ผลของอุณหภูมิ ช่วงแสง และความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวาง ต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด (*Betta splendens*) สายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (halfmoon)

TEMPERATURE, PHOTOPERIOD AND pH OF *Terminalia catappa* EXTRACT AFFECTING SEX RATIO IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens*) FRY, VARIETY HALFMOON

สุกสกาว รอดปั้น

SOOKSAKAOW RODPAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2563

KMITL-2020-AG-M-081-324

ผลของอุณหภูมิ ช่วงแสง และความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวาง ต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด (*Betta splendens*) สายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (halfmoon)

TEMPERATURE, PHOTOPERIOD AND pH OF *Terminalia catappa* EXTRACT AFFECTING SEX RATIO IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens*) FRY, VARIETY HALFMOON

สุกสกาว รอดปั้น

SOOKSAKAOW RODPAN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2563

KMITL-2020-AG-M-081-324

TEMPERATURE, PHOTOPERIOD AND pH OF *Terminalia catappa* EXTRACT AFFECTING SEX RATIO IN SIAMESE FIGHTING FISH (*Betta splendens*) FRY, VARIETY HALFMOON

SOOKSAKAOW RODPAN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN FISHERIES SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2020

KMITL-2020-AG-M-081-324

COPYRIGHT 2020

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของอุณหภูมิ ช่วงแสง และความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด (*Betta splendens*) สายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (halfmoon)
นักศึกษา	นางสาว สุกสกาว รอดปั้น
รหัสประจำตัว	60604050
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การประมง
พ.ศ.	2563
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม คือ อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่มีผลต่อ อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และความยาวลำตัวในลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (ฮาฟมูน) มีวัตถุประสงค์เพื่อลดปัญหาการเพาะพันธุ์ปลากัดในช่วงฤดูหนาว (เดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์) ของเกษตรกรที่ได้จำนวนลูกปลาเพศผู้และมีอัตราการรอดของลูกปลากัดน้อย ประกอบด้วย 4 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาอุณหภูมิน้ำต่างกันส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน พบว่า การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในช่วงอุณหภูมิต่างกัน คือ 28-29 (ชุดควบคุม), 24-25, 30-31, 32- 33 และ 34-35°C ทำให้อัตราการรอดของลูกปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ช่วงอุณหภูมิ 28-29°C มีอัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลากัดสูงสุด เท่ากับร้อยละ 83.67±17.43 โดย อัตราส่วนเพศของลูกปลากัดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และจากการนำลูกปลากัดหลังจากการฟักอายุ 7 และ 14 วัน อนุบาลในอุณหภูมิน้ำปกติ (ชุดควบคุม) อุณหภูมิน้ำ 30 และ 32°C พบว่า อัตราการรอดและอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการผสมพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน พบว่า การใช้ช่วงเวลาให้แสงต่างกันได้แก่ 0L:24D (ชุดควบคุม), 24L:0D, 8L:16D, 12L:12D และ 16L:8D ส่งผลให้ จำนวนไข่ น้ำหนักไข่ ความดกไข่ในแม่พันธุ์ปลากัด และอัตราการฟัก มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดย ช่วงเวลาให้แสง 0L:24D มีจำนวนไข่และความดกไข่สูงที่สุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1,002.5±1.98 ฟอง และ 1,106.62±2.72 ฟอง/ตัว ตามลำดับ ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D มีน้ำหนักไข่และอัตราการฟัก มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.24±0.01 กรัม และร้อยละ 62.18±14.21 ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับช่วงเวลาให้แสง

0L:24D (P>0.05) ในส่วนของอัตราส่วนเพศและอัตราการรอดของลูกปลากัด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากการทดลองช่วงเวลาให้แสงที่ต่างกันส่งผลต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัด ในปลากัดเพศเมียสามารถพบระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ตั้งแต่ระยะที่ 2-6 และในปลากัดเพศผู้พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids และ spermatozoa การทดลองที่ 3 ศึกษาความเป็นกรด-ด่าง (pH)จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดและการเติบโตในลูกปลากัดฮาฟมูน พบว่า สารแทนนินในใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันที่ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)โดยปริมาณใบหูกวางแห้ง 10 กรัม มีสารแทนนินมากที่สุดคือ 943±0.01 ppm จากการแช่ปริมาณใบหูกวางแห้งต่างกันในน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลา 24 ชั่วโมงต่อค่า pH ในน้ำ พบว่า ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ที่ระยะเวลาการแช่ 15 ชั่วโมง จากผลของ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง ต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตรารอดของพ่อแม่ปลากัด และ อัตราส่วนเพศผู้การเติบโตในลูกปลากัดฮาฟมูน พบว่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร มีค่า pH เฉลี่ย 7.90, 6.67, 6.48, 6.33และ 5.91 ตามลำดับ ทำให้การผสมพันธุ์วางไข่และอัตรารอดของพ่อแม่พันธุ์และลูกปลากัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)โดย pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 2.5 กรัม/ลิตร (pH 6.67) มีการวางไข่มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 80.0±44.72 แต่ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร (pH 5.91) ทำให้พ่อแม่พันธุ์และลูกปลากัดตายทั้งหมด การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิใน pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่ปริมาณต่างกัน พบว่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร (pH 6.71) มีอัตราส่วนเพศผู้มากที่สุดร้อยละ 74.13±9.08 สามารถเพิ่มลูกปลากัดเพศผู้ได้ร้อยละ 35.27±22.97 จากชุดควบคุม (pH 7.50) การเติบโตของลูกปลากัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การทดลองที่ 4 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน พบว่า การเพาะพันธุ์และอนุบาลปลากัดฮาฟมูนแบบควบคุมปัจจัย ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2562 - มกราคม 2563 (ช่วงฤดูหนาว) และ เดือนธันวาคม 2562 - กุมภาพันธ์ 2563 (ปลายฤดูหนาว) ส่งผลให้อัตราการรอดและอัตราส่วนเพศผู้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)ดังนั้นขั้นตอนการเพาะพันธุ์ปลากัดโดยการควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อม เริ่มต้นจากการผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้ 24L:0D ตามด้วย การแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณ 5 กรัม/ลิตร ระยะเวลา 15 ชั่วโมงในไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว และ อนุบาลลูกปลากัดหลังจากการฟักอายุ 7 วันในอุณหภูมิ 30°C นาน 14 วัน ทำให้สามารถเพาะพันธุ์ปลากัดในฤดูหนาวและมีลูกปลากัดเพศผู้เพิ่มขึ้นร้อยละ 25-35

Thesis	Temperature, photoperiod and pH of *Terminalia catappa* extract affecting sex ratio in Siamese fighting fish (*Betta splendens*) fry, variety halfmoon
Student	Miss Sooksakaow Rodpan
Student ID	60604050
Degree	Master Degree of Science
Program	Fisheries Science
Year	2020
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Nongnuch Laohavisuti

ABSTRACT

The study of environmental factors including temperature, photoperiod and pH from the dried *Terminalia catappa* extract to either sex ratio and growth performance of halfmoon fancy betta fish**.** The objective is to reduce breeding problems for halfmoon betta fish in the cool season (October - February) which the number of male fry and the survival rate of halfmoon betta fish fry is decrease. There were 4 experiments the first experiment was the study on the different water temperatures affecting on sex ratio in larvae. The results showed that soaked fertilized eggs at different water temperatures at 28-29 (control), 24-25, 30-31, 32-33 and 34-35°C, the survival rate of larvae was significantly different ($P<0.05$). The temperature at 28-29°C gave the highest survival rate of larvae at 83.67 ± 17.43%. The sex ratio of larvae was not significantly different ($P>0.05$) The nursery of larvae after 7 and 14 days post hatch underwater at temperature (control), 30 and 32°C revealed that the survival rate and sex ratio were not significantly different ($P>0.05$). The second experiment was study on photoperiod that affecting to breeding and sex ratio in *Betta splendens*. The results showed that the photoperiod of different ratio as: 0L: 24D (control), 24L: 0D, 8L: 16D, 12L: 12D and 16L: 8D gave in the number of eggs, egg weight, fecundity in breeder and the hatching rate with a significant difference ($P<0.05$) when 0L: 24D presented the highest number of eggs and fecundity with an average of 1,002.5±1.98 eggs and 1,106.62±2.72 eggs / fish, respectively and photoperiod at 24L: 0D, average egg weight and hatching rates average were 1.24±0.01g and 62.18± 14.21% and there were no significantly different with the 0L: 24D ($P>0.05$). The sex ratio and survival rate of larvae were not significant difference ($P>0.05$). The different photoperiods showed

the effect on the development of gamete in the breeder. The female *B. splendens*, the stage of egg cell development can be found in stage 2-6 and the male *B. splendens* development of germ cells was in primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids and spermatozoa. The third experiment, study the effect of pH from the different quantities of dried *Terminalia catappa* leaf extract on sex ratio, survival rate and growth performance of halfmoon betta fish. It was found that the amount of tannin in the dried *T. catappa* leaves at 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 g were significantly different ($P<0.05$). The 10 g of dried *T. catappa* leaves contains the maximum tannin 943±0.01 ppm. Soaking the different quantity of dried *T. catappa* leaves in a water period of 24 hours to change pH in the water. There was a significant difference ($P <0.05$) at 15 hours. The pH from *T. catappa* leaves soaked water at 0, 2.5, 5, 7.5 and 10 g/l. As a results, spawning rate and survival rate of breeder and survival rate of larvae were significantly different ($P<0.05$). The pH from dried *T. catappa* leaves water soaked 2.5 g/l (pH 6.67) presented the highest spawning rate at 80.0±44.72 % but the pH from dried *T. catappa* leaves 10 mg/l (pH 5.91) caused all breeders and larvae to die. Immersion of fertilized eggs in pH water from different amounts of *T. catappa* leaves affected to male ratio and growth performance of the *B. splendens* larvae. It was found that the amount of dried *T. catappa* leaves at 5 g/l (pH 6.71) resulted in the highest male larvae 74.13±9.08 % and increased the number of male larvae 35.27±22.97% differ from control (pH 7.50). The growth of fighting fish larvae were not significantly different ($P>0.05$). The fourth was the experiment comparison of culture and control factors (environmental sex determination; ESD) on sex ratios in halfmoon betta fish. It was found that breeding and nursing of halfmoon betta fish with controlled factors during November 2019 – January 2020 (Cool season) and December 2019 – February 2020 (Late cool seasoon), resulting in survival rates and sex ratios were significantly different ($P<0.05$). Therefore, the breeding process of halfmoon betta fish by controlling environmental factors beging with breeding of breeder in the photoperiod at 24L: 0D, followed by the immersion of dried *T. catappa* leaves at 5 g /l for 15 hours in fertilized eggs and nursed the larvae 7 days at 30 °C for 14 days. It might be promising to breed halfmoon betta fish in the winter and increase the number of male larvae 25-35%.

กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาของข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่งที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาต่างๆและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ รวมไปถึงแนวทางในการดำเนินการทดลอง และชี้ข้อบกพร่องที่เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการทดลองอย่างใกล้ชิดจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณศิราณี ฉิมพลี เจ้าของสถานประกอบการฟาร์มปลากัด แชมป์ฟาร์ม ที่ให้ใช้สถานที่ในการดำเนินการทดลอง รวมถึงให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ ตลอดการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณทีมงานจาก Joyradabetta farm ที่ช่วยเหลือการทำงานวิจัยและการเก็บผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านคำแนะนำต่างๆ สารเคมี และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณทุกๆท่านที่อยู่เบื้องหลังความสำเร็จในครั้งนี้ สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครอบครัว ญาติพี่น้องทุกๆ ท่านที่คอยเป็นกำลังใจ ช่วยเหลือในด้านต่างๆ คอยสนับสนุน และเป็นแรงผลักดันอยู่เบื้องหลัง ให้ข้าพเจ้าขยันและเอาใจใส่ในการศึกษา

สุกสกาว รอดปั้น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……..... III

กิตติกรรมประกาศ……..... V

สารบัญ……..…….. VI

สารบัญตาราง……..... XI

สารบัญภาพ……..... XII

บทที่ 1 บทนำ……..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..……..…… 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา……...… 2

1.3 สมมติฐานของการศึกษา……..... 2

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย..... 3

1.5 ขอบเขตการวิจัย……..… 3

1.6 ขั้นตอนการศึกษา…… 3

บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..... 4

2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะของปลากัด……... 4

2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา……..……..……..... 5

2.2.1 อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้……..……..... 6

2.2.2 อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศเมีย……..……..... 7

2.2.3 การผสมพันธุ์และการวางไข่ของปลากัด……..... 9

2.3 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา……..... 9

2.3.1 ช่วงแสงที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา……..…… 10

2.3.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา……... 11

2.3.3 ความเป็นกรด–ด่างของน้ำ (pH) ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา..... 11

2.4 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลา..... 12

2.4.1 อุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลา..... 13

2.4.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลา..... 14

2.5 ใบหูกวางต่อการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม……..…… 14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5.1 สารแทนนินในใบหูกวาง……..…… 15

2.5.2 ประโยชน์ของใบหูกวางต่อ คุณภาพน้ำ การยับยั้งแบคทีเรีย และอัตราการรอดของปลา. 15

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง……... 17

3.1 สัตว์ทดลอง……..……...…….....……... 17

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง……..……....…….……... 17

3.3 แผนผังการทดลอง เรื่อง ผลของอุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน……..……....…….……... 18

3.4 วิธีการดำเนินการทดลอง ……..…… 19

การทดลองที่ 1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน…….. 19

3.4.1 การทดลองที่ 1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน..... 19

3.4.2 การทดลองที่ 1.2 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 7 วันในอุณหภูมิต่างกัน……. 20

3.4.3 การทดลองที่ 1.3 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 14 วันในอุณหภูมิต่างกัน……. 21

การทดลองที่ 2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน. 22

3.4.4 การทดลองที่ 2.1 ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน……. 22

3.4.5 การทดลองที่ 2.2 ช่วงเวลาให้แสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน ……. 24

การทดลองที่ 3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดน้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน …… 25

3.4.6 การทดลองที่ 3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวางแห้ง……. 25

3.4.7 การทดลองที่ 3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่า pH ในน้ำ…… 26

3.4.8 การทดลองที่ 3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน..... 27

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.9 การทดลองที่ 3.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน …… 28

3.4.10 การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัย (ESD) ต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน …….. 30

3.5 การวิเคราะห์ผล..... 31

3.6 สถานที่ทำการทดลอง……..……..……..... 31

3.7 ระยะเวลาทำการทดลอง……..……..……..... 31

บทที่ 4 ผลการทดลอง…….. 32

4.1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน……..... 32

4.1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน …… 32

4.1.2 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูนอายุ 7 วันในอุณหภูมิต่างกัน…….. 33

4.1.3 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูนอายุ 14 วันในอุณหภูมิต่างกัน……..… 34

4.2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน..... 35

4.2.1. ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน... 35

4.2.2 ผลของช่วงเวลาให้แสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน.. 38

4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดและการเติบโตในลูกปลากัดฮาฟมูน ……... 42

4.3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวาง…….... 42

4.3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่า pH ในน้ำ……..… 43

4.3.3 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน ……... 45

4.3.4 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดน้ำหนัก และความยาวลำตัวของลูกปลากัดฮาฟมูน ……. 46

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 การเปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ……. 48
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง……... 50
5.1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน……. 50
5.1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ……. 50
5.1.2 ผลของอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูนอายุ 7 วัน…… 51
5.1.3 ผลของอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูนอายุ 14 วัน…….. 51
5.2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน……..... 52
5.2.1. ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน... 52
5.2.2 ผลของช่วงแสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน…….. 54
5.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดน้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน…..…….. 55
5.3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวาง..... 55
5.3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำ.... 56
5.3.3 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน …….. 56
5.3.4 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดน้ำหนัก และ ความยาวลำตัวของลูกปลากัดฮาฟมูน ……..……..… 57
5.4 การเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ……. 59

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 60
บรรณานุกรม..... 61
ภาคผนวก..... 67
ประวัติผู้เขียน..... 71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ผลของอุณหภูมิน้ำในแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนักและความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน.....…….……	33
4.2	ผลของอุณหภูมิน้ำที่ต่างกันในการอนุบาลลูกปลากัดอายุ 7 วัน ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนักและความยาวลำตัวลูกปลากัดฮาฟมูนเป็นเวลา 14 วัน	34
4.3	ผลของอุณหภูมิน้ำที่ต่างกันในการอนุบาลลูกปลากัดอายุ 14 วัน ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนักและความยาวลำตัวลูกปลากัดฮาฟมูนเป็นเวลา 14 วัน…….....…	35
4.4	ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อ จำนวนไข่ น้ำหนักไข่ ความดกไข่ และ อัตราการฟักในลูกปลากัดฮาฟมูน …….....……..…..	36
4.5	ผลของช่วงเวลาให้แสง ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนักและความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ……..	37
4.6	ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวางแห้ง.....	42
4.7	การแช่ใบหูกวางแห้งในน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลา 24 ชั่วโมงต่อค่า pH ในน้ำ.....	43
4.8	ปริมาณสารแทนนินที่ส่งผลต่อ pH ของน้ำ.....	44
4.9	ตัวแปรคุณภาพน้ำของสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันที่ระยะเวลา 15 ชั่วโมง…….....	45
4.10	ผลของ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่อการวางไข่ อัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ และลูกปลากัดฮาฟมูน …….	46
4.11	ผลของสารสกัดใบหูกวางแห้งที่แตกต่างกันต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และความยาวลำตัวในปลากัดฮาฟมูน ……..……	47
4.12	เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง) ต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูนรอบการเพาะที่ 1 เดือนพฤศจิกายน 2562-มกราคม 2563……	48
4.13	เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง) ต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน รอบการเพาะที่ 2 เดือนธันวาคม 2562 –กุมภาพันธุ์ 2563.....	49

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ปลากัดครีบสั้น (A) และ ปลากัดครีบยาวหรือปลากัดฮาฟมูน (B)……	5
2.2	รูปแบบของท่ออัณฑะที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์.....	6
2.3	เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นและระยะปลายภายในอัณฑะของปลา.....	7
2.4	การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในถุงผลิตไข่ (ovarian follicle)……..……	8
2.5	การศึกษาการพัฒนาเซลล์ไข่แต่ละระยะทางพยาธิสภาพ.....	8
3.1	แผนผังแสดงการทดลองเรื่อง อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ……	18
3.2	ความแตกต่างระหว่าง (A) ลูกปลากัดเพศผู้ และ (B) ลูกปลากัดเพศเมีย…	20
3.3	กล่องกระดาษขนาด 27x43 เซนติเมตร ติดตั้งหลอดไฟ LED กันน้ำ ความเข้มแสง 680 ลักซ์ควบคุมการปิดเปิดตามเวลาที่กำหนดด้วยเครื่องตั้งเวลาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลากัด……	23
3.4	ตู้ปลาขนาด 60.9x30.5x60.9 เซนติเมตร สำหรับการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้ แสงต่างกัน.....	25
3.5	การห่อใบหูกวางแห้งด้วยตาข่ายไนลอน.....	28
3.6	ลักษณะการแช่ใบหูแห้งที่ห่อด้วยตาข่ายไนล่อนในภาชนะเพาะพันธุ์.....	29
4.1	การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศเมียช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า.....	39
4.2	จำนวนเซลล์ไข่แต่ละระยะที่พัฒนาในช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกัน.....	40
4.3	การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศผู้ช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า.....	42
4.4	ปริมาณใบหูกวางแห้งต่อค่า pH ที่ลดลงในระยะเวลาต่างกัน.....	44

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากัด (*Betta splendens*) มีถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้สามารถพบได้ในประเทศไทย บริเวณลุ่มแม่น้ำแม่กลอง และ แม่น้ำเจ้าพระยา มีรูปร่างลักษณะทั่วไป ลำตัวเรียวยาวแบนด้านข้าง ขนาดลำตัว 5-7 เซนติเมตร มีริมฝีปากหนา มีครีบขนาดใหญ่ในบางสายพันธุ์ เช่น สายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก, หางมงกุฎ และ สองหาง เพศผู้มีสีสันสวยงามกว่าเพศเมีย ปัจจุบันปลากัดได้รับการยกย่องให้เป็นสัตว์น้ำประจำชาติในปี พ.ศ. 2562 โดยการเพาะเลี้ยงปลากัดในประเทศไทยสามารถพบได้หลายจังหวัดในภาคกลาง เช่น กรุงเทพมหานคร นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี กาญจนบุรี และ อ่างทอง ซึ่งสายพันธุ์ที่นิยมเพาะเลี้ยง คือ สายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (ฮาฟมูน) เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาจากนักเพาะเลี้ยงปลากัดชาวฝรั่งเศสและชาวเยอรมันในปี พ.ศ. 2530 มีลักษณะเด่น คือ ครีบหางมีขนาดใหญ่แผ่กว้างเป็นครึ่งวงกลมทำมุม 180 ° ครีบทุกครีบมีขนาดสมส่วนกับลำตัว เมื่อมีการแผ่ครีบหางจะต่อเนื่องกับครีบหลังและครีบก้นเป็นลักษณะครึ่งวงกลม สีสันสวยงามบนลำตัวมีสีมากกว่า 1-2 สี และมีชื่อเรียกในทางการค้าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสีสันบนลำตัวปลา เช่น ปลากัดบัตเตอร์ฟลาย (butterfly) หมายถึง ปลากัดที่มีโคนครีบด้านในเป็นสีหนึ่งขอบครีบด้านนอกเป็นสีขาวหรือสีใส และปลากัดดราก้อน (dragon) หมายถึง ปลากัดที่มีลำตัวสีขาวมีความเงาของเกล็ด และมีครีบเป็นสีอื่น เช่น สีแดง สีส้ม สีเหลือง หรือครีบสีดำ เป็นต้น (ประภาศ, 2553) ปลากัดฮาฟมูนมีมูลค่าสูงกว่าปลากัดชนิดอื่นๆ โดยได้รับความนิยมจากตลาดการส่งออกปลาสวยงาม มีปริมาณการส่งออกในปี 2554 ประมาณ 25 ล้านตัวเป็นมูลค่า 85 ล้านบาท (กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ, 2554) และในปี 2555 มีการส่งออกปีละประมาณ 1.3-4.7 ล้านตัว คิดเป็นมูลค่า 11-45 ล้านบาท สร้างรายได้ให้กับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเป็นอย่างมาก แต่ในฤดูหนาวช่วงปลายเดือนตุลาคม-ต้นเดือนกุมภาพันธ์ของทุกปี เกษตรกรประสบปัญหาการเพาะเลี้ยงปลากัดได้จำนวนปลาเพศผู้ และอัตราการรอดน้อยลง ส่งผลต่อการส่งออกและรายได้ จากการศึกษางานวิจัยการเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ พบว่า ปัจจัยสิ่งแวดล้อมสามารถส่งผลต่อ ความดกไข่ อัตราส่วนเพศผู้ และ อัตราการรอดของปลา ซึ่งวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดแบบดั้งเดิมของเกษตรกรมักทำการผสมพันธุ์ในขันพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ภายในบรรจุน้ำ 1 ลิตร ใบไม้ขนาดเล็ก 1 ใบ และนิยมใช้ใบหูกวางแห้งในการเพาะพันธุ์ โดยใส่ใบหูกวางแห้งขนาด 3x 4 เซนติเมตร 1 ใบ ปิดขันเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทนาน 7 วัน เพื่อให้ปลากัดผสมพันธุ์วางไข่ โดยเกษตรกรมีความเชื่อว่าการใช้ใบหูกวางแห้งในการเพาะพันธุ์และอนุบาลปลากัดสามารถช่วยให้ปลามีอัตราการรอดเพิ่มขึ้น

เนื่องจากสารพฤกษเคมีในใบหูกวางส่งผลต่อค่า pH ในน้ำที่จัดเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมหนึ่งปัจจัย จากการศึกษาของ Nugroho et al. (2016) พบว่าสารแทนนินในใบหูกวางส่งผลต่อคุณภาพน้ำ คือ ระดับความเข้มข้นของน้ำแช่ใบหูกวางที่ 625 ppm มีค่า pH ที่ 5.05 เนื่องจากปริมาณสารแทนนินที่มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนๆ และความเป็นกรด-ด่างนั้นยังส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลา Reddon and Peter (2013) กล่าวว่า การกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อม (environmental sex determination; ESD) สิ่งมีชีวิตหรือปลาแต่ละสายพันธุ์ที่มีการกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อมจะสามารถพัฒนาเป็นได้ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่ในช่วงของการพัฒนาระยะแรกของชีวิต

ดังนั้นการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลากัดรูปแบบใหม่เพื่อให้ได้ผลผลิตปลากัดและอัตราส่วนเพศผู้มากขึ้นโดยการใช้ปัจจัยสิ่งแวดล้อม คือ อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง เป็นปัจจัยควบคุม เพื่อนำข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยครั้งนี้ถ่ายทอดเทคนิคในกระบวนการผลิตปลากัดให้แก่เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากัดของประเทศไทยต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เปรียบเทียบอุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.2.2 เปรียบเทียบช่วงเวลาให้แสงที่เหมาะสมต่อการผสมพันธุ์วางไข่ อัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.2.3 เปรียบเทียบระดับ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่เหมาะสมต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.2.4 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ปลากัดแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.2.5 เพื่อพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงปลากัดเป็นรูปแบบใหม่

