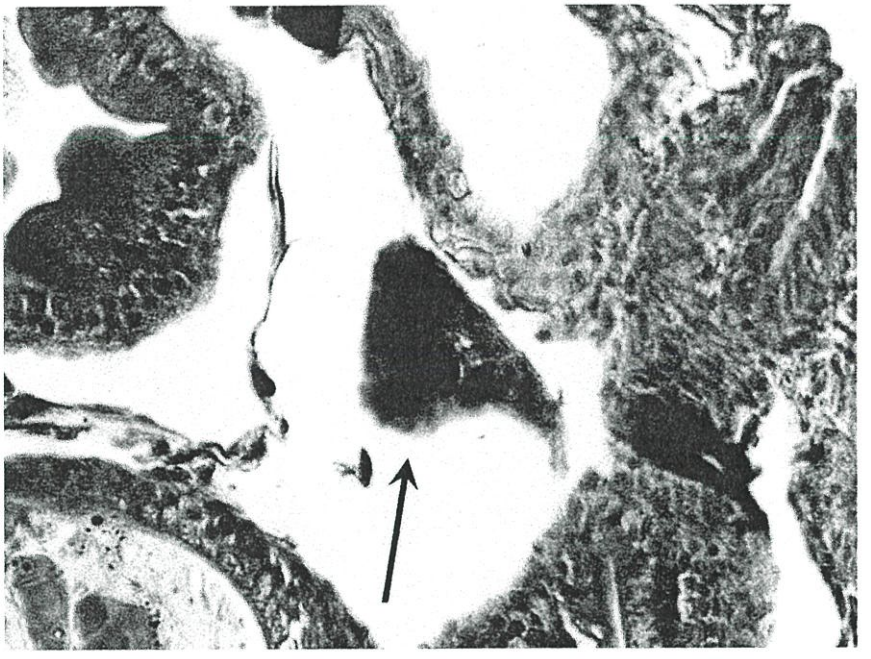
ลูกปลากัดอายุ 15 วัน เซลล์ตาแบ่งออกเป็นชั้นต่างๆ อย่างสมบูรณ์ กระดูกไฮยาลีน คาทิเลจ (Hyaline cartilage) มีการพัฒนาไปเป็น sponge bone (ภาพที่ 4.2 และ 4.3) อวัยวะสืบพันธุ์ขยายขนาดมากขึ้น ซึ่งเมื่อดูจากลักษณะของเซลล์สามารถบอกเพศได้ แต่การพัฒนายังอยู่ในระยะเริ่มต้น ที่พบคือระยะ primary oocyte ในเพศเมีย (ภาพที่ 4.4) และระยะ primary spermatogonia ในเพศผู้ซึ่งยังไม่เด่นชัด

ลูกปลากัดอายุ 20 วัน ในส่วนของหลอดอาหารและระบบทางเดินอาหาร เนื้อเยื่อชั้น mucosa ยื่นยาวเข้าไปในช่องว่างภายใน (lumen) และสามารถแบ่งออกเป็นเนื้อเยื่อชั้นต่างๆได้อย่างชัดเจน อวัยวะสืบพันธุ์อยู่ในช่องท้องด้านท้าย (ภาพที่ 4.5) สามารถแยกเพศปลากัดได้ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้พบเป็นท่อขนาดเล็ก (tubule) ภายในท่อมีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่พัฒนาอยู่ในระยะต่างๆ ส่วนใหญ่พบอยู่ในช่วงระยะ primary spermatogonia, secondary spermatogonia, และ primary spermatocyte

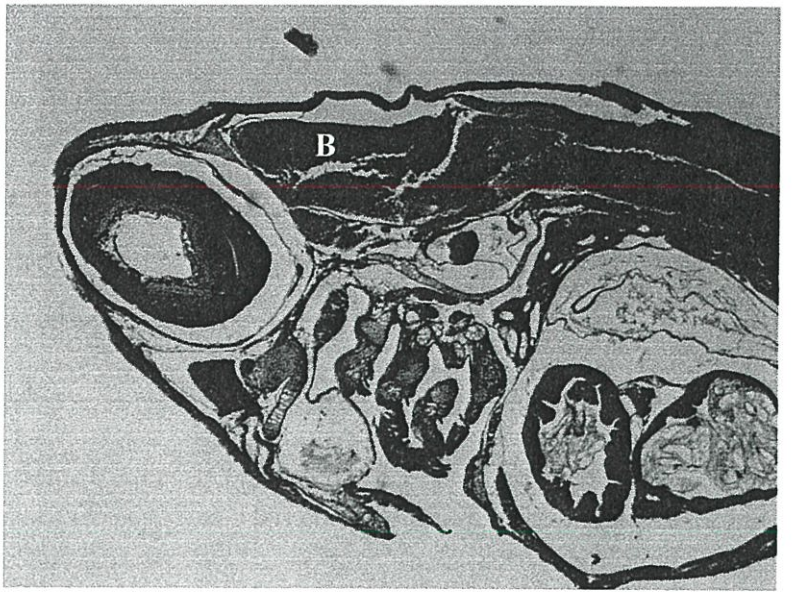
เป็นหลัก (ภาพที่ 4.6) ส่วนปลากัดเพศเมียพบการพัฒนาของรังไข่อยู่ในระยะ primary oocyte ลักษณะของไข่มีขนาดเล็กอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 4.7) มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบ ไซโตพลาสซึมติดสีชมพู มีนิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ ไข่ในระยะ perinucleolus พบไซโตรพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสติดสีเทาหรือสีชมพู เริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายอยู่ในนิวเคลียส ส่วนไข่ในระยะ primary yolk globule เป็นระยะที่เริ่มมีการสะสม yolk granules ซึ่งรูปร่างไข่มักจะเป็นเหลี่ยมพบ euvitelline nucleoli ที่ขอบของนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมมีสีจางลง ภายในนิวเคลียส ติดสีชมพู และอาจจะพบไข่ระยะ secondary yolk globule โดยที่ไข่ในระยะนี้พบ follicular cell ที่ขอบด้านนอก มีการสะสม yolk granules และ yolk vacuoles มากขึ้น ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินบนเทา นิวเคลียสติดสีชมพูชัดเจน (ภาพที่ 4.8)

ลูกปลากัดอายุ 25 วัน ลักษณะโครงสร้างอวัยวะภายใน เช่น กระเพาะอาหาร ตับ ลำไส้ มีการพัฒนาจนเกือบสมบูรณ์ ในส่วนอวัยวะสืบพันธุ์พบว่าไม่มีความแตกต่างจากลูกปลากัดอายุ 20 วัน (ภาพที่ 4.9 และ 4.10)

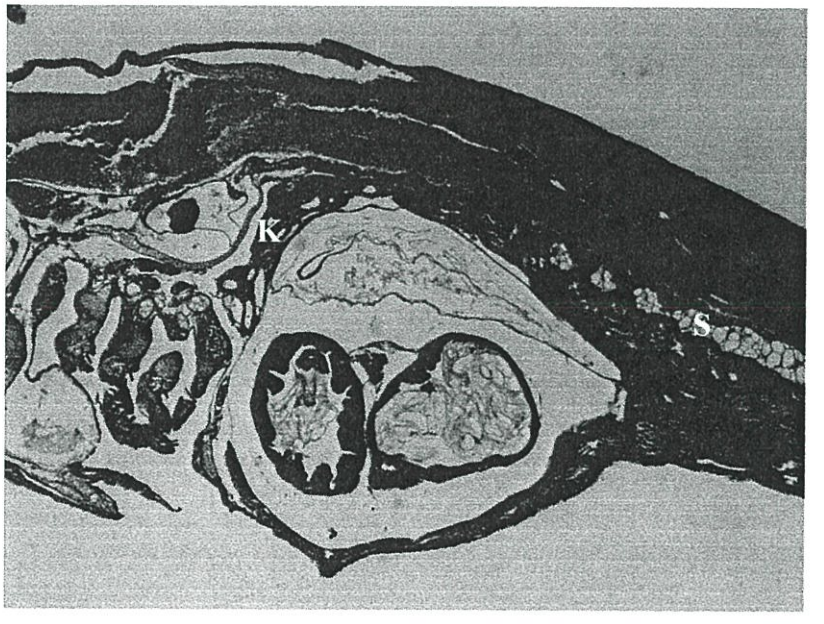
ลูกปลากัดอายุ 30 วัน อวัยวะทุกส่วนมีการพัฒนาอย่างสมบูรณ์ ลูกปลากัดมีรูปร่างเหมือนปลากัดขนาดใหญ่ ในส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์และรังไข่ปลากัดเพศเมีย พบว่ามีระยะการพัฒนาของไข่มากขึ้น สามารถเห็นระยะได้ถึงระยะ oil drop และ tertiary yolk globule แต่มีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกันพื้นที่ของรังไข่ทั้งหมด ในส่วนของปลากัดเพศผู้พบว่าอัณฑะมีการพัฒนาทุกระยะตั้งแต่ primary spermatogonia จนถึงระยะ spermatids (ภาพที่ 4.11 และ 4.12) แสดงให้เห็นว่า ลูกปลากัดเพศเมียยังไม่มีความพร้อมในการผสมพันธุ์เนื่องจากระยะการพัฒนาของไข่ยังไม่ได้อยู่ในระยะที่พร้อมทำการผสม แตกต่างจากลูกปลากัดเพศผู้ที่อยู่ในระยะพร้อมผสมพันธุ์



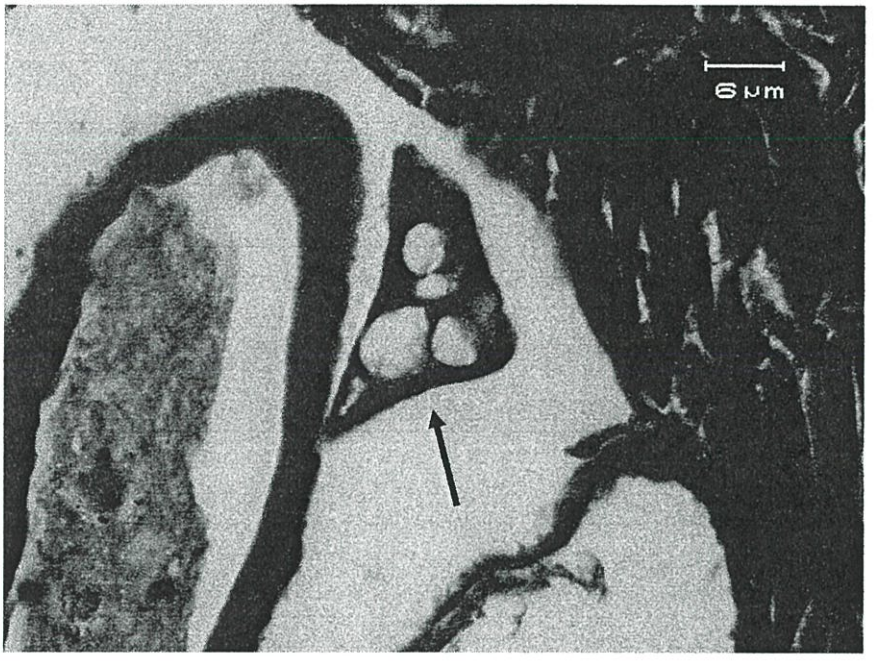
ภาพที่ 4.1 ลูกปลาอายุ 10 วัน ตำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์และลักษณะของเซลล์ (ปลายลูกศรชี้)
(Humason : H&E; X 40)