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

1.3.1 อุณหภูมิน้ำส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในปลากัด

1.3.2 ช่วงเวลาให้แสง ส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.3.3 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.3.4 การควบคุมปัจจัยสิ่งแวดล้อมส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัด

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

ช่วงฤดูหนาว (ตั้งแต่ปลายเดือนตุลาคม-ต้นเดือนกุมภาพันธ์ของทุกปี) เกษตรกรประสบปัญหาการเพาะเลี้ยงปลากัดได้จำนวนปลาเพศผู้ และอัตราการรอดน้อยลง ส่งผลต่อการส่งออกและรายได้ จากการศึกษางานวิจัยการเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ พบว่า ปัจจัยสิ่งแวดล้อมสามารถส่งผลต่อความดกไข่ อัตราส่วนเพศผู้ และ อัตราการรอดของปลา ซึ่งวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดแบบดั้งเดิมของเกษตรกรนิยมใช้ใบหูกวางแห้งในการเพาะพันธุ์ โดยเกษตรกรมีความเชื่อว่าการใช้ใบหูกวางแห้งในการเพาะพันธุ์และอนุบาลปลากัดสามารถช่วยให้ปลามีอัตราการรอดเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารพฤกษเคมีในใบหูกวางส่งผลต่อค่า pH ในน้ำที่จัดเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมหนึ่งปัจจัย ดังนั้นจึงเลือกศึกษาการใช้ปัจจัยสิ่งแวดล้อม คือ อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง เป็นปัจจัยควบคุมในการเพาะพันธุ์ปลากัด เพื่อให้ได้ผลผลิตปลากัดเพศผู้เพิ่มขึ้น

1.5 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาขั้นตอนของการเพาะพันธุ์ปลากัดเพื่อให้ได้ลูกปลาเพศผู้เพิ่มขึ้น โดยใช้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยควบคุม ประกอบด้วย 4 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน การทดลองที่ 2 ศึกษาช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน การทดลองที่ 3 ผลของความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน การทดลองที่ 4 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

1.6 ขั้นตอนของการศึกษา

1.6.1 ศึกษาวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนโดยใช้อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศของลูกปลากัด

1.6.2 ศึกษาวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนโดยใช้ช่วงเวลาให้แสงที่มีผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศของลูกปลากัด

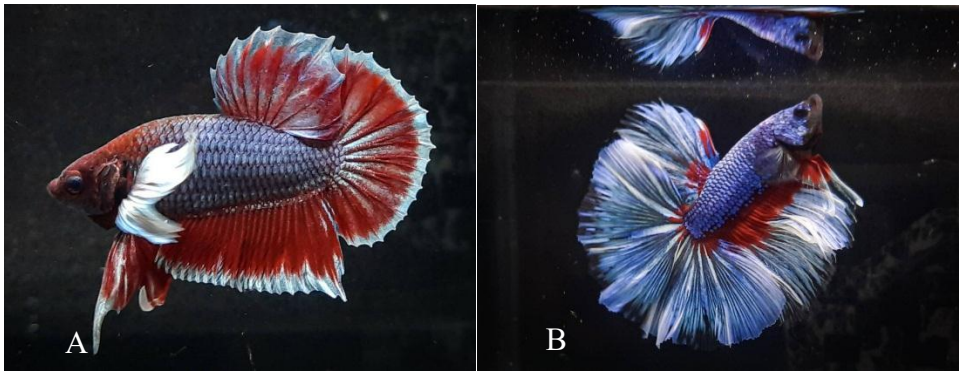
1.6.3 ศึกษาวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนโดยใช้ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดและ น้ำหนัก ความยาวลำตัวของลูกปลากัด

บทที่ 2
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานและลักษณะของปลากัด

ปลากัด (*Betta splendens*) เป็นปลาในสกุล *Betta* จำแนกได้ 55 ชนิด สามารถพบในประเทศไทย 10 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มปลาสร้างหวอด ประกอบด้วย 4 ชนิด ได้แก่ *Betta splendens* , *Betta smaragdina* , *Betta imbellis* และ *Betta Mahachaiensis* กลุ่มปลาเลี้ยงลูกในปาก 6 ชนิด ได้แก่ *Betta prima*, *Betta simplex, Betta pi*, *Betta pallida, Betta apollon* และ *Betta ferox* มีถิ่นที่อยู่อาศัยบริเวณแหล่งน้ำนิ่งที่มีพืชน้ำขึ้นอยู่ เช่น บ่อน้ำ นาข้าว บึง หนอง เป็นต้น ลักษณะทั่วไปของปลากัดที่สามารถพบเห็นได้ คือ มีลำตัวแบนด้านข้าง ปากมีขนาดเล็กและริมฝีปากหนา มีฟันที่ขากรรไกรบนและล่าง มีเกล็ดปกคลุมหัวและลำตัว ครีบก้น ครีบหางมีก้านครีบ 1-2 ก้าน ครีบอกมีขนาดเล็กกว่าครีบอื่นๆ ครีบท้องอยู่ในตำแหน่งอก มีอวัยวะช่วยหายใจซึ่งอยู่ในโพรงอากาศหลังช่องเหงือก เรียกว่า labyrinth organ มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อมีรอยหยักและเส้นเลือดฝอยจำนวนมาก (ธนาทิพย์, 2556) ปลากัดเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะต่างกันสามารถจำแนกได้ คือ เพศผู้มีขนาดลำตัวใหญ่กว่า สีสันสวยงาม และมีความยาวครีบยาวกว่าเพศเมีย โดยปลาเพศเมียมีขนาดลำตัวเล็ก ครีบทุกครีบสั้นกว่าเพศผู้ ส่วนท้องมีลักษณะบวมและมีจุดนำไข่ (ovipositor tube) มีลักษณะเป็นจุดสีขาวเล็กอยู่บริเวณใต้ลำตัวอยู่ระหว่างครีบท้องและครีบอก (การุณ, 2556) สายพันธุ์ปลากัดในปัจจุบันสามารถแบ่งออกได้ 2 ชนิดคือ ปลากัดครีบสั้น และ ปลากัดครีบยาว (ภาพที่ 2.1) โดย ปลากัดครีบสั้นเป็นปลากัดสายพันธุ์ดั้งเดิมในธรรมชาติ มีสีบนลำตัว เช่น สีน้ำตาล หรือสีเทาแกมเขียว สีน้ำเงิน ลำตัวและปากมีขนาดใหญ่ สามารถพบได้ทั่วไปทุกภูมิภาคของประเทศไทย เช่น ปลากัดหม้อ ปลากัดทุ่ง ต่อมามีการพัฒนาสายพันธุ์ปลากัดครีบสั้นโดยเน้นความสวยงาม ความยาวครีบ สีสันบนลำตัวปลากัด เรียกปลากัดลักษณะนี้ว่า ปลากัดจีน หรือ ปลากัดเขมร ต่อมามีการพัฒนาสายพันธุ์ปลากัดจีนให้มีสีสันสวยงาม ครีบหางแผ่กว้างและมีรูปแบบของหางมากขึ้นในปี พ.ศ. 2417 ปลากัดจีนถูกเลี้ยงในแถบทวีปยุโรปและมีการปรับปรุงพันธุ์ปลากัดจีนให้มีสีสัน และรูปแบบหางเพิ่มขึ้น ปัจจุบันปลากัดที่ได้รับความนิยม คือ ปลากัด หางพระจันทร์ครึ่งซีก (ฮาฟมูน) (ภาพที่ 2.1 B) ปลากัดฮาฟมูน เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาจากนักเพาะเลี้ยงปลากัดชาวฝรั่งเศสและชาวเยอรมันในปี พ.ศ. 2530 มีลักษณะเด่น คือ ครีบหางมีขนาดใหญ่แผ่กว้างเป็นครึ่งวงกลมทำมุม 180 ° ครีบทุกครีบมีขนาดสมส่วนกับลำตัว เมื่อมีการแผ่ครีบหางจะต่อเนื่องกับครีบหลังและครีบก้นเป็นลักษณะครึ่งวงกลม สีสันสวยงามบนลำตัวมีสีมากกว่า 1-2 สี และมีชื่อเรียกในทางการค้าแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสีสัน

บนลำตัวปลา เช่น ปลากัดบัตเตอร์ฟลาย (butterfly) หมายถึง ปลากัดที่มีโคนครีบด้านในเป็นสีหนึ่ง ขอบครีบด้านนอกเป็นสีขาวหรือสีใส และปลากัดดราก้อน (dragon) หมายถึง ปลากัดที่มีลำตัวสีขาวมีความเงาของเกล็ด และมีครีบเป็นสีอื่น เช่น สีแดง สีส้ม สีเหลือง หรือครีบสีดำ เป็นต้น (ประภาศ, 2553) ต่อมามีการพัฒนารูปแบบครีบของปลากัดในลักษณะต่างๆ โดยนักเพาะพันธุ์ชาวสิงคโปร์ได้พัฒนาปลากัดคราวเทล หรือ ปลากัดหางมงกุฎ จากการผสมพันธุ์ระหว่าง ปลากัดหนามเตย กับ ปลากัดหางสามเหลี่ยม หรือ ปลากัดฮาฟมูน มีลักษณะหางเป็นช่อคล้ายมงกุฎ ก้านหางแตก (สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, 2559)



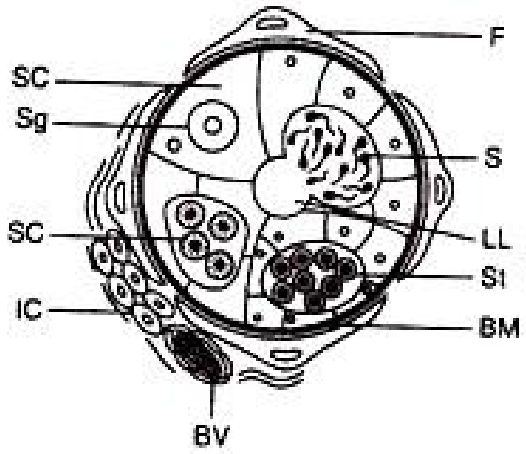
ภาพที่ 2.1 ปลากัดครีบสั้น (A) และ ปลากัดครีบยาวหรือปลากัดฮาฟมูน (B)

2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลา

อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลา (gonad) อยู่บริเวณด้านข้างตอนบนของช่องท้องโดยอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลามีจุดกำเนิดและมีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์โดยมีการพัฒนา 2 ขั้นตอน คือ เนื้อเยื่อบริเวณด้านข้างเป็นส่วนของเปลือก (cortex) พัฒนากลายเป็นสันตามยาวของผนังช่องท้องและเจริญเป็นส่วนของรังไข่ (ovary) เนื้อเยื่อบริเวณส่วนกลาง (medulla) เจริญเป็นส่วนของอัณฑะ (testis) (วิมล,2528) การสืบพันธุ์ในปลาเกิดจากการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ฤดูกาล แสง อุณหภูมิน้ำ กระแสน้ำ และ ปริมาณน้ำฝน ทำหน้าที่กระตุ้นสมองส่วนไฮโปทาลามัสให้หลั่ง gonadotropin releasing hormone (GnRH) จากนั้นส่งสัญญาณไปยังต่อมใต้สมองทำหน้าที่ควบคุมการหลั่งของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ คือ follicle stimulating hormone มีหน้าที่ควบคุมการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และการสะสมไข่แดงในปลาเพศเมีย และ luteinizing hormone ทำหน้าที่ควบคุมความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ (ธนาทิพย์, 2556)

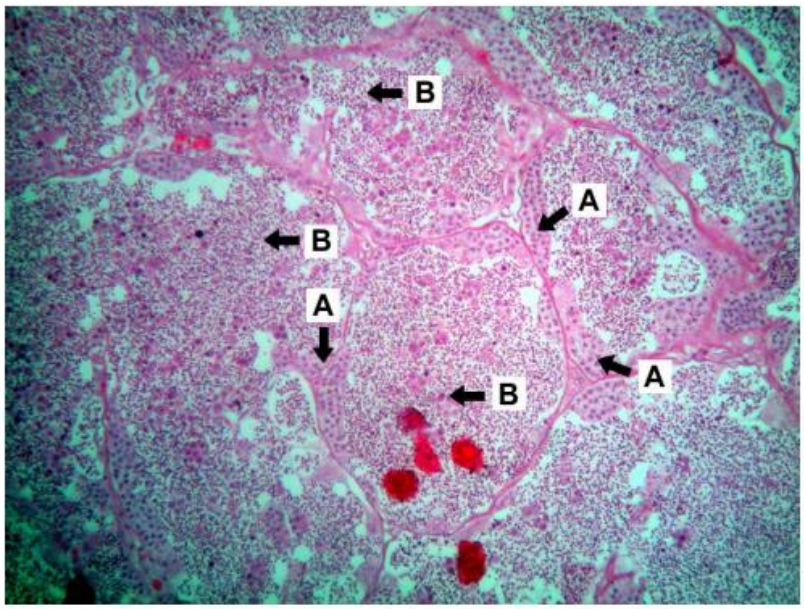
2.2.1 อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศผู้

อัณฑะ (testis) ลักษณะเป็นถุงมีสีอ่อน เรียบติดกับผนังด้านบนของไต หรืออยู่ใต้ถุงลมภายในถุงอัณฑะ ประกอบด้วย follicle ซึ่งมีหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เรียกกว่า spermatogenesis เกิดขึ้นภายใน spermatogonia โดยมีการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนี้ primary spermatocyte เป็นเซลล์ที่แบ่งตัวมาจาก spermatogonia ต่อมาเป็น spermatic เซลล์มีลักษณะเรียงกันเป็นแถว 4-5 แถว อยู่ถัดจาก primary spermatocyte มีนิวเคลียสลักษณะกลม และพัฒนาต่อมาเป็น spermatozoa ซึ่งเป็นการเปลี่ยนรูปร่างจาก spermatid เป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ (วิมล, 2528) spermatid เป็นเซลล์ที่มีการสร้าง flagella เพื่อกำจัดไซโตพลาสซึมและโครมาติน เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สมบูรณ์จะถูกปล่อยผ่านทาง urogenital pore (ธนาทิพย์, 2556) (ภาพที่ 2.2) ในการศึกษาทางพยาธิสภาพของอัณฑะปลาโดยการย้อมสี hematoxylin และ eosin stain (H&E) พบระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้น (primary spermatocyte) มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลมมองเห็นนิวเคลียส ย้อมติดสีเข้มอยู่ตรงกลางเซลล์ และเซลล์สืบพันธุ์ระยะปลาย (spermatozoa) พบ เซลล์อยู่บริเวณท่อน้ำเชื้อ มีลักษณะกลมหรือรีย้อมติดสีเข้มเป็นเซลล์ที่พัฒนาสมบูรณ์พร้อมปฏิสนธิ (เมธาและคณะ, 2556)



ภาพที่ 2.2 รูปแบบของท่ออัณฑะที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ basement membrane (BM), blood vessel (BV), fibroblast (F), interstitial cell (IC) lobular lumen (LL), sperm (S), spermatocyte (SC), spermatogonium (Sg), spermatid (St)

ที่มา : Jha (2014)

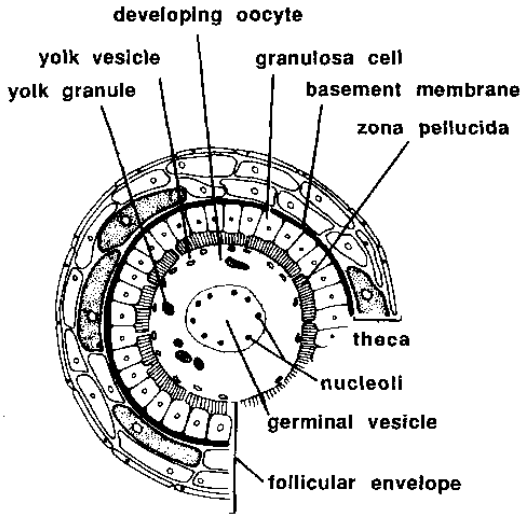


ภาพที่ 2.3 เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้น (A) และระยะปลาย (B) ภายในอัณฑะของปลากดแก้ว
ที่มา : เมธาและคณะ (2556)

2.2.2 อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศเมีย

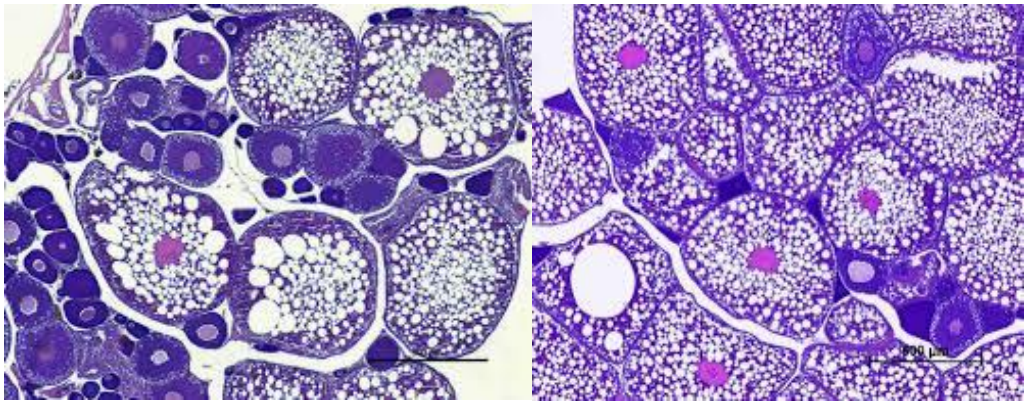
รังไข่ (ovary) มีลักษณะเป็นคู่ ยึดติดกับช่องท้อง บริเวณใต้ถุงลม ภายในประกอบด้วยถุงผลิตไข่เรียกว่า ovarian follicle พัฒนามาจาก germinal epithelium ในปลากระดูกแข็ง ผิวของถุงผลิตไข่จะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพียงชั้นเดียว ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีการพัฒนากลายเป็น theca ซึ่งเป็นเปลือกห่อหุ้มไข่ และเมื่อเซลล์ไข่สุกมีการขยายออกและเพิ่มจำนวนมากขึ้น เรียกว่า granular granulosa ถัดมาเป็นท่อนำไข่ (oviduct) มีลักษณะเป็นท่อปลายเปิด มีหน้าที่ผลิตสารสร้างเปลือกไข่ที่มีความแข็ง เช่น ไข่ปลาฉลาม และมีหน้าที่เก็บน้ำเชื้อตัวผู้ มีสารช่วยละลายเปลือกไฮยาลีนในปลาออกลูกเป็นตัว รังไข่ มีหน้าที่ในการผลิตไข่หรือเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ภายในรังไข่มีขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เรียกว่า oogenesis (วิมล, 2528) กระบวนการ oogenesis ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ proliferation of oocyte, oocyte growth, vitellogenesis และ oocyte maturation การพัฒนาเซลล์ไข่ถูกควบคุมด้วย follicle stimulating hormone ซึ่งมีกระตุ้นให้เกิดการสร้าง estradiol hormone เซลล์สืบพันธุ์ในปลาเพศเมียมีการแบบเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และขนาดของนิวเคลียส เซลล์ไข่ระยะเริ่มต้น (oogonium) มีการเปลี่ยนแปลงเป็น เซลล์ไข่ระยะที่ 1 (primary oocyte) (ธนาทิพย์, 2556) (ภาพที่ 2.4) จากการศึกษาทางพยาธิสภาพในเซลล์ไข่ปลาดุกโดยการย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin stain (H&E) มีความแตกต่างของระยะการพัฒนาเซลล์

ไข่ประกอบด้วย 6 ระยะ คือ ระยะที่ 1 พบเซลล์ oogonia อยู่บริเวณขอบเซลล์มีขนาดเล็กนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ย้อมติดสีชมพูของ eosin ระยะที่ 2 และ 3 พบว่า ไซโทรพลาสซึมภายในเซลล์ย้อมติดสีน้ำเงินของ hematoxylin ระยะที่ 4 เซลล์ไข่มีลักษณะเป็นทรงเหลี่ยมสีของนิวเคลียสและไซโทรพลาสซึมที่พบจากการย้อมสีจางลงซึ่งนิวเคลียสจะติดสีชมพู ระยะที่ 5-6 เป็นระยะที่พร้อมผสมพันธุ์วางไข่มี ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่และมีการสะสมของ yolk granules เพิ่มขึ้นและพบว่านิวเคลียสมีขนาดเล็กลงย้อมติดสีแดงจาก eosin (ชลอและคณะ, 2530) (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.4 การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในถุงผลิตไข่ (ovarian follicle)

ที่มา : Redrawn and Negahama (1978)



ภาพที่ 2.5 การศึกษาการพัฒนาเซลล์ไข่ของปลาสลิดแต่ละระยะทางพยาธิสภาพ

ที่มา ธนสรณ์และคณะ (2561)

2.2.3 การผสมพันธุ์และการวางไข่ของปลากัด

การผสมพันธุ์ปลากัดจำเป็นต้องคัดเลือกปลาที่สามารถนำมาใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ สังเกตจาก ปลากัดเพศผู้ มีลักษณะลำตัวสมบูรณ์ ไม่มีบาดแผลหรือแสดงอาการของโรค ขนาดครีบต้องสมดุลกับขนาดลำตัว โดยครีบหาง ครีบก้น และครีบหลัง ต้องไม่มีขนาดใหญ่หรือเล็กกว่าขนาดลำตัว สีสันสวยงาม ลักษณะปลาเพศเมีย สังเกตจาก บริเวณท้องมีลักษณะกลมนูน ลำตัวไม่มีบาดแผล มีจุดไข่นำบริเวณใต้ท้องระหว่างครีบอก โดยปลากัดสามารถสืบพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดทั้งปีซึ่งปลากัดเพศเมียสามารถวางไข่ได้เฉลี่ยปีละ 7-8 ครั้ง ในการผสมพันธุ์ ปลากัดเพศผู้มีหน้าที่สร้างรังหรือหวอด ลักษณะเป็นฟองอากาศเรียงกันอย่างหนาแน่นสำหรับเก็บรักษาไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจนถึงการฟักของลูกปลา ในการสร้างหวอดของปลาเพศผู้พบว่ามีการหลั่งสารที่ใช้ดึงดูดปลาเพศเมียและกระตุ้นให้ปลาเพศเมียมีความพร้อมในการผสมพันธุ์ เรียกว่า steroid glucuronide (Srikrishnan et al., 2017) ในปัจจุบันเกษตรกรมีวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัด คือ ใช้ภาชนะขนาดเล็กเป็นภาชนะเพาะพันธุ์ เช่น อ่างดินเผา กะละมัง ขันพลาสติก และ บ่อขนาดเล็ก ภายในภาชนะเพาะพันธุ์นิยมใส่ใบไม้ กระถางดินเผา หรือ พันธุ์ไม้น้ำ เพื่อเป็นวัสดุยึดเกาะในการสร้างหวอด นำปลากัด เพศผู้ใส่ลงในภาชนะเพาะพันธุ์และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิท นาน 4-5 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำปลากัดเพศเมียใส่ลงในภาชนะเพาะพันธุ์ นิยมใส่ปลากัดเพศเมียในช่วงเวลา 17.00-18.00 น. เนื่องจากเป็นการลดเวลาไม่ให้ปลากัดเพศเมียมีอาการบอบช้ำจากการผสมพันธุ์ หลังจากใส่ปลากัดเพศเมียปิดภาชนะเพาะพันธุ์ 3 วัน เพื่อให้ปลาผสมพันธุ์วางไข่ เมื่อครบ 3 วัน นำปลากัดเพศเมียออกจากภาชนะเพาะพันธุ์เพื่อให้ปลากัดเพศผู้อนุบาลลูกปลาจนครบ 7 วัน และนำปลากัดเพศผู้ออกจากภาชนะเพาะพันธุ์ ทำการอนุบาลลูกปลากัดในบ่อปูนซีเมนต์ความจุมากกว่า 100 ลิตร ใช้ไรแดงหรือไข่ตุ๋นในการอนุบาลลูกปลากัดเป็นเวลา 2 เดือน หรือลูกปลามีความยาว 3 เซนติเมตรขึ้นไป จึงนำลูกปลากัดมาคัดแยกเพศ (ประภาศ, 2553)

2.3 อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา

การสืบพันธุ์ในปลาขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของปลา อายุ ขนาดของพ่อแม่พันธุ์ปลาในแต่ละชนิด และสิ่งแวดล้อม เมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสม ปลามีความพร้อมในการผสมพันธุ์วางไข่ ระบบประสาทจะส่งสัญญาณไปยังสมองส่วน hypothalamus ให้สร้าง gonadotropin releasing hormone (GnRH) เพื่อไปกระตุ้นการทำงานของต่อมใต้สมองที่มีหน้าที่ผลิตฮอร์โมน gonadotropin ไปกระตุ้นการทำงานของรังไข่และอัณฑะ ซึ่งในทางกลับกันถ้าสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสม