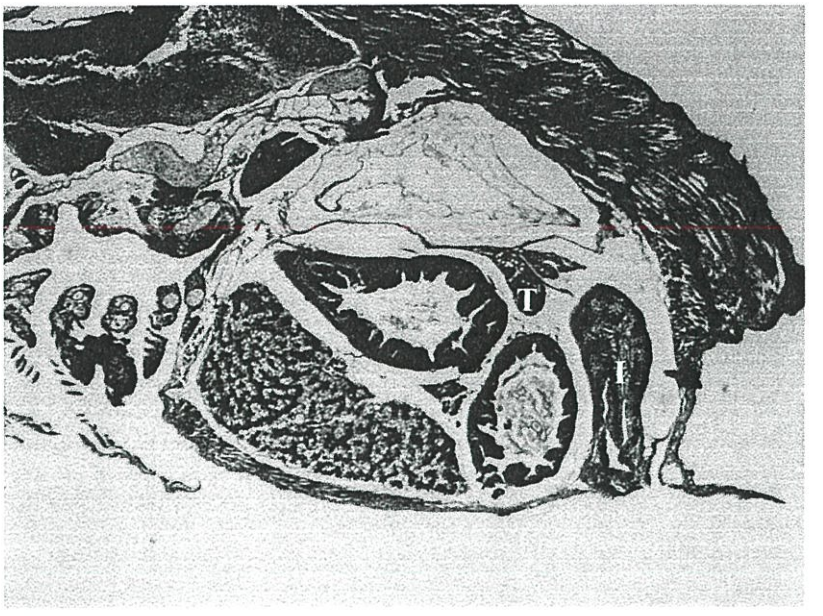
ภาพที่ 4.2 ลูกปลาอายุ 15 วัน เซลประสาทเชื่อมต่อกับไขสันหลัง (B) (Humason : H&E; X 4)



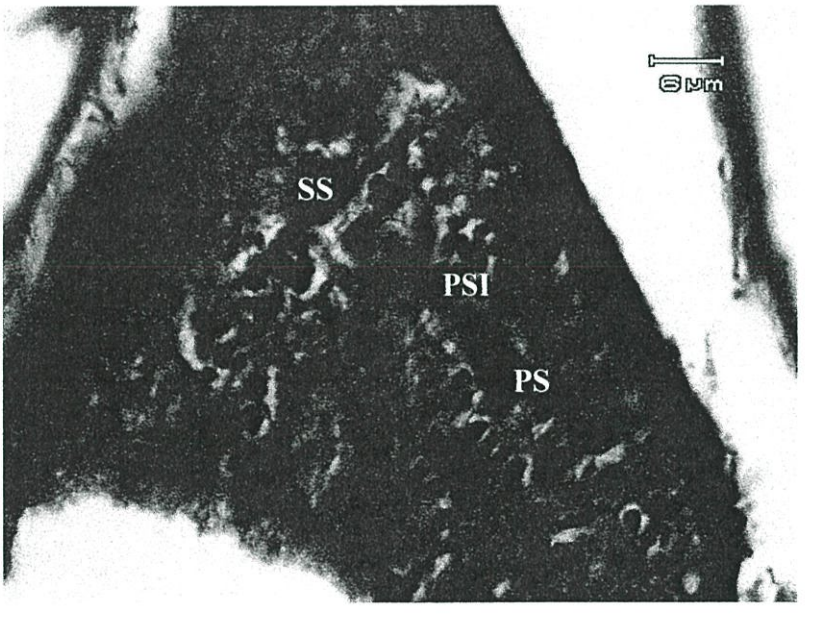
ภาพที่ 4.3 ลูกปลาอายุ 15 วัน ไตส่วนหน้าและท่อไต (K) กระดูก (sponge bone) (S) (Humason : H&E; X 4)



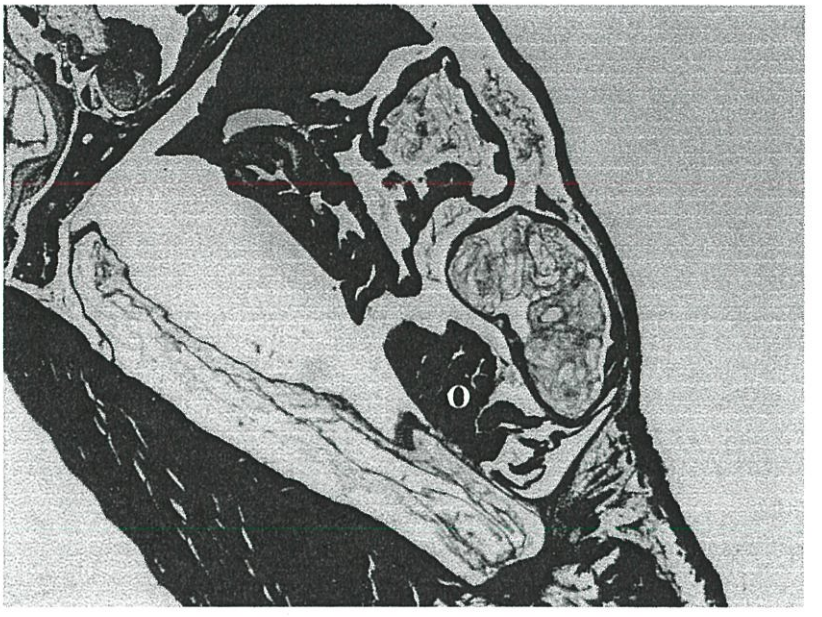
ภาพที่ 4.4 ลูกปลากัดอายุ 15 วัน พบอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะเริ่มแรก (ปลายลูกศรชี้) (Humason : H&E; X 10)



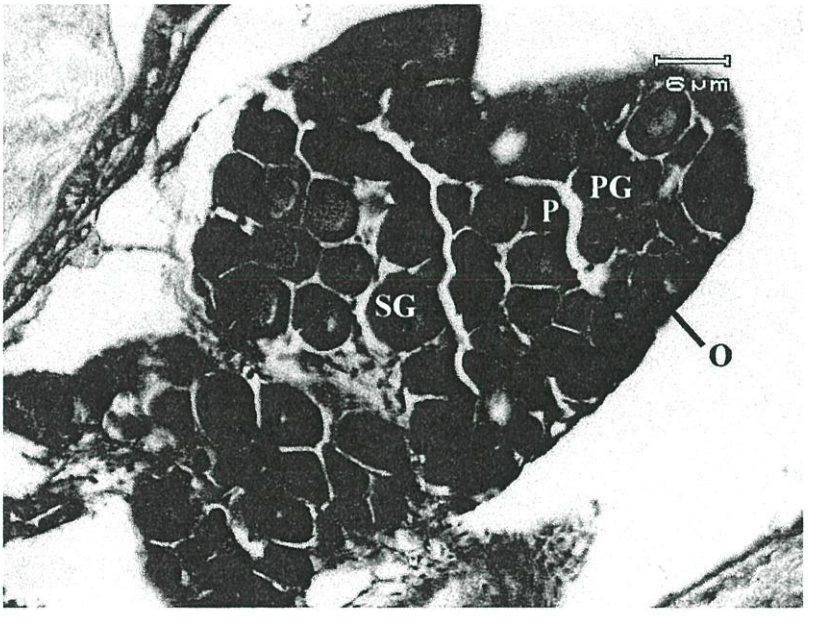
ภาพที่ 4.5 ลูกปลากัดอายุ 20 วัน พบเนื้อเยื่อชั้น mucosa (I) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (T) (Humason : H&E; X 4)



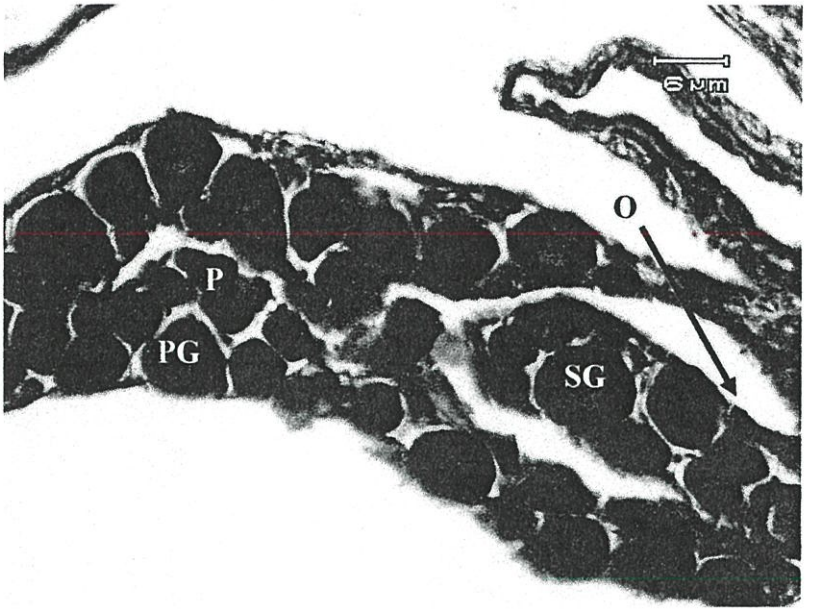
ภาพที่ 4.6 ลูกปลากัดอายุ 20 วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI) (Humason : H&E; X 40)



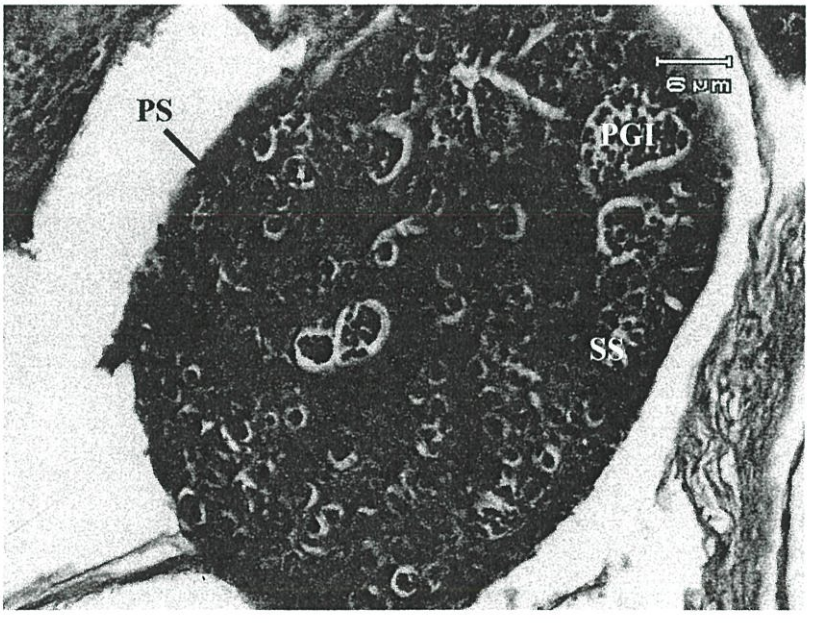
ภาพที่ 4.7 ลูกปลากัดอายุ 20 วัน อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (O) (Humason : H&E; X 4)



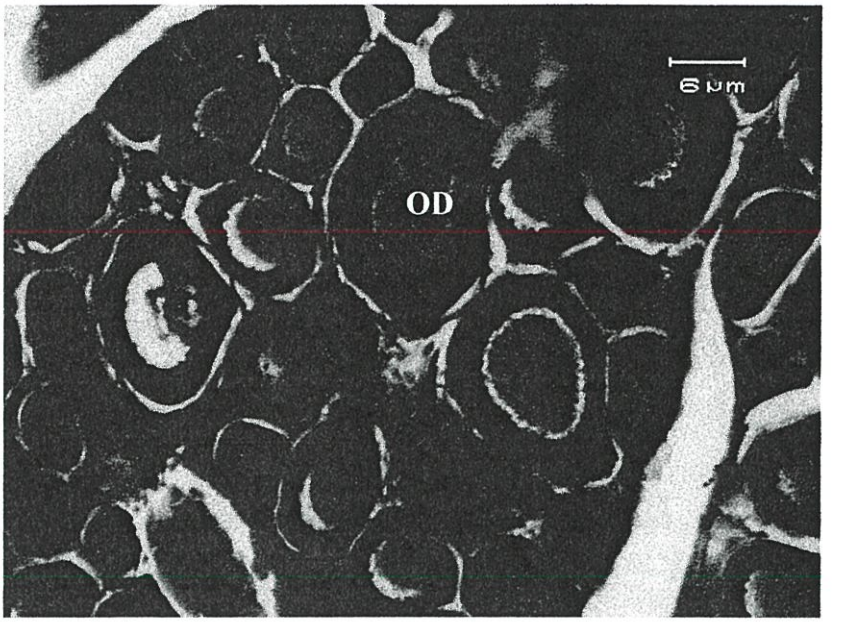
ภาพที่ 4.8 ลูกปลากัดอายุ 20 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ primary oocyte (O), perinucleolus (P), primary yolk globule (PG) และ secondary yolk globule (SG) (Humason : H&E; X 20)



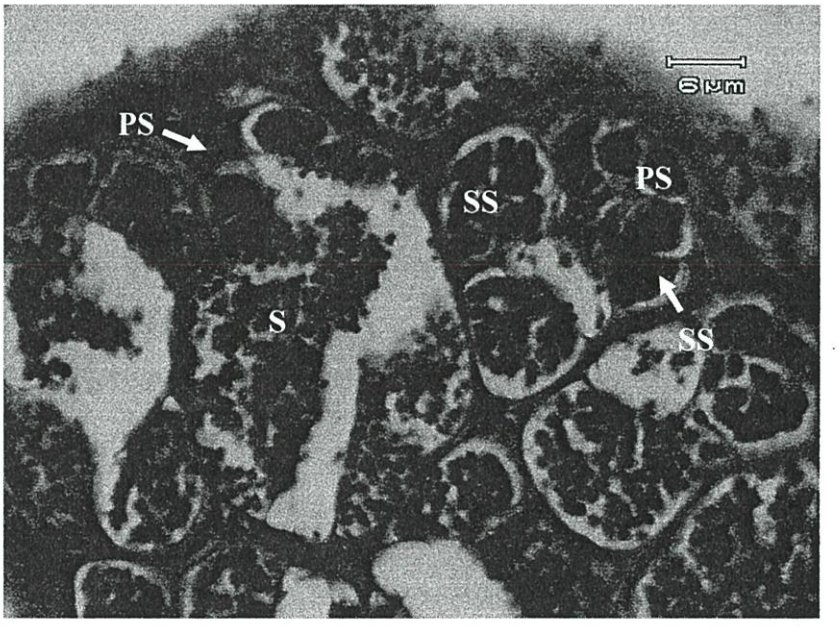
ภาพที่ 4.9 ลูกปลากัดอายุ 25 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ primary oocyte (O), perinucleolus (P), primary yolk globule (PG) และ secondary yolk globule (SG) (Humason : H&E; X 20)



ภาพที่ 4.10 ลูกปลากัดอายุ 25 วัน วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI) (Humason : H&E; X 20)



ภาพที่ 4.11 ลูกปลากัดอายุ 30 วัน พบการพัฒนาของรังไข่ในระยะ oil drop stage (OD) (Humason : H&E; X 20)



ภาพที่ 4.12 ลูกปลากัดอายุ 30 วัน พบการพัฒนาของอัณฑะในระยะ primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI), secondary spermatocyte (SSI) และ spermatids (S) (Humason : H&E; X 40)

4.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการกำหนดเพศในปลากัด

4.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลากัด

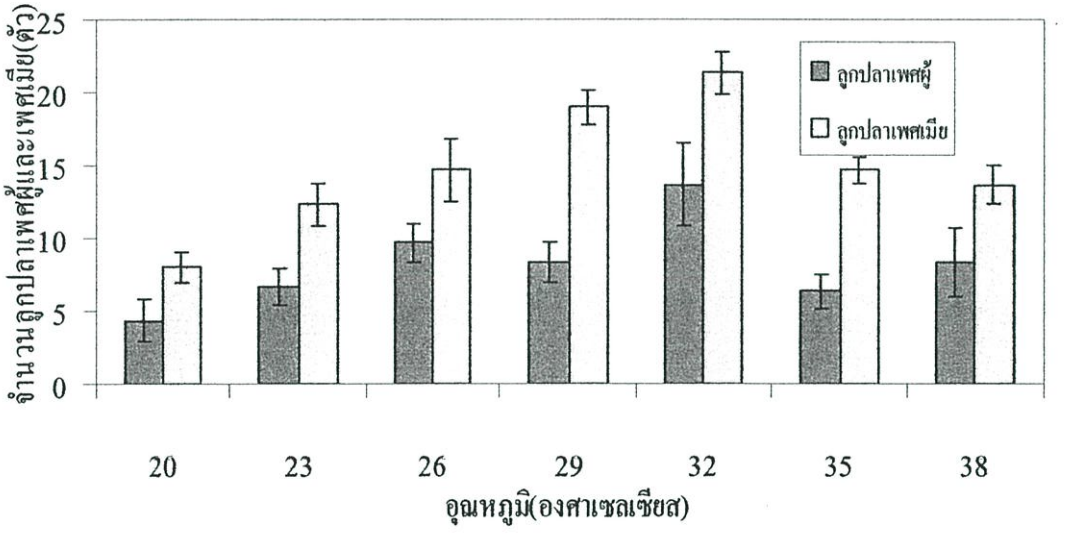
จากการนำลูกปลากัดอายุ 4 วันจำนวน 50 ตัว มาแช่ในน้ำที่มีการปรับระดับอุณหภูมิ 7 ระดับ คือ 20, 23, 26, 29, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในน้ำที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน พบว่าที่ระดับอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณลูกปลากัดเพศผู้เฉลี่ยสูงที่สุด (13.67±2.84) รองลงมาที่ระดับอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส (9.67±1.33) 38 องศาเซลเซียส (8.33±2.40) 29 องศาเซลเซียส (8.33±1.45) 23 องศาเซลเซียส (6.67±1.20) 35 องศาเซลเซียส (6.33±1.20) และ 20 องศาเซลเซียส (4.33±1.45) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.13) ลูกปลากัดเพศเมียที่ระดับอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณลูกปลาสูงที่สุด (21.33±1.45) รองลงมาที่ระดับอุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส (19.0±1.15) 35 องศาเซลเซียส (14.67±0.88) 26 องศาเซลเซียส (14.67±2.18) 38 องศาเซลเซียส (13.67+1.33) 23 องศาเซลเซียส (12.33±1.45) และ 20 องศาเซลเซียส (8.0±1.0) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.13) สอดคล้องกับ Kazeto *et al.* (2006) ศึกษาการเปลี่ยนเพศในปลาทอง (*Carassius auratus*) (กลุ่มประชากรเพศเมีย : XX female – XX male) ใช้ลูกปลาอายุ 12วันหลังจากปฏิสนธิ ที่อุณหภูมิ 23±0.5 องศาเซลเซียสโดยเพิ่มระดับอุณหภูมิ 0.5 องศาเซลเซียสทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนระดับอุณหภูมิ 15, 17, 20, 23, 25, 28 และ 30 องศาเซลเซียสตามลำดับ ส่งผลให้ปลาทองเปลี่ยนเป็นเพศเมีย 94.6, 100, 94.6, 90.5, 46.5, 15.5 และ 7.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนเพศในลูกปลานิล (*O. niloticus*) ที่อุณหภูมิ 2 ระดับคือ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิพื้นฐานและอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ปลานิลเป็นเพศผู้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป ซึ่งการเปลี่ยนเพศด้วยปัจจัยสิ่งแวดล้อมจะขึ้นอยู่กับระดับของปัจจัยที่เป็นตัวกระตุ้นและชนิดของสัตว์น้ำนั้นๆ (Baroiller *et al.* 2001)

อัตรารอดของลูกปลากัดในตารางที่ 4.1 จะเห็นว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง ซึ่งปลากัดเป็นปลาที่อยู่ในเขตร้อน อุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำตลอดทั้งปีอยู่ในช่วงระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การอยู่อาศัย และการแพร่พันธุ์ เมื่อมีการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอกด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ โดยมีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากระดับอุณหภูมิปกติ ทำให้อัตราส่วนระหว่างลูกปลาเพศผู้และเพศเมียเปลี่ยนแปลงไป ที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส มีอัตรารอดของลูกปลาอยู่ที่ 61.33 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32 องศาเซลเซียส ทำให้อัตรารอดของลูกปลาเพิ่มขึ้นเป็น 72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลูกปลามีอัตรารอดมากขึ้นส่งผลให้มีอัตราส่วนระหว่างลูกปลาเพศผู้และเพศเมียเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

ตารางที่ 4.1 จำนวนลูกปลากัดเพศผู้-เพศเมียและอัตรารอด ที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน

อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)	จำนวนเพศผู้(ตัว)	จำนวนเพศเมีย(ตัว)	อัตรารอด(%)
20	4.33 ± 1.45^{a}	8.0 ± 1.0^{a}	26.00 ± 5.03^{a}
23	6.67 ± 1.20^{ab}	12.33 ± 1.45^{ab}	39.33 ± 1.76^{ab}
26	9.67 ± 1.33^{bc}	14.67 ± 2.18^{bc}	51.33 ± 5.93^{bc}
29	8.33 ± 1.45^{ab}	19.0 ± 1.15^{cd}	50.11 ± 0.67^{c}
32	13.67 ± 2.84^{c}	21.33 ± 1.45^{d}	72.00 ± 6.11^{d}
35	6.33 ± 1.20^{ab}	14.67 ± 0.88^{bc}	45.60 ± 2.00^{b}
38	8.33 ± 2.40^{ab}	$13.67+1.33^{b}$	46.26 ± 6.93^{b}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.13 ลูกปลาเพศผู้และเพศเมียเฉลี่ยที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน

การเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างลูกปลากัดเพศผู้และเพศเมียที่ระดับอุณหภูมิ 20, 23, 26, 29, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมียที่ได้คือ 1:1.85±1.03, 1:1.85±0.55, 1:1.52±0.24, 1:2.28±0.57, 1:1.56±0.34, 1:2.32±0.71 และ 1:1.64±0.02 ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.2) สอดคล้องกับราตรี สุขสุวรรณ์ (2545) ศึกษาการควบคุม

เพศปลาฉลามกบด้วยอุณหภูมิ ในระดับอุณหภูมิน้ำปกติ 27-28 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราส่วนลูกปลาฉลามกบ เพศผู้ต่อเพศเมียที่ได้ เท่ากับ 1: 1.4 เมื่อนำไข่ปลาฉลามกบไปทดลองฟักที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงและลักษณะเพศที่เกิดขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1.1 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ผลทำให้อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนลูกปลากัดเพศผู้ต่อเพศเมียที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน

อุณหภูมิ	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
20	1	1.85 ± 1.03^{b}
23	1	1.85 ± 0.55^{b}
26	1	1.52 ± 0.24^{a}
29	1	2.28 ± 0.57^{c}
32	1	1.56 ± 0.34^{a}
35	1	2.32 ± 0.71^{c}
38	1	1.64 ± 0.02^{ab}

*ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.2 อัตราการเจริญเติบโต

เปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตในลูกปลาที่ทำการแช่ในน้ำที่มีการปรับระดับอุณหภูมิ 7 ระดับ คือ 20, 23, 26, 29, 32, 35 และ 38 องศาเซลเซียส และนำไปทำการเลี้ยงในสภาพน้ำที่ระดับอุณหภูมิปกติ เป็นระยะเวลารวม 12 สัปดาห์ พบว่าลูกปลากัดในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยลูกปลากัดในทุกกลุ่มการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ย (ตารางที่ 4.3 ; ภาพที่ 4.14) และความยาวเฉลี่ย (ตารางที่ 4.4 ; ภาพที่ 4.15) ใกล้เคียงกัน ระยะอุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 29-31 องศาเซลเซียส และให้ปริมาณอาหารเพียงพอต่อความต้องการของลูกปลา จึงไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักลูกปลาในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนเพศในลูกปลากัดอายุ 3-15 วันหลังจากฟักเป็นตัว พบว่าที่ระดับอุณหภูมิ 27, 29 และ 31 องศาเซลเซียส ลูกปลากัดมีความยาวเฉลี่ยอยู่ที่ 2.06, 2.22 และ 2.28 มิลลิเมตรตามลำดับ ซึ่งความยาวของลูกปลากัดไม่มีความแตกต่างกัน (Yuniarti *et al.* 2005) และราตรี สุขสุวรรณ์ (2545) ศึกษาการควบคุมเพศปลาฉลามกบด้วยอุณหภูมิ 2 ระดับ ที่ระดับ 25 องศาเซลเซียส พบว่าลูกปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 12.49 ± 0.87 กรัม ความยาวลำตัวเฉลี่ย 15.09 ± 0.60 เซนติเมตร

และ 30 องศาเซลเซียส ลูกปลามีน้ำหนักเฉลี่ย 12.31±0.87 กรัม ความยาวลำตัวเฉลี่ย 15.08±0.52 เซนติเมตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลากัด (มิลลิกรัม) ตั้งแต่อายุ 1-90 วัน