ขบวนการนี้จะหยุดลงชั่วคราวโดยมี dopamine ซึ่งเป็น inhibilary factor เข้ามายับยั้งการทำงานของการสืบพันธุ์ (เกรียงศักดิ์, 2549) ธนาทิพย์ (2556) กล่าวว่า ปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ช่วงแสง ฤดูกาล ปริมาณธาตุอาหารในน้ำ ส่งผลต่อความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลาซึ่งเป็นการกระตุ้นจากสิ่งแวดล้อมภายนอกให้เกิดการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ เป็นการกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเพศผู้และการสร้างไข่ในปลาเพศเมีย

2.3.1 ช่วงแสงที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา

แสงมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงฤดูกาลตามธรรมชาติที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลาโดยแสงตามธรรมชาติที่มีความยาวของช่วงเวลากลางวันและไม่มีการเปลี่ยนแปลงของช่วงแสงจะชักนำให้เกิดการสืบพันธุ์ในปลาร้อยละ 100 ซึ่ง การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของแสงส่งผลต่อกระบวนการ และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Migaud et al., 2006) จากการทดลองของ Biswas et al. (2005) ทดลองช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลานิล พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 14L:10D (14 ชั่วโมงสว่าง: 10 ชั่วโมงมืด) 18L:6D (18 ชั่วโมงสว่าง: 6 ชั่วโมงมืด) และ 12L:12D (12ชั่วโมงสว่าง: 12 ชั่วโมงมืด) ส่งผลต่อ การสืบพันธุ์ ความดกไข่ และขนาดไข่ เนื่องจาก แสงส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมน estrogen และ testosterone ซึ่งฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิดมีบทบาทในการกระตุ้นกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดงในปลาเพศเมีย ส่งผลต่อขนาดไข่ จากการทดลองของ Giannecchini et al. (2012) ศึกษาช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลากัด พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 16L:8D (16 ชั่วโมงสว่าง: 8 ชั่วโมงมืด) และ 12L:12D (12 ชั่วโมงสว่าง: 12 ชั่วโมงมืด) ส่งผลต่อการสืบพันธุ์วางไข่ในปลากัดมากที่สุด เนื่องจาก การสืบพันธุ์วางไข่ในปลากัดเป็นผลจากฮอร์โมน melatonin โดยมีการหลั่ง ในช่วงเวลากลางคืน ส่งผลต่อต่อม hypothalamus ให้มีการกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ไข่ในรังไข่ปลาเพศเมียและกระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในปลาเพศผู้ ขนาดของไข่ปลา มีการอธิบายว่าไข่ปลามีขนาดเล็กแต่หากมีปริมาณไข่แดงมากบ่งบอกได้ว่าปลาอยู่ในภาวะเจริญพันธุ์ จากการศึกษาของ Howell et al. (2003) ศึกษาการเลียนแบบช่วงแสงตามธรรมชาติ (Simulated natural; SNP) และการให้แสงสว่างยาวนานขึ้น (Accelerated long day; ALD) จากการใช้หลอดไฟ fluorescent ความเข้มแสง 350 ลักซ์ ที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา black sea bass (*Centropristis striata*) พบว่า SNP และ ALD ไม่ส่งผลต่อ ความดกไข่ ขนาดไข่ และ น้ำหนักไข่ ในปลา black sea bass เพศเมีย แต่ ALD สามารถเร่งให้เกิดการสืบพันธุ์และวางไข่ได้เร็วขึ้นแต่ไม่ส่งผลต่อเกิดการพัฒนาเซลล์ไข่ในปลา black sea bass เพศเมีย

2.3.2 อุณหภูมิที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา จากการศึกษาของ Haung and Fang (2006) ทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการสืบพันธุ์นอกฤดูกาลของปลาพาราไดซ์ (*Macropodus opercularis*) พบว่า อุณหภูมิที่ 27ºC ปลาพาราไดซ์เพศผู้มีการสร้างหวอดขนาดใหญ่และมีอัตราการฟักมากที่สุด เนื่องจาก หวอดขนาดใหญ่มีประสิทธิภาพการรับออกซิเจนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีอัตราการฟักเพิ่มตามไปด้วย โดยการสร้างหวอดจัดเป็นพฤติกรรมที่สามารถบ่งบอกได้ว่าปลาพาราไดซ์ มีความพร้อมในการผสมพันธุ์ อุณหภูมิที่ 27ºC จึงมีความเหมาะสมต่อการสืบพันธุ์นอกฤดูกาลของปลาพาราไดซ์ ซึ่งอุณหภูมิเฉลี่ยในฤดูกาลการสืบพันธุ์ตามธรรมชาติของปลาพาราไดซ์ อยู่ระหว่าง 24.2-29.3ºC การสร้างหวอดในปลาพาราไดซ์ เพศผู้กับอุณหภูมิน้ำสูงขึ้นมีความสัมพันธ์ในเชิงลบ คือ อุณหภูมิน้ำเพิ่มขึ้นการสร้างหวอดจะลดลง จากการทดลองของ Levy et al. (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ในปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) โดยในธรรมชาติปลากลุ่มนี้วางไข่ในอุณหภูมิสูง ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิส่งผลต่อระดับฮอร์โมน พบว่า อุณหภูมิ 27ºC ส่งผลให้ระดับ mRNA ใน gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone และ growth hormone เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิเป็นปัจจัยกระตุ้นทำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนและมีผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเพศเมีย จากการทดลองของ Jaroensutasinee and Jaroensutasinee (2001) ศึกษาอุณหภูมิน้ำต่อการสร้างหวอดในปลากัดตามธรรมชาติ พบว่า อุณหภูมิน้ำที่ 29-30ºC ส่งผลให้ปลากัดเพศผู้มีความถี่ใน การสร้างหวอดและหวอดมีขนาดใหญ่ ความกว้าง 46.8 มิลลิเมตร ความยาว 71.3 มิลลิเมตร สามารถรองรับจำนวนไข่ปลากัดได้มาก ในขณะที่ปลากัดเพศเมียมีการวางไข่เพิ่มขึ้น และอัตราการรอดของลูกปลาเพิ่มขึ้นในอุณหภูมิดังกล่าว

2.3.3 ความเป็นกรด–ด่างของน้ำ (pH) ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา

pH ของน้ำจัดเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อพฤติกรรมการสืบพันธุ์รวมถึงการอพยพย้ายถิ่นเพื่อการสืบพันธุ์ ซึ่งค่า pH ของน้ำมีความสัมพันธ์กับตัวแปรคุณภาพน้ำ คือ free CO_2 และค่าความเป็นด่างในน้ำ โดย pH ของน้ำสามารถเปลี่ยนแปลงได้จากหลายสาเหตุ เช่น ฤดูกาล ปริมาณน้ำฝน และสารเคมีจากอุตสาหกรรมที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำในธรรมชาติ ส่งต่อกระบวนการสืบพันธุ์และอัตราการรอดของปลา จากการทดลองของ Ikuta et al. (2000) ศึกษา pH ของน้ำต่อระบบสืบพันธุ์ในปลา พบว่า pH ที่มีความเป็นกรดสูงส่งผลต่อสรีรวิทยาในปลาทำให้มีระดับ cortisol ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นก่อให้เกิดความเครียดและระบบภูมิคุ้มกันในปลาลดต่ำลง ในระบบสืบพันธุ์ พบว่า

pH ที่มีความเป็นกรดส่งผลให้ระดับ plasma ใน sex steroids มีระดับสูงกว่าปกติทำให้กระบวนการสืบพันธุ์หยุดชะงักลง และพบว่าในปลาแซลมอนเมื่อระดับ pH ระหว่าง 5.8-6 ส่งผลต่อพฤติกรรมการวางไข่และการอพยพย้ายถิ่น ซึ่งปลาแซลมอนมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาของ Mount (1973) ศึกษา pH ของน้ำที่มีความเป็นกรดส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในปลา fathead minnows (*Pimephales promelas*) พบว่าที่ pH 4.5-5.2 ส่งผลให้การพัฒนาไข่และอัตราการฟักในปลา fathead minnows ลดลงและมีความผิดปกติของไข่ปลาที่ได้รับการปฏิสนธิโดยไข่ปลา fathead minnows ใน pH 4.5-5.2 มีสีซีดเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและส่งผลให้ปริมาณไข่ในปลา fathead minnows เพศเมียลดลงเนื่องจากปลา fathead minnows ไม่สามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะความเป็นกรดได้ จากการศึกษาของ Vuorinen et.al (1990) ทำการเลี้ยงปลา whitefish (*Coregonus wartmani*) ใน pH 5.75 และ 4.75 พบว่า pH ทั้งสองระดับ ส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ในปลา whitefish เพศเมียอ่อนแอและมีการวางไข่ช้าลงโดย pH 4.75 ไข่ปลา whitefish มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับชุดควบคุม จากการศึกษาของ Baldisserotto (2011) กล่าวว่า ปลาน้ำจืดสามารถดำรงชีวิตและสืบพันธุ์ได้ ที่ pH 6-8 หาก pH มีค่าความเป็นกรดมากทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เนื่องจาก ปริมาณเม็ดเลือดและของเหลวในร่างกายมีการเพิ่มขึ้นส่งผลต่ออัตราการรอดในปลาน้ำจืด

2.4 ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลา

การกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อม (environmental sex determination; ESD) เป็นหนึ่งตัวอย่างที่เด่นชัดที่สุดของ สิ่งมีชีวิตที่มีจีโนไทป์เดียวกันแต่มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์ต่างกันเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน (phenotypic plasticity) โดย ESD สามารถกำหนดเพศในปลาได้ทั้งเพศผู้หรือ เพศเมียขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และสภาพแวดล้อมที่อยู่อาศัยในช่วงการพัฒนาตัวอ่อนในระยะแรก จากการทดลองของ Reddon and Peter (2013) ศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวกำหนดเพศในปลา คือ อุณหภูมิ และ ความเป็นกรด-ด่าง พบว่า อัตราส่วนเพศปลาที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่างกันสามารถบ่งบอกความสมบูรณ์ของระบบนิเวศนั้น เช่น ความอุดมสมบูรณ์ของแพลงตอนพืชและแพลงตอน จากการศึกษาของ Romer and Beisenherz (1996) ได้กล่าวว่า การกำหนดเพศในปลาเกิดขึ้นจากปัจจัยทางพันธุกรรม คือ จีโนไทป์ ที่สามารถกำหนดเพศในปลาหลายชนิด แต่การกำหนดเพศโดย ESD สามารถเกิดในปลาบางชนิดเท่านั้นซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการกำหนดเพศมากที่สุดคือ อุณหภูมิ และ ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

2.4.1 อุณหภูมิที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลา

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สามารถกำหนดเพศในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Brown et al., 2014) จากการทดลองของ Athauda et al. (2012) อุณหภูมิน้ำที่มีผลการกำหนดเพศในปลากะพงขาว โดยใช้ปลากะพงขาวอายุ 14 เดือน เลี้ยงอุณหภูมิต่างกัน คือ 22, 25, 28, 31 และ 34 ºC นาน 1 เดือน พบว่า การทำงานของเอมไซน์ aromatase ซึ่งเป็นเอมไซน์ตั้งต้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนในอวัยวะสืบพันธุ์ปลาเพศเมีย มีการเพิ่มขึ้นทุกชุดการทดลอง อุณหภูมิ 31 และ 34ºC มีการทำงานของเอมไซน์ aromatase มากที่สุด ส่งผลให้อุณหภูมิ 31 และ 34ºC มีปลากะพงขาวเพศเมียมากที่สุด จากการทดลองของ Patino et al. (1996) ศึกษาการผลของอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงอวัยวะสืบพันธุ์ในปลากดอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) เลี้ยงปลากดอเมริกันในอุณหภูมิต่างกัน คือ 20, 27 และ 34ºC พบว่า อุณหภูมิที่ 34ºC มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตรา ส่วนเพศเมีย มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 1:1.68 เนื่องจาก ปัจจัยที่ส่งผลต่อการกำหนดเพศ ในปลากดอเมริกัน คือ ปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม คือ อุณหภูมิ ต่อมา Zhang et al. (2016) ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศและอัตราการเจริญเติบโตในลูกปลากด 3 ชนิด คือ *Pelteobagrus fulvidraco, P. vachelli* และ hybrids (*P. fulvidraco* x *P. vachelli*) เลี้ยงในอุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 20 , 23, 26, 29, 31 และ 34 ºC นาน 45 วัน พบว่าลูกปลา *P. fulvidraco* อุณหภูมิไม่มีผลต่อการกำหนดเพศในลูกปลากดทั้ง 3 ชนิด แต่จากการศึกษาของ Cheng et al. (2007) และ Lin and You (2004) รายงานว่า ปลากด (*P. vachelli*) มีอัตราส่วนเพศแตกต่างกันในอุณหภูมิ 30-32ºC โดยมีลูกปลากดเพศผู้ร้อยละ 78-83 จากการทดลองของ Luckenbach et al. (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลาซีกเดียว ทำการเลี้ยงลูกปลาซีกเดียวในอุณหภูมิต่างกัน คือ 18, 23 และ 28ºC พบว่า อุณหภูมิ 18ºC ส่งผลให้มีอัตราเพศผู้ร้อยละ 78 ของประชากรทั้งหมด และอุณหภูมิ 28ºC พบว่ามีอัตราส่วนเพศผู้ร้อยละ 96 ซึ่งมากกว่าอุณหภูมิที่ 18ºC จากการทดลองของ Wang et al. (2014) ศึกษาอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศในปลา bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) พบว่า อุณหภูมิ 29 และ 34ºC มีอัตราส่วนเพศผู้ร้อยละ 70.64 และ 66.67 ตามลำดับ เนื่องจาก อุณหภูมิมีส่วนในการกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลาซึ่งบางสายพันธุ์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมส่งผลให้มีลูกปลาเพศผู้มากกว่าเพศเมีย แต่การกำหนดเพศในปลา bluegill sunfish ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมตามกฎของ Haldane คือ เมื่อมีการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของปลาส่งผลให้เกิดการขาดหายหรือลดลงของลูกปลาเพศใดเพศหนึ่ง