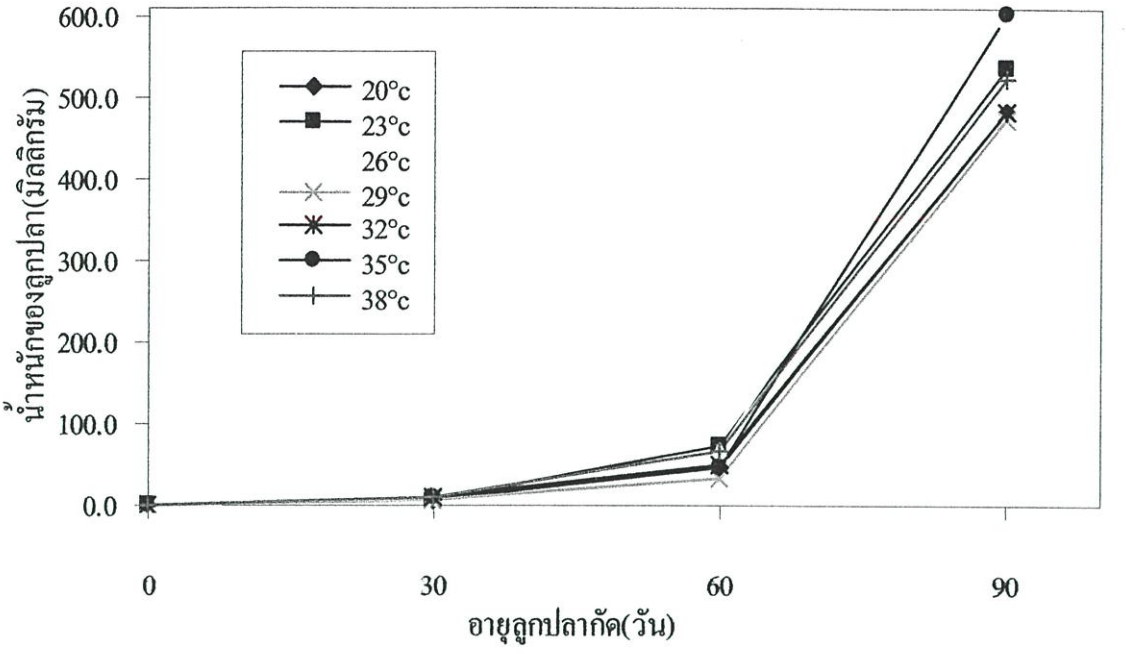
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อายุลูกปลา (วัน)			
	1	30	60	90
20	0.1[a]	6.4±1.5[a]	45.9±8.1[a]	481.8±7.2[a]
23	0.1[a]	7.5±0.3[a]	74.9±6.0[a]	536.3±5.2[a]
26	0.1[a]	9.8±0.5[a]	65.0±2.0[a]	599.8±4.0[a]
29	0.1[a]	7.2±1.6[a]	32.1±0.3[a]	471.7±4.3[a]
32	0.1[a]	10.5±1.7[a]	51.4±0.9[a]	484.4±7.6[a]
35	0.1[a]	9.5±1.9[a]	46.7±1.3[a]	602.0±2.5[a]
38	0.1[a]	9.4±0.4[a]	65.7±1.4[a]	522.3±7.3[a]

*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

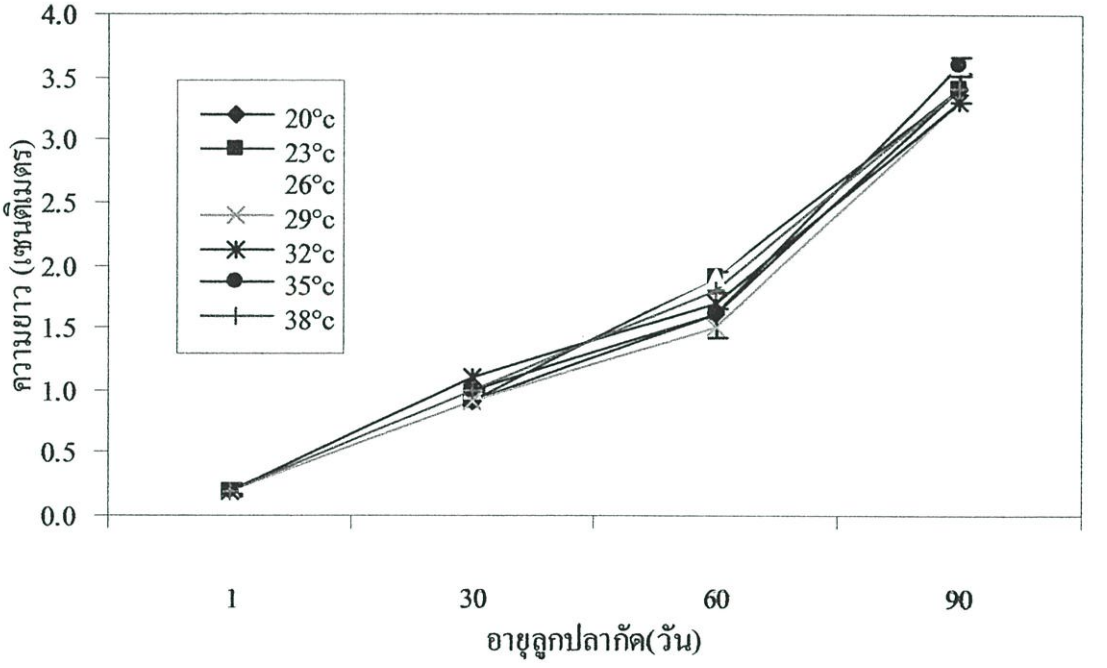
ตารางที่ 4.4 ความยาวเฉลี่ยของลูกปลากัด (เซนติเมตร) ตั้งแต่อายุ 1-90 วัน

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อายุลูกปลา (วัน)			
	1	30	60	90
20	0.2[a]	0.9±0.035[a]	1.6±0.064[a]	3.4±0.068[a]
23	0.2[a]	0.9±0.024[a]	1.9±0.066[a]	3.4±0.168[a]
26	0.2[a]	1.0±0.013[a]	1.9±0.044[a]	3.6±0.121[a]
29	0.2[a]	0.9±0.035[a]	1.5±0.024[a]	3.3±0.046[a]
32	0.2[a]	1.1±0.067[a]	1.7±0.018[a]	3.3±0.122[a]
35	0.2[a]	1.0±0.057[a]	1.6±0.185[a]	3.6±0.061[a]
38	0.2[a]	1.0±0.037[a]	1.8±0.154[a]	3.4±0.105[a]

*ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)



ภาพที่ 4.14 น้ำหนักของลูกปลากัด (มิลลิกรัม) ที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน

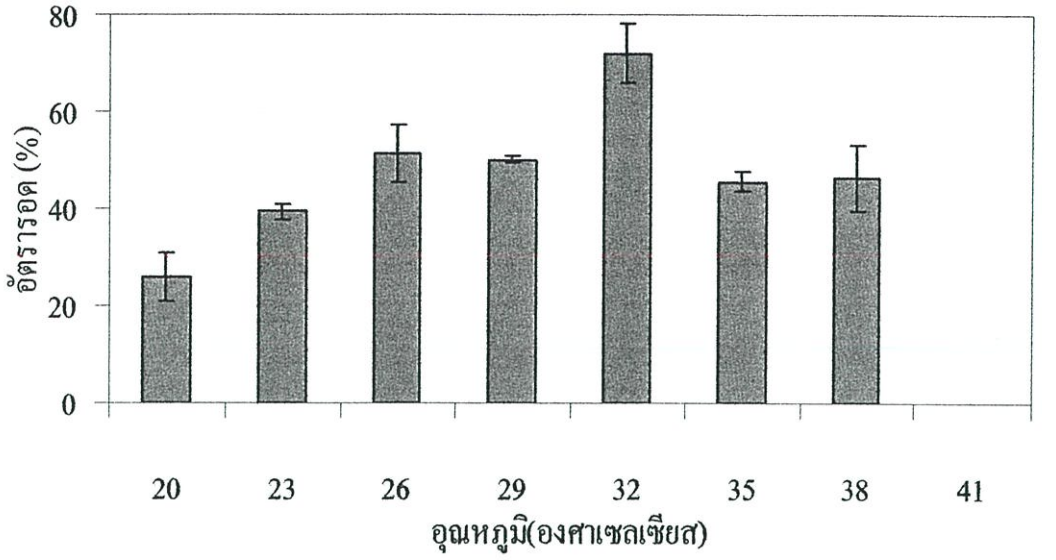


ภาพที่ 4.15 ความยาวของลูกปลากัด (เซนติเมตร) ที่ทำการทดสอบในอุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน

4.2.3 อัตรารอด

อัตรารอดของลูกปลาในแต่ละชุดการทดลองพบว่า ที่ระดับอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ลูกปลามีอัตรารอดสูงที่สุด (72.00±6.11) รองลงมา คือ 26 องศาเซลเซียส (51.33±5.93) 29 องศาเซลเซียส (50.11±0.67) 35 องศาเซลเซียส (45.60±2.00) 38 องศาเซลเซียส(46.26±6.93) 23 องศาเซลเซียส (39.33±1.76) และ 20 องศาเซลเซียส (26.00±5.03) เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.1) ซึ่งส่วนใหญ่อัตราการตายของลูกปลากัดจะขึ้นอยู่กับระดับของอุณหภูมิ เมื่อระดับของอุณหภูมิเพิ่มขึ้นหรือลดต่ำลงจนเกินขีดจำกัดความสามารถในการปรับตัวของลูกปลาจะส่งผลให้ลูกปลามีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 4.16) ฉะนั้นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่ออัตรารอดและการเจริญเติบโตของลูกปลากัด อยู่ที่ระดับ 29-32 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับYuniarti *et al.* (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนเพศในปลากัด โดยพบว่าระดับอุณหภูมิที่ทำการทดลอง 27, 29 และ 31 องศาเซลเซียส ลูกปลามีอัตรารอด 91.9, 97.1 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

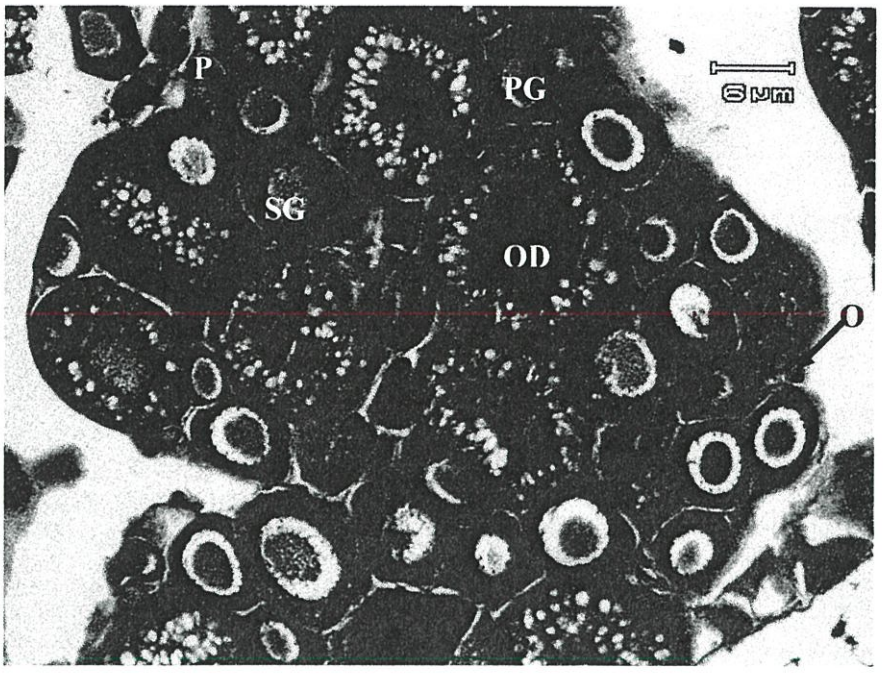
การเพิ่มหรือลดอุณหภูมิน้ำที่ต่างกันมากจะส่งผลต่ออัตรารอดของลูกปลากัด ความสามารถในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของลูกปลากัด จากอุณหภูมิที่ทำการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิต่ำสุดคือ 20 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิสูงสุดคือ 38 องศาเซลเซียส ที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่พบการตายระหว่างทำการทดลอง แต่หลังจากการทดลอง 2-3 วัน ลูกปลากัดที่เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ลูกปลากัดมีอัตราการตายสูงขึ้น สาเหตุน่าจะมาจากความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิน้ำในการทดลองกับน้ำที่ใช้เลี้ยง และการปรับตัวของลูกปลา ทำให้ลูกปลากัดอ่อนแอ และลูกปลาตายเพิ่มขึ้น ส่วนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิสูงสุดที่ลูกปลากัดสามารถทนได้ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นจนถึง 39 องศาเซลเซียส พบว่าลูกปลากัดตายเพิ่มมากขึ้น และที่ 41 องศาเซลเซียส ลูกปลากัดตายทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับ Baras *et al.* (2001) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนเพศของลูกปลานิลพบว่าที่อุณหภูมิ 38.5-39.0 องศาเซลเซียส ทำให้ลูกปลานิลระยะ Juvenile ตาย และ blue tilapia (*Oreochromis aureus*) ลูกปลามีอัตรารอดเพียง 44.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิต่ำ 21 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าอัตรารอดปกติคือ 73.4 เปอร์เซ็นต์ (Desprez and Melard. 1998)



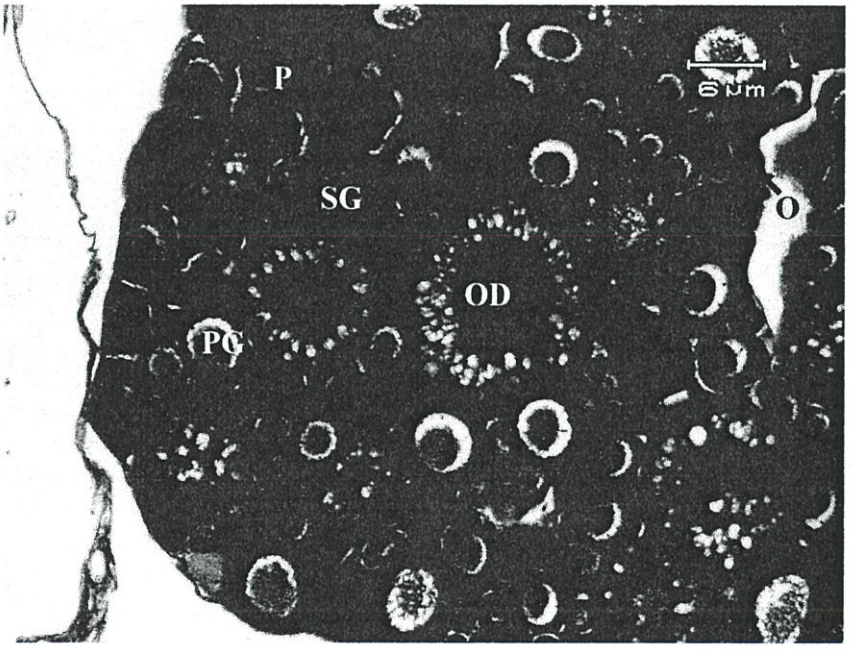
ภาพที่ 4.16 อัตรารอดของลูกปลาที่ทำการทดลองในระดับอุณหภูมิน้ำต่างกัน

4.2.4 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัด

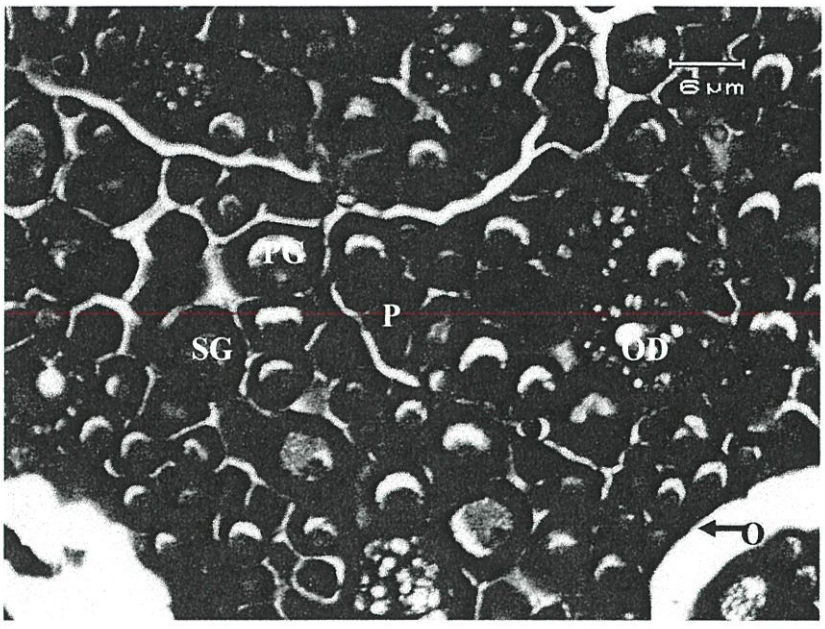
ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดอายุ 30 วันจากแต่ละชุดอุณหภูมิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ โดยลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเมียในแต่ละชุดการทดลองมีระยะการพัฒนาของเซลสืบพันธุ์อยู่ในระยะใกล้เคียงกันทั้งสิ้น ซึ่งลักษณะการพัฒนาของเซลสืบพันธุ์เพศเมียของลูกปลากัดที่ระดับอุณหภูมิ 20, 29 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่ามี ไข่ในระยะ primary oocyte จนถึง ไข่ในระยะ tertiary yolk globule (ภาพที่ 4.17 - 4.19) ส่วนการพัฒนาของเซลสืบพันธุ์เพศผู้ของลูกปลากัดที่ระดับอุณหภูมิ 20, 29 และ 38 องศาเซลเซียส นั้นพบว่ามีการพัฒนาตั้งแต่ในระยะ primary spermatogonia จนถึงในระยะ spermatids (ภาพที่ 4.20 – 4.22) ทำให้ทราบว่าลูกปลากัดเพศผู้มีระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์มากกว่าลูกปลากัดเพศเมีย แต่จากการทดลองของ Yuniarti *et al.* (2005) ที่ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนเพศในปลากัดที่อุณหภูมิ 3 ระดับ พบว่าอุณหภูมิส่งผลต่อการเร่งการพัฒนาของรังไข่ โดยที่ระดับอุณหภูมิ 27, 29 และ 31 องศาเซลเซียส พบการพัฒนาของรังไข่ภายใน 7-17 วัน, 5-14 วัน และ 4-12 วัน ตามลำดับ แสดงว่ายิ่งมีอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้มีผลต่อการพัฒนาของรังไข่เร็วมากขึ้นด้วย



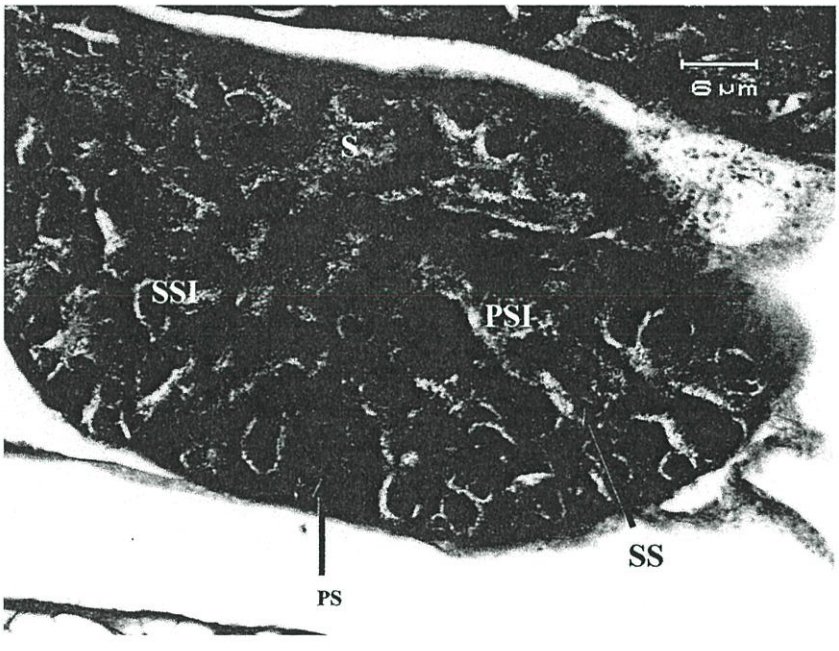
ภาพที่ 4.17 รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 29 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) primary oocyte (O), perinucleolus (P), primary yolk globule (PG), secondary yolk globule (SG) และ oil drop (OD) (Humason : H&E; X 10)



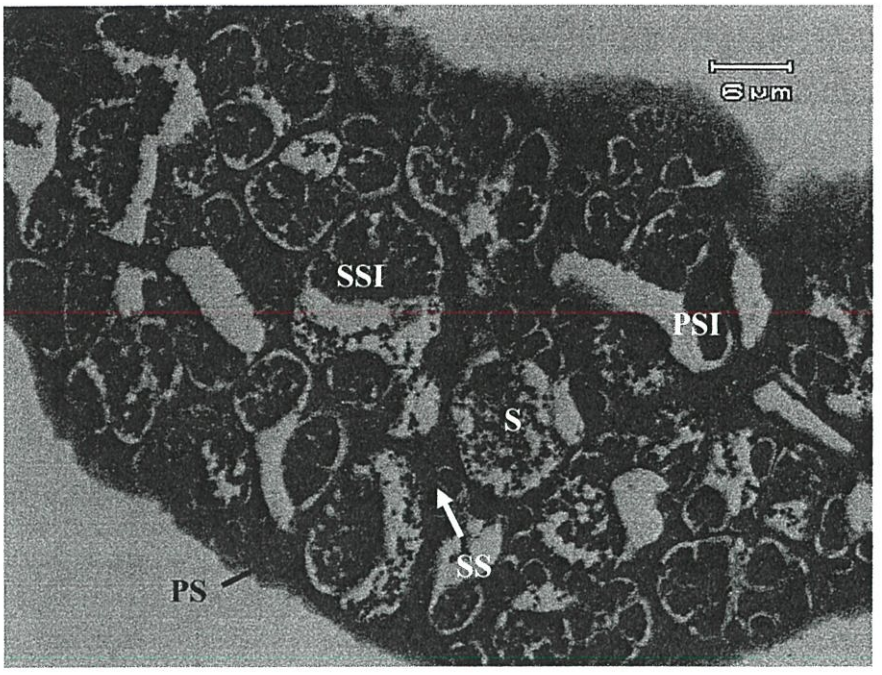
ภาพที่ 4.18 รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 20 องศาเซลเซียส primary oocyte (O), perinucleolus (P), primary yolk globule (PG), secondary yolk globule (SG) และ oil drop (OD) (Humason : H&E; X 10)



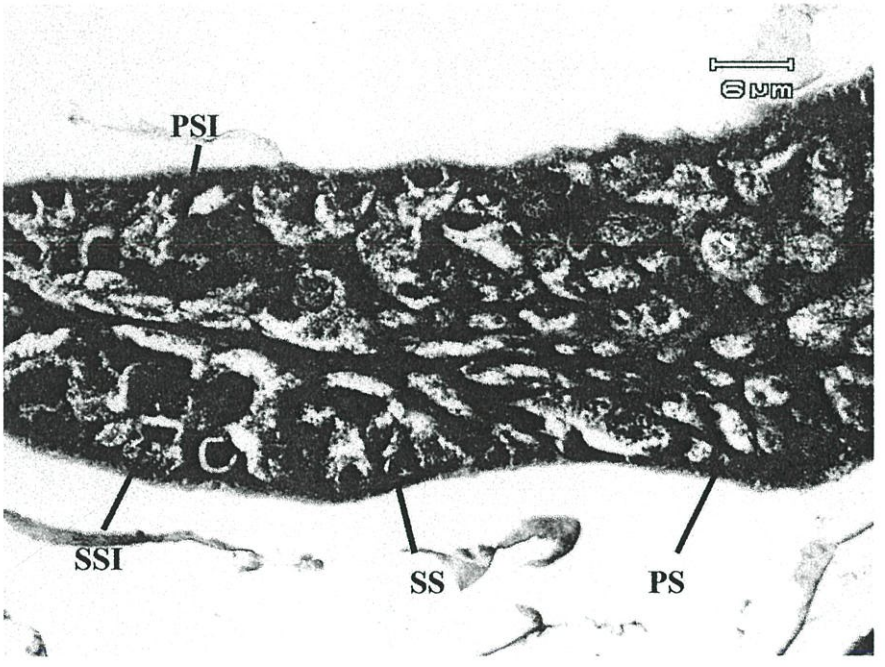
ภาพที่ 4.19 รังไข่ลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 38 องศาเซลเซียส primary oocyte (O), perinucleolus (P), primary yolk globule (PG), secondary yolk globule (SG) และ oil drop (OD) (Humason : H&E; X 10)