2.4.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลา

pH ของน้ำถือเป็นปัจจัยที่สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการกำหนดเพศในปลา ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา Romer and Beisenherz (1996) กล่าวว่า จีโนไทป์ สามารถกำหนดเพศปลาหลายๆชนิดได้ แต่ การกำหนดเพศจากสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้ในปลาบางชนิด จากผลการทดลอง พบว่า อุณหภูมิสูง และ pH ในน้ำมีความเป็นกรด ส่งผลให้มีอัตราส่วนเพศผู้ของลูกปลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมสามารถกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในลูกปลาช่วง 0-35 วันหลังจากการฟักต่อมา Reddon and Peter (2013) ศึกษา pH ของน้ำที่มีผลต่ออัตราส่วนเพศในปลาหมอสี (*Pelvicachromis puloher*) โดยกำหนด pH ต่างกัน 2 ระดับ คือ pH 5.5 และ 6.5 พบว่า pH ทั้ง 2 ระดับ มีอัตราส่วนลูกปลาหมอสีเพิ่มขึ้นแต่ pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้มากกว่าที่ pH 6.5 โดย pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้ 13 ตัวจาก 18 ตัว เนื่องจาก pH ของน้ำเป็นปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในปลาซึ่งมีผลต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์ของปลาหมอสี จากการทดลองของ Baroiler and Cotta (2001) ศึกษาสิ่งแวดล้อมและการกำหนดเพศของปลา เปรียบเทียบระดับ pH ต่างกัน 2 ระดับ คือ pH 4.5 และ 6.5 พบว่าปลาในกลุ่ม Apistogramma มีอัตราส่วนเพศผู้มากที่สุด จากการทดลองของ Rubin (1985) ศึกษาเลี้ยงปลาหมอสี 5 สายพันธุ์ คือ *Pelvicachromis pulcher, P. laemiatus, P.subcellatus, Apistopramma borell* และ *A. caucaloides* โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในระดับ pH ต่างกันคือ pH ต่ำ ดังนี้ 5.05, 5.40, 5.50, 5.80, 5.80 และ 6.20 และ pH กลาง คือ 6.90, 7.00, 7.00, 7.10, 7.10 และ 7.80 พบว่า ใน pH ต่ำลูกปลาหมอสีมีอัตราส่วนเพศผู้ร้อยละ 87-100 ส่วนช่วง pH เป็นกลางมีอัตราส่วนเพศผู้ร้อยละ 3-20

2.5 ใบหูกวางต่อการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม

ต้นหูกวาง (*Terminalia catappa*) เป็นไม้ยืนต้นที่สามารถพบได้ในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และไทย มีลำต้นสูง 15- 20 เมตร (พรพิมลและคณะ, 2560) โดยส่วนของผลและใบหูกวางมีคุณสมบัติสามารถสกัดเป็นยาสมุนไพรใช้ในอาหารเสริมสำหรับมนุษย์มีผลช่วยต้านอนุมูลอิสระ และใบหูกวางสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม ซึ่งมีผลต่อคุณภาพน้ำและอัตราการรอดของลูกปลา (Rajesh et al., 2016)

2.5.1 สารแทนนินในใบหูกวาง

แทนนิน (tannin) เป็นสารพฤกษเคมีชนิดหนึ่งในใบหูกวาง สามารถพบได้ในใบหูกวางสด หรือใบหูกวางแห้ง และในพืชชนิดอื่น เช่น ใบชา ใบฝรั่ง เปลือกมังคุด และใบตองแห้ง มีฤทธิ์เป็นกรดอ่อนและมีรสฝาด สามารถละลายได้ดีในน้ำ แอลกอฮอล์ และ อะซิโตน โดยสารแทนนิน แบ่งออกเป็น 2 รูปแบบ คือ hydrolysable tannins และ condensed tannins มีความแตกต่างกัน ทางองค์ประกอบของโครงสร้าง hydrolysable tannins เป็นสารแทนนินที่มีน้ำตาลกลูโคส เป็นองค์ประกอบ และ condensed tannins เป็นสารแทนนินที่มีสภาพคงตัว สามารถพบได้ในลำต้น หรือ เปลือกไม้ จากการทดลองของพรพิมลและคณะ (2560) ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบหูกวางทั้งใบหูกวางแห้งและใบหูกวางสด พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวางสดประกอบด้วย เถ้า เซลลูโลส ลิกนิน เพนโตรซาน และสารแทนนินที่มีปริมาณร้อยละ 12.6 ส่วนใบหูกวางแห้งประกอบด้วย รูติน ไอโซเคอร์ซิตริน ทองแดง สังกะสี และพบปริมาณ สารแทนนินมากกว่าใบหูกวางสดโดยพบร้อยละ 16.7 สอดคล้องกับการทดลองของสมจินตนา และ วรวัต (2560) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีในใบหูกวางที่มีลักษณะใบสีแดงเข้ม พบว่า ในใบหูกวางประกอบด้วย เถ้า เซลลูโลส ลิกนิน เพนโตรซาน ฟลาโวนอย์ ซาโปนิน ไตรเทอร์พีน และพบสารแทนนินร้อยละ 12.67 และจากการทดลองของ Rajesh et al. (2016) ศึกษาการสกัดสารพฤกษเคมีจากลำต้นหูกวาง ใบหูกวาง และผลหูกวาง โดยใช้สารสกัดต่างกันคือ petroleum ether, chloroform, methanol และ น้ำ พบว่า การใช้น้ำในการสกัดสารพฤกษเคมีในใบหูกวางและลำต้นนั้น ทำให้ได้สารแทนนินออกมามากที่สุดโดยพบปริมาณสารแทนนิน 258.5 ppm ในใบหูวาง 1 กรัม

2.5.2 ประโยชน์ของใบหูกวางต่อ คุณภาพน้ำ การยับยั้งแบคทีเรีย และอัตราการรอดของปลา

ในทางการประมงสารแทนนินถูกนำมาใช้ในด้านการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม คุณภาพน้ำ และมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำ Min et al. (2008) ทำการศึกษาเปรียบเทียบฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของสารสกัดแทนนินจากใบหูกวาง พบว่า การใช้สารแทนนินบริสุทธิที่ 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* จากการทดลองของ Nugroho et al. (2016) ศึกษาผลของสารสกัดจากใบหูกวางส่งผลต่อคุณภาพน้ำและอัตราการรอดในลูกปลากัด โดยใช้สารสกัดใบหูกวางที่ 125, 250, 375, 500 และ 625 ppm พบว่า การใช้สารสกัดใบหูกวางปริมาณ 375 ppm ส่งผลให้มีอัตราการรอดของลูกปลากัดสูงขึ้น เนื่องจาก สารพฤกษเคมีในใบหูกวางช่วยเสริมภูมิคุ้มกันในลูกปลาได้มากขึ้น จากการทดลองของ Chansue and Nongnut (2008) ศึกษาสารสกัดจากใบหูกวางที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียและความเป็นพิษในปลา พบว่า สารสกัดจากใบหูกวาง

0.8-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้แก่ *Aeromonas hydrophila, Aeromonas sobria, Pseudomonas aeruginosa*, และ *Pseudomonas oryzihabitans* และการใช้สารสกัดใบหูกวาง 97.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ส่งผลให้เกิดการตายร้อยละ 50 มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง มีการอธิบายว่า สารสกัดจากใบหูกวางจะมีความเป็นพิษมากน้อยขึ้นอยู่กับชนิดสัตว์น้ำโดยในปลาหางนกยูงสารสกัดจากใบหูกวางมีความเป็นพิษมากกว่าการใช้ในปลาคาร์พและปลากัดซึ่งความเป็นพิษของสารสกัดใบหูกวางส่งผลให้มีการเชื่อมติดกันของเหงือกปลาทำให้ขาดออกซิเจนและมีการตายของเนื้อเยื่อ จากการทดลองของ Chitmanat et al. (2005) ทำการศึกษาการใช้สารสกัดจากใบหูกวางในการต้านเชื้อแบคทีเรีย พบว่า ค่า MIC ของสารสกัดจากใบหูกวางสามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสารแทนนินยังส่งผลต่อระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในน้ำโดยสารแทนนินที่ความเข้มข้นที่ 6.0-10.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จะทำให้คุณภาพน้ำมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น จากการทดลองของ ศิวพงษ์และคณะ (2561) ศึกษาการใช้สารสกัดจากใบหูกวางต่อการยับยั้งการเกิดโรคในปลากัด พบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดใบหูกวางที่ 1 กิโลกรัมต่อน้ำ 2.5 ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในสัตว์น้ำ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

พ่อแม่ปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (ฮาฟมูน) อายุ 12 สัปดาห์ สภาพแข็งแรงไม่มีอาการติดเชื้อโรค จำนวน 200 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากัด แชมป์ฟาร์ม ตำบล โพรงมะเดื่อ อำเภอ เมือง จังหวัด นครปฐม

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการทดลอง

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับควบคุมอุณหภูมิ ได้แก่ เครื่องทำความร้อน เครื่องปรับอากาศ เครื่องวัดอุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด ตู้ปลาขนาด 16 นิ้ว ภาชนะเพาะพันธุ์ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร แก้วพลาสติกปริมาตร 1 ลิตร ผ้าคลุมตู้ปลาสีดำความยาว 1 เมตร และบ่อปูนซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตรสำหรับอนุบาลลูกปลากัด

3.2.2 อุปกรณ์การควบคุมช่วงเวลาให้แสง ได้แก่ หลอดไฟ LED กันน้ำ 6500K ความเข้มแสง 680 ลักซ์ เครื่องตั้งเวลา กล่องกระดาษขนาด 27x43 เซนติเมตร ตู้ปลาปริมาตร 50 ลิตร ถาดหลุมพลาสติก ภาชนะเพาะพันธุ์ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร แก้วพลาสติกปริมาตร 1 ลิตร และ ผ้าคลุมตู้ปลาสีดำความยาว 2 เมตร

3.2.3 อุปกรณ์และสารเคมีการวิเคราะห์สารแทนนินในใบหูกวางแห้ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ใบหูกวางแห้ง เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง โถดูดความชื้น เครื่องอบอุณหภูมิ 60 °C หลอดทดลอง ไมโครปิเปตขนาด 1,000 ไมโครลิต และเครื่องวัดการดูดกลืนแสง สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สารแทนนินประกอบด้วย กรดแทนนิค 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร sodium carbonate 35% และ folin-ciocalteu's phenol reagent