ภาพที่ 4.20 อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 29 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI), secondary spermatocyte (SSI) และ spermatid (S) (Humason : H&E; X 10)



ภาพที่ 4.21 อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 20 องศาเซลเซียส primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI), secondary spermatocyte (SSI) และ spermatid (S) (Humason : H&E; X 20)



ภาพที่ 4.22 อัณฑะลูกปลากัดอายุ 30 วัน ชุดการทดลอง 38 องศาเซลเซียส primary spermatogonia (PS), secondary spermatogonia (SS), primary spermatocyte (PSI), secondary spermatocyte (SSI) และ spermatid (S) (Humason : H&E; X 10)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดวัยอ่อน เริ่มที่ลูกปลากัดอายุ 1-5 วัน ยังไม่พบการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งในปลากัดเพศผู้และเพศเมีย พบเซลล์ลักษณะคล้ายเซลล์ของอวัยวะสืบพันธุ์ในตำแหน่งช่องท้องด้านท้ายในลูกปลากัดอายุ 10 วัน เมื่อลูกปลากัดมีอายุได้ 15 วัน อวัยวะสืบพันธุ์มีการพัฒนาเป็นกลุ่มเซลล์ สามารถบอกเพศได้จากลักษณะของเซลล์โดยพบการพัฒนาอยู่ในระยะเริ่มแรกคือระยะ primary oocyte ในเพศเมีย และระยะ primary spermatogonia ในเพศผู้ ลูกปลากัดอายุ 20 วัน ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นสามารถแยกเป็นรังไข่หรืออัณฑะได้อย่างชัดเจน และอวัยวะสืบพันธุ์มีการพัฒนาจนเกือบสมบูรณ์ในลูกปลากัดอายุ 30 วัน ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatid เป็นระยะที่ผลิตน้ำเชื้อ (sperm) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลูกปลาเพศผู้นั้นมีความพร้อมในการผสมพันธุ์ ส่วนลูกปลาเพศเมียระยะไข่อยู่ในระยะ tertiary yolk globule เป็นระยะที่มีการสะสมของ yolk เป็นระยะที่ยังไม่พร้อมในการผสมพันธุ์

จากการเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลากัด พบจำนวนลูกปลากัดเพศผู้และเพศเมียในแต่ละระดับอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีจำนวนลูกปลาเพศผู้ และเพศเมียสูงที่สุดคือ 13.67 ± 2.84 และ 21.33 ± 1.45 ตัวตามลำดับ ส่วนอัตรารอดของลูกปลากัด ในแต่ละอุณหภูมิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่อุณหภูมิ 32 องศาลูกปลากัดมีอัตราสูงที่สุดคือ 72.00 ± 6.11 เปอร์เซ็นต์ ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่ออัตรารอดของลูกปลากัดคือ 26-32 องศาเซลเซียส อัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียในแต่ละระดับอุณหภูมิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่อุณหภูมิ 26 และ 32 องศาเซลเซียส มีอัตราส่วนระหว่างลูกปลากัดเพศผู้และเพศเมียดีที่สุดคือ $1:1.52\pm0.24$ และ $1:1.56\pm0.34$ ตัวตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตของลูกปลากัดในแต่ละระดับอุณหภูมิ เมื่อทำการเลี้ยงจนครบ 90 วัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของโครงสร้างและระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดอายุ 30 วันจากแต่ละระดับอุณหภูมิ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยที่ลักษณะของเซลล์อวัยวะสืบพันธุ์ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในระยะเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลากัดวัยอ่อน การเพิ่มช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างลูกปลากัดในช่วงอายุต่างๆ ช่วยให้สามารถทราบระยะในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดที่แน่นอนมากขึ้น

2. การศึกษาขั้นต่อไปควรนำช่วงอุณหภูมิที่ดีที่สุดจากการทดลองนี้ไปทำการศึกษาต่อโดยเพิ่มความถี่ของอุณหภูมิให้มากขึ้น ซึ่งจะทำให้ทราบระดับของอุณหภูมิที่แน่นอนที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนเพศในปลากัดต่อไป

3. ควรมีศึกษาในระดับขั้นของฮอร์โมนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศ เพื่อให้ทราบชนิดของฮอร์โมนที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศในปลากัด

บรรณานุกรม

ชลอ ลิ้มสุวรรณ สุปราณี ชินบุตร นิตยา วชิรชัยไพศาล และทวี หอมชง. 2528. "การศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากะพงวัยอ่อน." หน้า 1-34 ใน **เอกสารวิชาการฉบับที่ 49**. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ ปวีณา กิจสวัสดิ์ และสุปราณี ชินบุตร. 2530. **เนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน**. กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัย เกียรติ์นีรนาท และ บุญชัย อัศวกิจวานิช. 2548. "การพัฒนาปลากัดไทยก้าวไกลสู่ตลาดโลก". **วารสารการประมง** 58(6) : 505-517.

นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ วันเพ็ญ มีนกาญจน์ และ พงโสภี อัตศาสตร์. 2536. "ผลของเอสโตรเจนต่อการเจริญของต่อมเพศปลากัด." หน้า 1-11 ใน **เอกสารวิชาการฉบับที่ 144**. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

นวลมณี พงศ์ธนา และ บัญชา ทองมี. 2538. "การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาสลิด." หน้าที่ 1-30 ใน **เอกสารวิชาการฉบับที่ 9**. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

นันทริกา ชันซื่อ วัชระ ศรจิตติ ชนินทร์ สุนทรารักษ์ จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และอัจฉริยา ไศละสูต. 2546. "ข้อมูลพื้นฐานกายภาควิทยา จุลกายวิทยา และค่าทางสรีระวิทยาของปลากัดไทย (*Betta splendens*)." **วารสารการประมง** 56(5) : 469-474.

นิรนาม. 2007. **การเพาะเลี้ยงปลากัด**. ที่มา : http://home.kku.ac.th/pracha/Betta.htm

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ กำชัย ลาวัณยวุฒิ สุจินต์ หนูขวัญ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2531. "การใช้ Fluoxymesterone ในการเปลี่ยนแปลงเพศปลากัดจีน." หน้า 1-21 ใน **เอกสารวิชาการฉบับที่ 81**. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

ราตรี สุขสุวรรณ์. 2545. "การควบคุมเพศฉลามกบโดยอุณหภูมิ." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรณู ยาชิโร เจนจิตต์ คงกำเนิด วิชัย วัฒนกุล และนิเวศน์ เรืองพานิช. 2536. "การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในปลากะรัง." หน้า 1-16 ใน **เอกสารวิชาการฉบับที่ 14**. กรุงเทพฯ : กรมประมง.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2528. **ปลาไทยในสถานแสดงพันธุ์ปลาน้ำจืด**. กรุงเทพฯ : กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์ นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ สุภาพ พรหมยศ. 2531. "การเพาะพันธุ์ปลากัด." หน้าที่ 1-16 ใน **เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 14.** กรุงเทพฯ : กรมประมง.

สันธนะ พันธุมะโชติ. 2550. **ปลากัดปลานักรบ.** ที่มา : http://www.khonrakpla.com/index.php?lay=show&ac=article&Id=86432&Ntype=10

สุปราณี ชินบุตร ชลอ ลิ้มสุวรรณ และพรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2531. "การศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาบึกวัยอ่อน." หน้า 343-353 ใน **รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2531.** กรุงเทพฯ: กรมประมง.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และสุดารัตน์ บวรศุภกิจกุล. 2544. "ศักยภาพการผลิตปลากัดเพื่อการส่งออกในจังหวัดนครปฐม." **วารสารการประมง** 54(5) : 423-432.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Anonymous. 2007. **Internal Anatomy of Bony Fish.** [online]. Available : http://www.infovisual.info/02/033_en.html

Balon, E. K. 1983. "Terminology of Intervals in Fish Development." **J. Fish. Res. Bd. Can.** 32 : 1663-1670.

Baras, E., J. Bruno. and M. Charles. 2001. "Effect of Temperature on Survival, Growth and Phenotypic Sex of Mixed (XX-XY) Progenics of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*." **Aquaculture.** 192 : 187-199.

Baroiller, J. F. and H. D. Cotta. 2001. "Environment and Sex Determination in Farmed Fish." **Comparative Biochemisty and Physiology Part C.** 130 : 399-409.

Billard, R., A. Fostier, C. Weil and B. Breton. 1982. "Endocrine Control of Spermatogenesis in Teleost Fish." **Aquaculture.** 39 : 65–79.

Blaxter, J. H. S. 1969. "Development : Eggs and Larvae." pp. 177-252. In Hoar, W. S. and D. J. Randall. **Fish Physiology.** Vol. 3. New York : Academic Press

Bye, V. J. 1983. "The Role of Environmental Factors in The Timing of Reproductive Cycles." pp. 187-202. In Potts, G. W. and R. J. Wootton. **Fish reproductive strategies and tactics.** Devon : Plymouth Polytechnic, Plymouth.

Desprez, D. and C. Melard. 1998. "Effect of Ambient Water Temperature on Sex Determination in The Blue Tilapia *Oreochromis aureus*." **Aquaculture** 84 : 41–48.

Devlin, R. H. and Y. Nagahama. 2002. "Sex Determination and Sex Differentiation in Fish: an Overview of Genetic, Physiological and Environmental Influences." **Aquaculture.** 208 : 191-364.

Donaldson, E. M. and G. A. Hunter. 1983. "Induced Final Maturation, Ovulation and Spermiation." pp. 351-403. In Hoar, W. S., D. J. Randall and E. M. Donaldson. **Fish Physiology**. Vol. 9 Part B. New York : Academic Press.

Foberg, A. 2003. The Siamese Fighting Fish *(Betta splendens)* – An Alternative Fish Species to Use in Evaluating The Impact of Endocrine Disrupting Chemicals with Focus on Aggressive Performance. Uppsala University, Sweden.

Goetz, F. W. 1983. "Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fishes." pp. 177-170. In Hoar, W. S., D. J. Randall and E. M. Donaldson. **Fish Physiology**. Vol.9 Part B. New York : Academic Press.

Humason, G.L. 1979. **Animal Tissue Techniques 4th**. San Francisco : W.H. Freeman.

Jobling, M. 1995. **Environmental Biology of Fish**. Great Britain : T.J. Press (Padstow) Ltd.

Kavumpurath, S. and T. J. Pandian. 1992. "Production of YY Male Guppy (*Poecilia reticulate*) by Endocrine Sex Reversal and Progeny Testing." **Asian Fisheries Society**. 5 : 265-276.

Kazeto, G. R., Y. Abe, K. Masai, E. Yamaha, S. Adachi and K. Yamauchi. 2006. "Temperature-Dependent Sex Differentiation in Goldfish: Establishing The Temperature-Sensitive Period and Effect of Constant and Fluctuating Water Temperatures." **Aquaculture.** 254 : 617–624.

Leino, R. L., K. M. Jensen and G. T. Ankleyb. 2005. "Gonadal Histology and Characteristic Histopathology Associated with Endocrine Disruption in The Adult Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)." **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 19(1) : 85-98.

Luckenbach, J. A., G. John, V. D. Harry, and J. B. Russell. 2003. "Gonadal Differentiation and Effects of Temperature on Sex Determination in Southern Flounder (*Paralichthys lethostigma*)." **Aquaculture.** 216 : 315-327.

Nagahama, Y. 1983. "The Functional Morphology of Teleost Gonads." pp. 223-275. In Hoar, W.S., D. J. Randall and E. M. Donaldson. **Fish physiology**. Vol. 9 Part A. New York : Academic Press.

Nelson, J. S. 1994. **Fishes of the World 3rd**. New York : John Wiley and Sons Publishing.