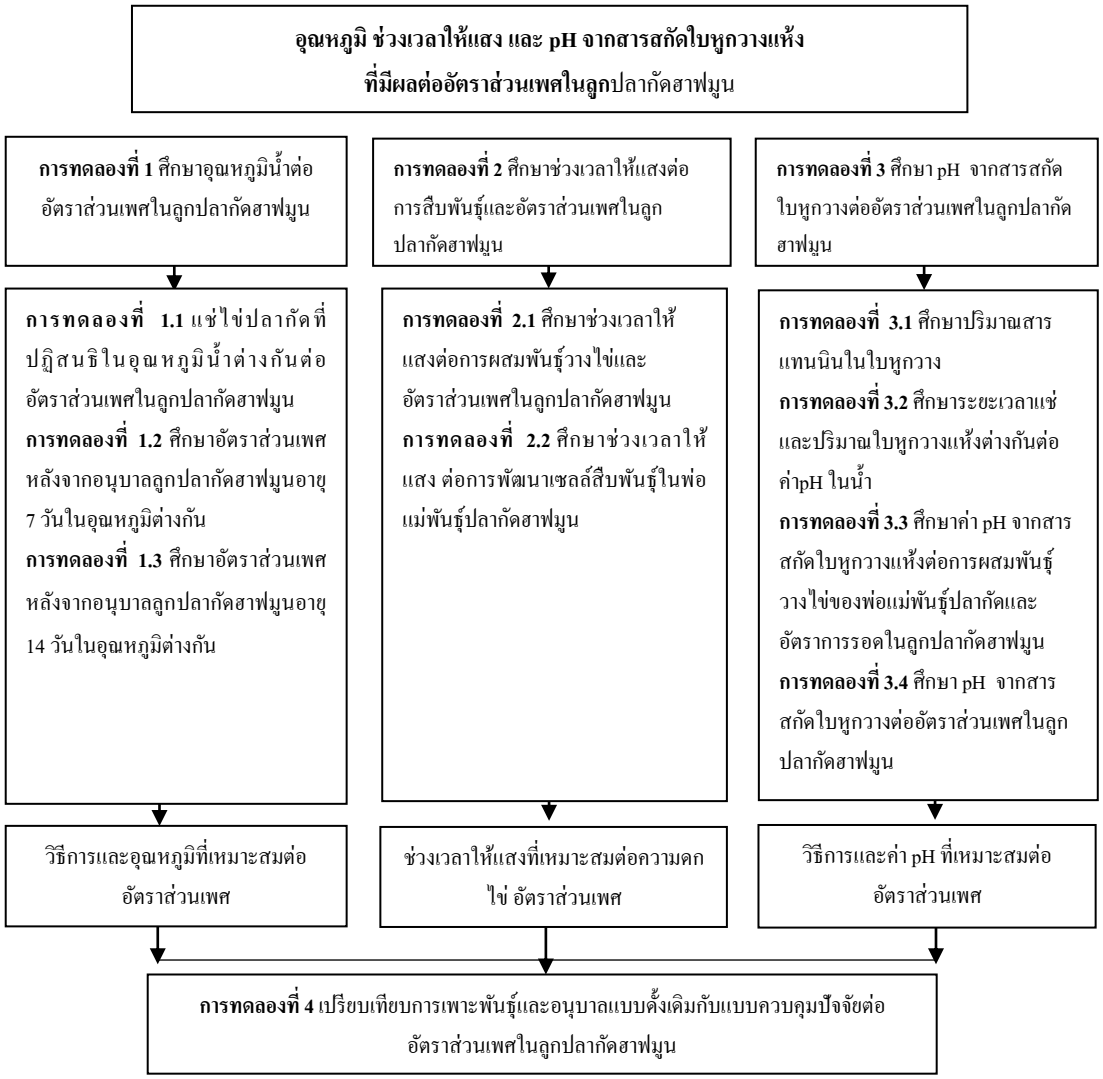
3.2.4 อุปกรณ์การเพาะพันธุ์ปลากัดโดยการแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน ได้แก่ ใบหูกวางแห้ง เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ตาข่ายไนลอนขนาด 15x15 เซนติเมตร ภาชนะเพาะพันธุ์ทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร กระบอกตวงขนาด 1 ลิตร และบ่อปูนซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตรสำหรับอนุบาลลูกปลากัด

3.2.5 อุปกรณ์และสารเคมีในการศึกษาทางพยาธิสภาพ ได้แก่ เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ตลับใส่ชิ้นเนื้อเยื่อ ชุดเครื่องมือผ่าตัด เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (tissue processor) ชุดย้อมสี

สไลด์ แผ่นสไลด์ และ กล้องจุลทรรศน์ สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางพยาธิสภาพ คือ น้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ Bouin's solution แอลกอฮอล์ 70% สีสำหรับการย้อมเนื้อเยื่อ hematoxylin และ eosin stain (H&E)

3.3 แผนผังการทดลอง เรื่อง ผลของอุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อม 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน หลังจากนั้นนำผลการทดลองที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดเปรียบเทียบกับวิธีการเพาะพันธุ์ปลากัดแบบดั้งเดิมของเกษตรกร ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แผนผังการทดลองผลของอุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4 วิธีการดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ดังนี้

3.4.1 การทดลองที่ 1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4.1.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design (CRD) ปัจจัยที่ศึกษา คือ การแช่ไข่ปลากัดที่ปฏิสนธิในอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูนได้แก่ 24-25°C, 30-31°C, 32- 33°C และ 34-35°C แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 แช่ไข่ปลากัดที่อุณหภูมิน้ำ 28-29°C (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 แช่ไข่ปลากัดที่อุณหภูมิน้ำ 24-25°C

ชุดการทดลองที่ 3 แช่ไข่ปลากัดที่อุณหภูมิน้ำ 30-31°C

ชุดการทดลองที่ 4 แช่ไข่ปลากัดที่อุณหภูมิน้ำ 32- 33°C

ชุดการทดลองที่ 5 แช่ไข่ปลากัดที่อุณหภูมิน้ำ 34-35°C

ระยะเวลาในการทดลอง 2 เดือน

3.4.1.2 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.75±0.12 กรัม และ ปลากัดเพศเมีย 1.23±0.22 กรัม นำมาเลี้ยงในแก้วพลาสติกขนาดบรรจุ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิปกติ คือ 28-30ºC วัดค่าอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศทุกวันด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด ให้หนอนแดงที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยด่างทับทิมความเข้มข้น 100 ppm เป็นเวลา 4-5 นาที เป็นอาหารทุกวัน วันละ 1 มื้อ ในช่วงเวลา 9.00-10.00 น. และเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 100 ทุก 2 วัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

3.4.1.3 การเตรียมตู้ปลาสำหรับวางภาชนะเพาะพันธุ์เพื่อกระตุ้นการฟักไข่ด้วยอุณหภูมิ ใช้ตู้ปลาขนาด 16 นิ้ว บรรจุน้ำปริมาตร 30 ลิตร ติดตั้งเครื่องทำความร้อนและเครื่องวัดอุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด กำหนดอุณหภูมิเครื่องทำความร้อนที่ 30-31, 32- 33 และ 34-35°C

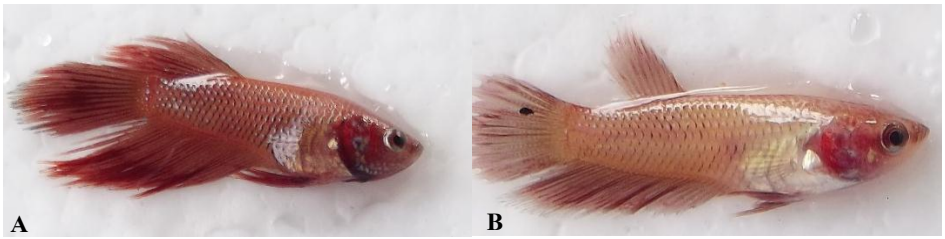
3.4.1.4 นำปลาเพศผู้ย้ายลงภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 0.5 ลิตร ภายในภาชนะเพาะพันธุ์ใส่ใบหูกวางแห้ง 1 ใบ ขนาด 3 x 4 เซนติเมตร เป็นวัสดุยึดเกาะในการสร้างหวอดของปลาเพศผู้ ซึ่งเป็นวิธีการเพาะพันธุ์ของเกษตรกร จากนั้นนำภาชนะเพาะพันธุ์ย้ายลงตู้ปลาขนาด 16 นิ้ว ดังข้อ 3.4.1.3 โดยภาชนะเพาะพันธุ์ลอยอยู่บริเวณผิวน้ำภายในตู้ปลา มีภาชนะเพาะพันธุ์จำนวน 5 ใบต่อตู้ และชุดการทดลองอุณหภูมิ 24-25°C ทำการเตรียมภาชนะเพาะพันธุ์ในห้องที่มีเครื่องปรับอากาศ ปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเช่นกัน

3.4.1.5 เมื่อครบ 4 ชั่วโมงนำปลาเพศเมียลงภาชนะเพาะพันธุ์ที่อยู่ภายในตู้ปลาและคลุมตู้ปลาด้วยผ้าสีดำให้มืดสนิททิ้งไว้ 3 วัน เมื่อครบ 3 วัน นำปลาเพศเมียออก สังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว มีลักษณะกลม มีสีขาวขุ่น วัดอุณหภูมิน้ำในตู้ปลาและทำการเปิดเครื่องทำความร้อนและเครื่องปรับอากาศเพื่อใช้อุณหภูมิตามที่กำหนดในการฟักไข่ปลากัด เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง

3.4.1.6 เมื่อครบ 8 ชั่วโมง ปิดเครื่องทำความร้อนในตู้ปลา และปิดเครื่องปรับอากาศจากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ต่ออีก 5 วันเพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา

3.4.1.7 เมื่อครบ 5 วัน นำลูกปลาอนุบาลในบ่อปูนซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เติมน้ำปริมาตร 50 ลิตร อนุบาลลูกปลาด้วยไรแดง วันละ 2 มื้อ ช่วงเวลา 9.00 และ 18.00 น. และเพิ่มระดับน้ำภายในบ่อปูนซีเมนต์ทุก 1 สัปดาห์

3.4.1.8 ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ พร้อมกับทำการแยกเพศลูกปลาจากลักษณะภายนอกเมื่อครบ 6 สัปดาห์ โดยสังเกตลักษณะปลากัดเพศผู้และเพศเมียได้จากครีบต่างๆ สีสันบนลำตัวปลา และขนาดลำตัว ซึ่งปลากัดเพศผู้ครีบหางและครีบก้นมีความยาวมากกว่าปลากัดเพศเมีย สีสันสดใส ลำตัวเรียวยาว ซึ่งปลากัดเพศเมียสังเกตได้จากจุดไข่นำที่มีลักษณะเป็นจุดสีขาวบริเวณใต้ท้องระหว่างครีบอก (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ความแตกต่างระหว่าง (A) ลูกปลากัดเพศผู้ และ (B) ลูกปลากัดเพศเมีย

3.4.2 การทดลองที่ 1.2 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 7 วันในอุณหภูมิต่างกัน

3.4.2.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงลูกปลาอายุ 7 วันในอุณหภูมิน้ำปกติ (28-29 ºC)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงลูกปลาอายุ 7 วันในอุณหภูมิ 30 ºC ระยะเวลา 14 วัน

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงลูกปลาอายุ 7 วันในอุณหภูมิ 32 ºC ระยะเวลา 14 วัน

ระยะเวลาในการทดลอง 2 เดือน

3.4.2.2 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.35±0.16 กรัม และ ปลากัดเพศเมีย 1.12±0.06 กรัม นำมาเลี้ยงในแก้วพลาสติกขนาดบรรจุ 1 ลิตร ที่อุณหภูมิปกติคือ 28-30ºC โดยมีการวัดค่าอุณหภูมิน้ำและอุณหภูมิอากาศทุกวันด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิสูงสุด-ต่ำสุด และให้อาหารตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.2

3.4.2.3 เมื่อครบ 1 สัปดาห์ทำการจับคู่พ่อแม่พันธุ์ปลากัดทั้งหมด 15 คู่ จากนั้นย้ายปลาเพศผู้ลงภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร นำแผ่นกระเบื้องปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อให้ปลาเพศผู้สร้างหวอดและพร้อมสืบพันธุ์

3.4.2.4 เมื่อครบ 4 ชั่วโมงปล่อยปลากัดเพศเมียลงภาชนะเพาะพันธุ์ที่มีปลาเพศผู้อยู่ จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 3 วัน

3.4.2.5 เมื่อครบ 3 วัน เปิดภาชนะเพาะพันธุ์นำปลาเพศเมียออกสังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลาที่มีลักษณะกลม มีสีขาวขุ่นบนหวอด และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา

3.4.2.6 เมื่อครบ 5 วัน นำปลาเพศผู้ออกจากภาชนะเพาะพันธุ์และนำลูกปลาย้ายลงบ่อปูนซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เติมน้ำ ปริมาตร 50 ลิตร ลงในบ่ออนุบาลติดตั้งเครื่องทำความร้อน ปรับอุณหภูมิที่ 28ºC ทำการเพิ่มอุณหภูมิวันละ 1ºC ทุกวันจนอุณหภูมิน้ำอยู่ที่ 30 ºC และ 32 ºC โดยเลี้ยงปลาในอุณหภูมิที่กำหนดนานเวลา 2 สัปดาห์ มีการให้ไรแดงเป็นอาหารวันละ 2 มื้อในเวลา 9.00 และ 18.00 น. มีการดูดตะกอนภายในบ่ออนุบาลทุกสัปดาห์

3.4.2.7 ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ พร้อมกับทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.8

3.4.3 การทดลองที่ 1.3 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 14 วันในอุณหภูมิต่างกัน

3.4.3.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงลูกปลาอายุ 14 วันในอุณหภูมิน้ำปกติ (28-29 ºC)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงลูกปลาอายุ 14 วันในอุณหภูมิ 30 ºC ระยะเวลา 14 วัน

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงลูกปลาอายุ 14 วันในอุณหภูมิ 32 ºC ระยะเวลา 14 วัน

ระยะเวลาในการทดลอง 2 เดือน

3.4.3.2 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.35±0.16 กรัม และ ปลากัดเพศเมีย 1.12±0.06 กรัม นำมาเลี้ยงตามการทดลองที่ 1.2 ข้อ 3.4.2.2

3.4.3.3 เมื่อครบ 1 สัปดาห์ทำการจับคู่พ่อแม่พันธุ์ปลากัดทั้งหมด 15 คู่ จากนั้นย้ายปลาเพศผู้ลงภาชนะเพาะพันธุ์ตามการทดลองที่ 1.2 ข้อ 3.4.2.3 ปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมงเพื่อให้ปลาเพศผู้สร้างหวอดและพร้อมสืบพันธุ์

3.4.3.4 เมื่อครบ 4 ชั่วโมงปล่อยปลากัดเพศเมียลงภาชนะเพาะพันธุ์ที่มีปลาเพศผู้อยู่ จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 3 วัน

3.4.3.5 เมื่อครบ 3 วัน เปิดภาชนะเพาะพันธุ์นำปลาเพศเมียออกสังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลาที่มีลักษณะกลม มีสีขาวขุ่นบนหวอด และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา

3.4.3.6 เมื่อครบ 5 วัน นำปลาเพศผู้ออกจากภาชนะเพาะพันธุ์และนำลูกปลาย้ายลงบ่อปูนซีเมนต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80 เซนติเมตร เติมน้ำ ปริมาตร 50 ลิตร อนุบาลลูกปลากัดในบ่อที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิเมื่อลูกปลามีอายุครบ 14 วัน นำเครื่องทำความร้อนติดตั้งลงในบ่ออนุบาลปรับอุณหภูมิที่ 28ºC ทำการเพิ่มอุณหภูมิวันละ 1ºC ทุกวันจนอุณหภูมิน้ำอยู่ที่ 30ºC และ 32 ºC โดยเลี้ยงปลาในอุณหภูมิที่กำหนดนานเวลา 2 สัปดาห์ มีการให้อาหารตามการทดลองที่ 1.2 ข้อ 3.4.2.6

3.4.3.7 ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ พร้อมกับทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.8

การทดลองที่ 2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.4.4 การทดลองที่ 2.1 ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4.4.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ ช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน คือ ชุดควบคุม 0L:24D (ไม่ให้แสง) ซึ่งเป็นการเพาะพันธุ์แบบปกติของเกษตรกร 24L:0D (ให้แสง 24 ชั่วโมง) 8L:16D (ให้แสง 8 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 16 ชั่วโมง) 12L:12D (ให้แสง 12 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง) และ16L:8D (ให้แสง 16 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง) แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ 0L:24D (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ 24L:0D

ชุดการทดลองที่ 3 ผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ 8L:16D

ชุดการทดลองที่ 4 ผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ 12L:12D

ชุดการทดลองที่ 5 ผสมพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ 16L:8D

ระยะเวลาในการทดลอง 3 เดือน

3.4.4.2 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.45±0.04 กรัม และ ปลากัดเพศเมีย 1.05±0.11 กรัม จำนวน 25 คู่ นำปลาเพศผู้ใส่ในภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร ควบคุมช่วงเวลาให้แสง ที่ 24L:0D, 8L:16D, 12L:12D และ16L:8D ด้วยกล่องกระดาษขนาด 27x43 เซนติเมตร ติดตั้งหลอดไฟ ความเข้มแสง 680 ลักซ์ ควบคุมการปิดเปิดตามเวลาที่กำหนดด้วยเครื่องตั้งเวลา (ภาพที่ 3.3) เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

ภาพที่ 3.3 กล่องกระดาษขนาด 27x43 เซนติเมตร ติดตั้งหลอดไฟ LED กันน้ำ ความเข้มแสง 680 ลักซ์ ควบคุมการปิดเปิดตามเวลาที่กำหนดด้วยเครื่องตั้งเวลาใช้ในการเพาะพันธุ์

3.4.4.3 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ทำการจับคู่ผสมพันธุ์ตามช่วงเวลาให้แสงที่กำหนดในข้อ 3.4.3.1 ใช้เวลาในการเพาะพันธุ์ 7 วัน โดยเมื่อผ่านไป 3 วัน นำปลาเพศเมียออก สังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลากัดที่มีลักษณะกลม มีสีขาวขุ่น และ ทำการสุ่มนับจำนวนไข่โดยการนับจำนวนทั้งหมดของไข่ปลากัดที่อยู่บนหวอด และชั่งน้ำหนักไข่โดยนำไข่ปลากัดที่นับออกจากหวอดใส่ลงในบีกเกอร์บรรจุน้ำ 50 มิลลิลิตร เพื่อชั่งน้ำหนัก ใช้เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง เพื่อหาค่าความดกไข่ จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ต่ออีก 5 วันเพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา

3.4.4.4 เมื่อครบ 5 วัน นำปลาเพศผู้ออกจากภาชนะและสุ่มนับจำนวนลูกปลาที่ฟักเพื่อคำนวณหาอัตราการฟักของลูกปลากัดหลังจากนั้นทำการอนุบาลลูกปลาตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.7

3.4.4.5 ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์ พร้อมกับทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.8

3.4.5 การทดลองที่ 2.2 ช่วงเวลาให้แสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน

3.4.5.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ ช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดฮาฟมูนคือ ชุดควบคุม 0L:24D (ไม่ให้แสง), 24L:0D (ให้แสง 24 ชั่วโมง), 8L:16D (ให้แสง 8 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 16 ชั่วโมง), 12L:12D (ให้แสง 12 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง) และ16L:8D (ให้แสง 16 ชั่วโมง: ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง) แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสง 0L:24D (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสง 24L:0D

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสง 8L:16D

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสง 12L:12D

ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสง 16L:8D

ระยะเวลาในการทดลอง 2 สัปดาห์

3.4.5.2 เตรียมตู้ปลาขนาด 60.9x30.5x60.9 เซนติเมตร ปริมาตร 50 ลิตร ติดตั้งหลอดไฟความเข้มแสง 680 ลักซ์ และ เครื่องตั้งเวลาควบคุมการเปิดปิดไฟ โดยกำหนดช่วงเวลาให้แสงตามข้อ 3.4.4.1 จากนั้นวางถาดหลุมพลาสติกในตู้ปลาเพื่อเป็นฐานสำหรับใส่แก้วพลาสติกเลี้ยงปลาปริมาตรน้ำ 1 ลิตร (ภาพที่ 3.4)

ภาพที่ 3.4 ตู้ปลาขนาด 60.9x30.5x60.9 เซนติเมตร สำหรับการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงต่างกัน

3.4.5.3 ก่อนเริ่มทำการทดลองชั่งน้ำหนักพ่อแม่พันธุ์ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง นำพ่อแม่พันธุ์ใส่ลงในแก้วพลาสติกเติมน้ำ 0.5 ลิตร แก้วละ 1 ตัว และใส่ในตู้ปลาที่จัดเตรียมไว้ (ภาพที่ 3.4) เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงที่ต่างกันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ระหว่างการทดลองให้อาหารพ่อแม่พันธุ์ปลากัดตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.2

3.4.5.4 ชั่งน้ำหนักพ่อแม่พันธุ์เมื่อครบ 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการสลบปลาด้วยความเย็นและเปิดช่องท้องเพื่อเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ นำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 2 ตำแหน่ง เก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วยน้ำยา Bouin's solution ซึ่งประกอบด้วย picric acid 50 มิลลิลิตร , 40% formalin 250 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 50 มิลลิลิตร นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพเป็นแอลกอฮอล์ 70% เพื่อทำการศึกษาการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ทางพยาธิสภาพ

การทดลองที่ 3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากน้ำใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอดน้ำหนัก และความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย ดังนี้

3.4.6 การทดลองที่ 3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวางแห้ง

3.4.6.1 เตรียมสารมาตรฐานกรดแทนนิค ตามวิธีของ Saxena et al. (2013) ประกอบด้วย sodium carbonate 35%, folin-ciocalteu's phenol reagent และ สารละลายกรดแทนนิค ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยมีการเตรียมสารดังนี้ ชั่งสาร sodium carbonate 17.5 กรัม จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 70ºC คนจนสารละลายปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนจากนั้น

นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 การเตรียมสารละลายกรดแทนนิค ชั่งสารกรดแทนนิค 0.025 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายกรดแทนนิคออกมา 0.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกรดแทนนิคความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

3.4.6.2 วิเคราะห์สารมาตรฐานกรดแทนนิคที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใส่ใน volumetric flask ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสาร folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร และ sodium carbonate 35% 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร

3.4.6.3 นำใบหูกวางที่รวบรวมได้จาก แชมป์ฟาร์ม อำเภอ เมือง ตำบล โพรงมะเดื่อ จังหวัดนครปฐม ทำความสะอาดและตากแดดให้แห้งสนิท จากนั้นตัดให้มีขนาด 3 x 4 เซนติเมตร ทำการชั่งน้ำหนักใบหูกวางก่อนนำไปอบด้วยเครื่องอบที่อุณหภูมิ 60ºC นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำใบหูกวางชั่งน้ำหนักหลังอบและเก็บรักษาในโถดูดความชื้น

3.4.6.4 การเตรียมตัวอย่างใบหูกวางเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารแทนนิน โดยนำใบหูกวางที่อบแห้งขนาด 3 x 4 เซนติเมตร ชั่งที่ 0.25 , 0.5, 0.75 และ 1 กรัม ต้มในน้ำอุณหภูมิ 100ºC นาน 30 นาที จากนั้นกรองน้ำสารสกัดที่ได้และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร และนำมาใช้ 0.01 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองเติมสาร folin-ciocalteu's phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร และ sodium carbonate 35% 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 760 นาโนเมตร

3.4.7 การทดลองที่ 3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่า pH ในน้ำ

3.4.7.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยกำหนดปริมาณใบหูกวางที่ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม แช่ลงในน้ำ 1 ลิตร แบ่งออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง

ชุดการทดลองที่ 2 ใบหูกวางแห้ง 2.5 กรัมแช่ในน้ำ 1 ลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 ใบหูกวางแห้ง 5 กรัมแช่ในน้ำ 1 ลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 ใบหูกวางแห้ง 7.5 กรัมแช่ในน้ำ 1 ลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 ใบหูกวางแห้ง 10 กรัมแช่ในน้ำ 1 ลิตร

ระยะเวลาทำการทดลอง 24 ชั่วโมง

3.4.7.2 นำใบหูกวางอบแห้ง มาชั่งน้ำหนักที่ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม แช่ลงในน้ำ 1 ลิตร และทำการวัดค่า pH ทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 24 ชั่วโมง ทำการจดบันทึกผลและวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปเพื่อนำผลการศึกษามาใช้ในการทดลองที่ 4

3.4.8 การทดลองที่ 3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4.8.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน 5 ระดับได้แก่ ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง (ชุดควบคุม) 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม แช่ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราการรอดของลูกปลากัดฮาฟมูน แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 2.5 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 7.5 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร

ระยะเวลาในการทดลอง 1 เดือน

3.4.8.2 นำใบหูกวางแก่ร่วงจากต้นลักษณะใบมีสีน้ำตาลเข้ม ล้างทำความสะอาด ตากแดดจนแห้งและตัดให้มีขนาด 3x4 เซนติเมตร จากนั้นชั่งน้ำหนักใบหูกวางแห้งที่ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม แช่ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร นาน 15 ชั่วโมง (จากผลการทดลองที่ 3.2) เมื่อครบเวลาการแช่นำใบหูกวางแห้งออก วัดค่า pH ของน้ำและเก็บตัวอย่างน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาค่าความเป็นด่างและความกระด้างของน้ำ (ภาคผนวกข้อที่ 2 และ 3) ตามวิธีของ Mount (1973)

3.4.8.3 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.39±0.06 กรัม ปลากัดเพศเมีย 1.12±0.03 กรัม นำปลาเพศผู้ลงในภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง 1 ลิตร จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิททิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพและเตรียมความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลาเพศผู้

3.4.8.4 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง นำปลาเพศเมียลงภาชนะเพาะพันธุ์และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิททิ้งไว้ 1 วัน จากนั้นวัดค่า pH ของน้ำและปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 3 วัน เพื่อให้ปลาผสมพันธุ์

3.4.8.5 นำปลาเพศเมียออกจากภาชนะเพาะพันธุ์