Pamell, V. 2007. **What Is A Crowntail ?** [online]. Available : http://www.bettysplendens.com

Rubin, D. A. 1985. "Effect of ph on Sex Ratio in Cichlids and a Poecilliid (Teleostei)." **Copeia**. 1985(1) : 233-235.

Yuniarti, T., M. Jairin. and M. R. Toelihere. 2005. **Effect of temperature on sex differentiation of cupang fish *betta splendens* Regan**. Sukabumi Freshwater Aquaculture Development Center, Indonesia.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ก.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เนื่องจากเนื้อเยื่อปกติไม่สามารถนำมาทำการตัดดูโครงสร้างของเซลล์ได้ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาต้องผ่านขั้นตอนการขจัดน้ำ และผ่านขบวนการแทรกพาราฟินในเนื้อเยื่อ การเตรียมตัวอย่างมีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

ก.1.1 การขจัดน้ำภายในเนื้อเยื่อและแทรกพาราฟิน

นำตัวอย่างลูกปลากัดที่ทำการแช่ในน้ำยา buffer formalin 10 % นาน 24 ชั่วโมง มาแช่น้ำโดยให้น้ำไหลผ่านอย่างช้าๆนาน 2-4 ชั่วโมง และนำตัวอย่างลูกปลากัดที่ได้ใส่ใน ตลับใส่เนื้อเยื่อ ถ้าตัวอย่างลูกปลากัดที่ได้มีขนาดใหญ่ ให้ทำการตัดแต่งชิ้นเนื้อเยื่อจนได้ขนาดที่พอเหมาะ กับขนาดของตลับใส่เนื้อเยื่อ หลังจากนั้นนำตัวอย่างผ่านขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. แช่ตัวอย่างใน 50 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
2. แช่ตัวอย่างใน 70 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
3. แช่ตัวอย่างใน 80 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
4. แช่ตัวอย่างใน 95 % แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
5. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
6. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
7. แช่ตัวอย่างใน 100 % แอลกอฮอล์(ครั้งที่ 3) นาน 1 ชั่วโมง
8. แช่ตัวอย่างใน bioclear (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
9. แช่ตัวอย่างใน bioclear (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
10. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
11. แช่ตัวอย่างใน melted paraffin (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
12. นำตัวอย่างใส่ในโมลสแตนเลส เติมพาราฟิน จนเต็ม ปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใส่ในช่องแช่แข็ง เมื่อเย็นจนได้ที่แกะตัวอย่างออกจากกระทงโลหะจะได้แท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อลูกปลากัดแทรกอยู่

ก.1.2 การย้อมสีตัวอย่าง

นำแท่งพาราฟินที่มีเนื้อเยื่อลูกปลากัดอยู่ภายใน ไปทำการตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ที่ความหนา 4-5 ไมครอน และวางบนแผ่นสไลด์ นำแผ่นสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีตามขั้นตอนเทคนิคการย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีของ Humanson (1979) ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.	แช่ xylene I	3 นาที
2.	แช่ xylene II	3 นาที
3.	แช่ absolute alcohol I	2 นาที
4.	แช่ absolute alcohol II	2 นาที
5.	แช่ 95% alcohol	2 นาที
6.	แช่ 70% alcohol	2 นาที
7.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
8.	แช่ hematoxylin	3 นาที
9.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
10.	แช่ในน้ำที่เติม แอมโมเนีย 2-3 หยด	3 นาที
11.	ให้น้ำไหลผ่านน้ำอย่างช้าๆ	5 นาที
12.	แช่ 50% alcohol	2 นาที
13.	แช่ 70% alcohol	2 นาที
14.	แช่ eosin	6 นาที
15.	แช่ 95% alcohol	1 นาที
16.	แช่ absolute alcohol I	2 นาที
17.	แช่ absolute alcohol II	2 นาที
18.	แช่ absolute alcohol III	2 นาที
19.	แช่ xylene I	3 นาที
20.	แช่ xylene II	3 นาที
21.	แช่ xylene III	3 นาที
22.	ปิดกระจกสไลด์	

ภาคผนวก ข.

การเตรียมสารเคมีและสีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ข.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับแช่ตัวอย่าง

ข.1.1 สารเคมีสำหรับดองตัวอย่าง (10 % buffer formalin)

1. 37-40 % Formalin
2. น้ำกลั่น
3. sodium phosphate, monobasic
4. sodium phosphate, dibasic

ข.1.2 สารเคมีสำหรับย่อยกระดูก (Decalcification solution)

1. aluminum chloride
2. hydrochloric acid
3. formic acid
4. น้ำกลั่น

ข.2 สีย้อมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ข.2.1 การเตรียม Mayer's hematoxylin

1. hematoxylin crystals
2. sodium iodide
3. potassium aluminum sulfate
4. citric acid
5. chloral hydrate
6. น้ำกลั่น

ข.2.2 การเตรียม Eosin

1. eosin
2. 70% ethyl alcohol
3. glacial acetic acid

ภาคผนวก ค.

ข้อมูลแสดงผลการเจริญเติบโต อัตรารอด และเพศของลูกปลากัด

ตารางผนวกที่ ค.1 อัตรารอดและจำนวนลูกปลากัดเพศผู้-เพศเมีย

อุณหภูมิ(°c)	จำนวนซ้ำ	อัตรารอด (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
20	1	11	2	9
	2	16	7	9
	3	10	4	6
23	1	20	5	15
	2	18	6	12
	3	19	9	10
26	1	23	11	12
	2	20	7	13
	3	30	11	19
29	1	27	8	19
	2	27	6	21
	3	28	11	17
32	1	27	8	19
	2	40	16	24
	3	38	17	21
35	1	20	4	16
	2	23	8	15
	3	20	7	13
38	1	22	7	15
	2	16	5	11
	3	28	13	15

ตารางผนวกที่ ค.2 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	3.8±0.3	0.9±0.037	31.9±0.9	1.5±0.111	477.7±1.1	3.3±0.285
2	0.1	0.2	6.7±1.0	0.9±0.037	60.0±2.7	1.7±0.220	468.9±0.6	3.4±0.172
3	0.1	0.2	8.8±1.7	1.0±0.045	45.8±1.4	1.7±0.144	498.6±0.5	3.5±0.133
Mean±SE	0.1	0.2	6.4±1.5	0.9±.0.035	45.9±8.1	1.6±0.064	481.8±7.2	3.4±0.068

ตารางผนวกที่ ค.3 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	7.8±1.5	1.0±0.051	77.5±4.1	1.8±0.285	442.6±0.8	3.0±0.197
2	0.1	0.2	7.7±1.9	1.0±0.058	83.7±0.7	2.0±0.054	543.0±1.3	3.6±0.100
3	0.1	0.2	7.0±1.4	0.9±0.070	63.5±1.5	1.8±0.125	623.4±2.1	3.5±0.309
Mean±SE	0.1	0.2	7.5±0.3	0.9±0.024	74.9±6.0	1.9±0.066	536.3±5.2	3.4±0.168

ตารางผนวกที่ ค.4 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	10.2±0.1	1.0±0.051	61.8±1.3	1.8±0.136	582.8±6.2	3.6±0.153
2	0.1	0.2	10.5±0.3	1.0±0.089	64.7±1.6	1.9±0.212	540.4±5.5	3.4±0.158
3	0.1	0.2	8.7±0.2	1.0±0.070	68.6±1.0	1.9±0.106	676.2±6.7	3.8±0.097
Mean±SE	0.1	0.2	9.8±0.5	1.0±0.013	65.0±2.0	1.9±0.044	599.8±4.0	3.6±0.121

ตารางผนวกที่ ค.5 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	7.7±0.1	0.9±0.031	31.9±0.9	1.5±0.111	557.6±0.7	3.4±0.139
2	0.1	0.2	9.7±0.3	1.0±0.086	31.8±0.6	1.5±0.089	416.1±0.4	3.2±0.097
3	0.1	0.2	4.2±0.1	0.9±0.040	32.6±0.7	1.4±0.086	441.5±0.7	3.3±0.109
Mean±SE	0.1	0.2	7.2±1.6	0.9±0.035	32.1±0.3	1.5±0.024	471.7±4.3	3.3±0.046

ตารางผนวกที่ ค.6 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	7.3±0.2	0.9±0.074	53.0±0.9	1.7±0.120	441.9±6.5	3.3±0.163
2	0.1	0.2	13.0±0.3	1.1±0.111	49.9±0.7	1.8±0.097	377.8±5.4	3.1±0.159
3	0.1	0.2	11.1±0.1	1.1±0.066	51.2±1.1	1.7±0.133	633.6±1.0	3.5±0.260
Mean±SE	0.1	0.2	10.5±1.7	1.1±0.067	51.4±0.9	1.7±0.018	484.4±7.6	3.3±0.122

ตารางผนวกที่ ค.7 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	5.7±0.2	0.9±0.054	45.5±1.5	1.6±0.156	616.8±8.1	3.6±0.169
2	0.1	0.2	11.2±0.3	1.0±0.081	23.5±0.3	1.3±0.092	635.7±1.2	3.8±0.194
3	0.1	0.2	11.7±0.2	1.0±0.049	71.0±1.5	2.0±0.129	553.7±0.7	3.6±0.147
Mean±SE	0.1	0.2	9.5±1.9	1.0±0.057	46.7±1.3	1.6±0.185	602.0±2.5	3.6±0.061

ตารางผนวกที่ ค.8 น้ำหนักและความยาวลูกปลากัด อายุ 1-90 ชุดอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส

	อายุ 1 วัน		อายุ 30 วัน		อายุ 60 วัน		อายุ 90 วัน	
จำนวนซ้ำ	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)	น้ำหนัก(มก.)	ความยาว(ซม.)
1	0.1	0.2	9.9±0.1	1.0±0.060	57.5±0.9	1.7±0.129	536.3±1.1	3.5±0.271
2	0.1	0.2	9.7±0.2	1.0±0.058	94.4±1.7	2.1±0.127	641.9±0.7	3.5±0.097
3	0.1	0.2	8.7±0.2	0.9±0.037	45.0±1.2	1.6±0.188	388.7±0.2	3.2±0.080
Mean±SE	0.1	0.2	9.4±0.4	1.0±0.037	65.7±1.4	1.8±0.154	522.3±7.3	3.4±0.105

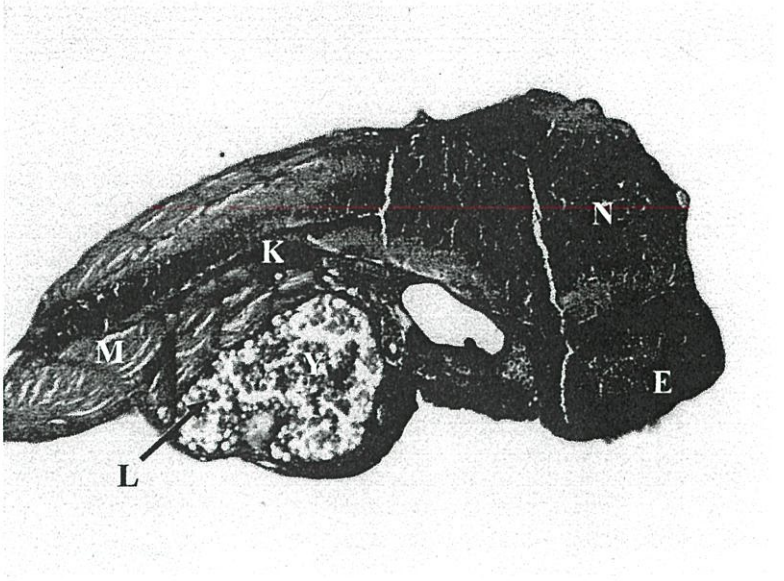
ภาคผนวก ง.

การพัฒนาอวัยวะภายในลูกปลากัดอายุ 1-10 วัน

ลูกปลากัดอายุ 1 วัน ระบบประสาทเริ่มมีการพัฒนาแต่ยังไม่แบ่งแยกเป็นสมองส่วนต่างๆอย่างชัดเจน ตาเริ่มมีการแบ่งเป็นชั้นเนื้อเยื่อต่างๆ พบเม็ดสี (pigment) ในตากระจายโดยรอบ เรตินาไม่ติดสีชมพู เหงือกมีการพัฒนาแต่ยังไม่เป็นแขนง (gill lamella) อย่างชัดเจน หัวใจยังไม่แบ่งเป็นห้อง พบเป็นถุงบางๆ อยู่ใต้ช่องเหงือกด้านล่างของส่วนหัวต่อกับลำตัวมีกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระจายอยู่ภายในถุง คล้ายคลึงกับลักษณะที่พบปลากะพงขาววัยอ่อน (*Lates calcarifer*) (ชลอ ลิ้มสุวรรณและคณะ. 2528) ถุงสะสมอาหารมีรูปร่างกลมรี พบหยดไขมันกระจายทั่วไปอยู่ในตำแหน่งบริเวณช่องท้อง อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารยังไม่เจริญ ส่วนของกระดูกสันหลังยังคงพบโนโตคอร์ด (notochord) (ภาพผนวกที่ ง.1 และ ง.2)

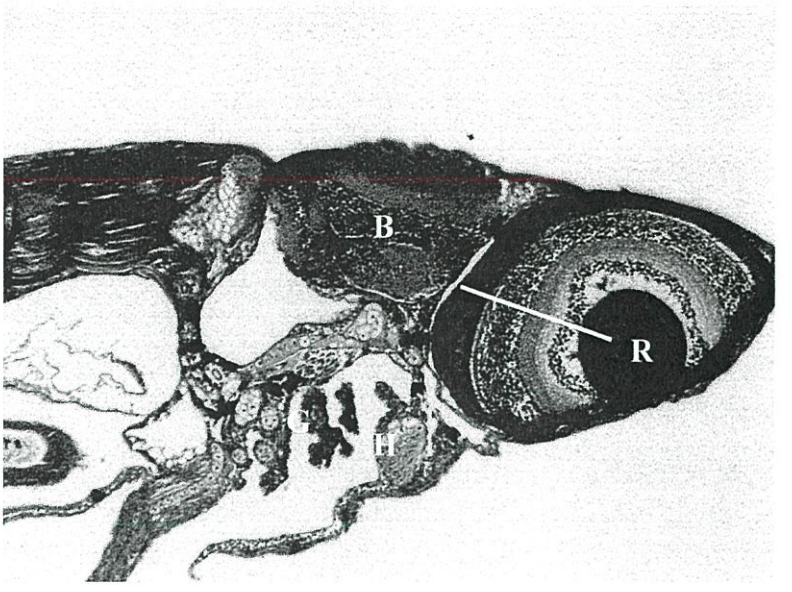
ลูกปลากัดอายุ 5 วัน ตาแบ่งเป็นชั้นต่างๆ ชัดเจนมากขึ้น เรตินาติดสีชมพู ระบบประสาทพบเซลล์ประสาทกระจายอยู่ทั่วไปในสมองและไขสันหลัง มีโนโตคอร์ด (notochord) เป็นแกนค้ำจุนยังไม่เปลี่ยนรูปร่างเป็นกระดูก (bone) ไตทอดยาวไปตามลำตัวใต้แนวกระดูกสันหลัง ถุงสะสมอาหารยุบไปจนหมด ปากเปิดพร้อมสำหรับการหาอาหาร มีการพัฒนาอวัยวะภายในและระบบย่อยอาหารขึ้นมาทดแทน สอดคล้องกับการศึกษาในลูกปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ระบบย่อยอาหารพัฒนาสมบูรณ์เมื่อลูกปลาบึกอายุ 4-5 วัน (สุปราณี ชินบุตรและคณะ. 2531) ระบบหายใจมีการพัฒนามากขึ้น พบเหงือกทุกคู่เจริญมากขึ้นเห็นเป็นซี่เหงือกยื่นออกไปชัดเจน โครงสร้างฐานเหงือกเป็นกระดูกกลุ่ม gill-filament cartilage และอวัยวะช่วยหายใจ (labyrinth organ) ถัดจากแผ่นกระดูกปิดเหงือก (operculum) (ภาพผนวกที่ ง.3 และ ง.4)

ลูกปลากัดอายุ 10 วัน สมองมีการพัฒนาดีขึ้นแบ่งเป็นส่วนต่างๆ โครงสร้างของกระดูกเป็นไฮยาลีน คาทิเลจ (Hyaline cartilage) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนประกอบไปด้วยเซลล์ คอนโดไซด์ (chondrocytes) รูปร่างกลมหรือรี มีนิวเคลียสอยู่ภายใน 1 อัน เซลล์ คอนโดไซด์ อยู่ภายในช่องว่างที่เรียกว่า ลาคูน่า (lacuna) ในหนึ่ง ลาคูน่า อาจมี คอนโดไซด์ หลายเซลล์ได้ (ชลอ ลิ้มสุวรรณและคณะ. 2530) พบตับมีการพัฒนามากขึ้น กระเพาะอาหารและลำไส้แบ่งเป็นชั้น และมีลักษณะยกตัวสูงขึ้นขยายเข้าสู่ภายในหลอดอาหาร (lumen) พบเซลล์ของกระเพาะอาหาร (gastric gland) กระจายอยู่ทั่วไปในชั้นเนื้อเยื่อของผนังกระเพาะอาหาร หัวใจแบ่งเป็นห้องต่างๆ เห็นได้อย่างชัดเจน (ภาพผนวกที่ ง.5 และ ง.6) ซึ่งพบเช่นเดียวกันในปลากะพงขาววัยอ่อน (ชลอ ลิ้มสุวรรณและคณะ. 2528)

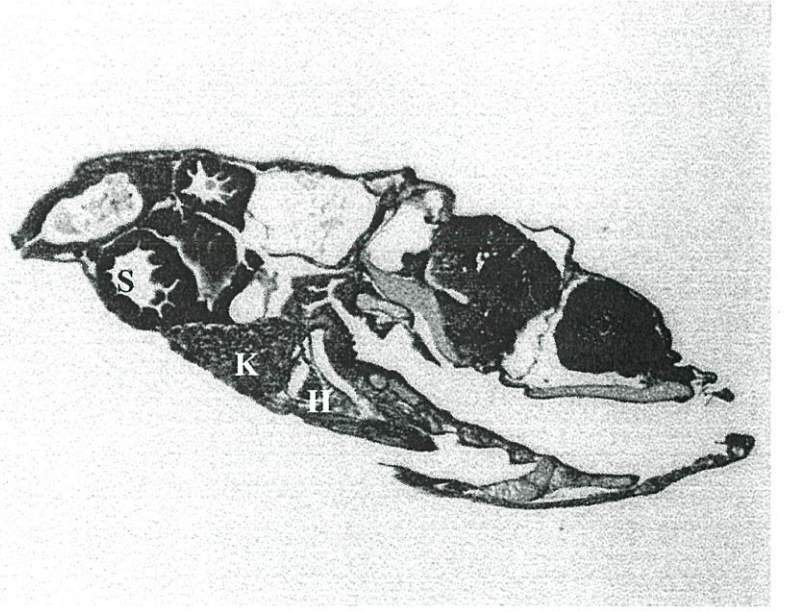


ภาพผนวกที่ ง.1 ลูกปลากัดอายุ 1 วัน การพัฒนาของชั้นเนื้อเยื่อตา (E) เซลล์ประสาทกระจายอยู่ทั่วไป (NG) กล้ามเนื้อ (M) ไต (K) ถุงสะสมอาหาร (Y) หยดไขมัน (L) (Humason : H&E; X 4)

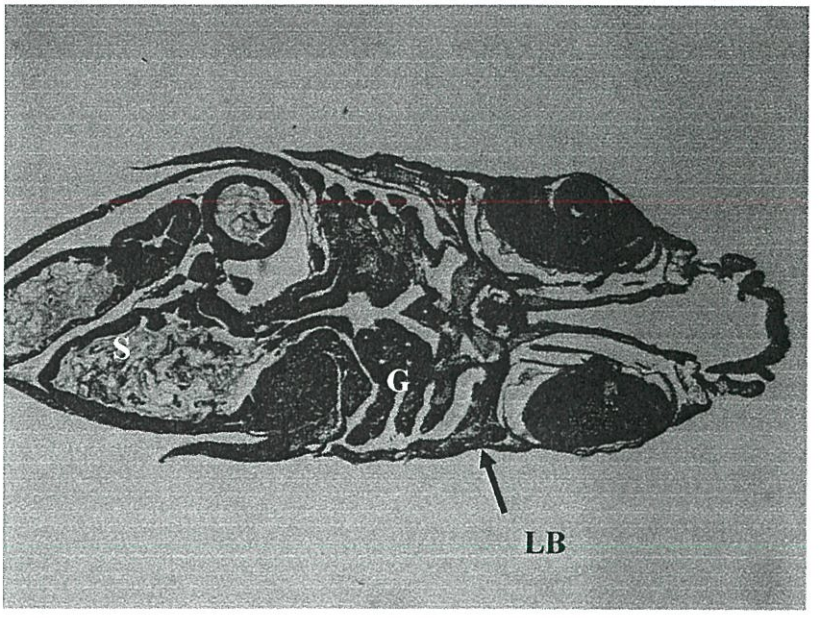
ภาพผนวกที่ ง.2 ลูกปลากัดอายุ 1 วัน ก้อนหินปูนหรือ otolith (O) เซลล์ที่ฐานกล่องหูเป็น supporting cell (SC) (Humason : H&E; X 10)



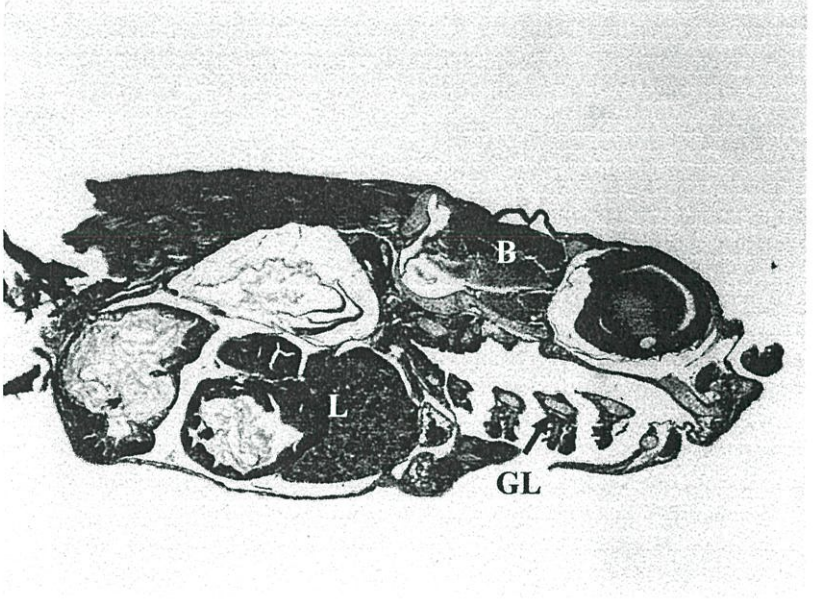
ภาพผนวกที่ ง.3 ลูกปลากัดอายุ 5 วัน สมองเริ่มแบ่งเป็นส่วนๆ (B) ตาพบเรตินา (R) เหงือกพัฒนามากขึ้น (G) โครงสร้างกระดูกเป็น Hyaline cartilage (HC) (Humason : H&E; X 4)



ภาพผนวกที่ ง.4 ลูกปลากัดอายุ 5 วัน ในส่วนของทางเดินอาหารและระบบย่อยอาหาร (S) หัวใจแบ่งเป็นห้อง (H) ตับ (L) (Humason : H&E; X 4)



ภาพผนวกที่ ง.5 ลูกปลาอายุ 10 วัน เหงือก (G) อวัยวะช่วยหายใจ (labyrinth organ) บริเวณกระดูกปิดเหงือก (LB) ชั้นเนื้อเยื่อในระบบย่อยอาหาร (S) (Humason : H&E; X 4)



ภาพผนวกที่ ง.6 ลูกปลาอายุ 10 วัน สมองแบ่งเป็นส่วนต่างๆ (B) ตับขยายขนาด (L) ซี่เหงือก (GL) (Humason : H&E; X 4)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายณรงค์ กมลรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	24 กันยายน 2522 ที่ กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่	99/878 หมู่ 16 แขวงสะพานสูง เขตสะพานสูง กรุงเทพฯ 10250
	โทร 02-735-7499
ประวัติการศึกษา	2545 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง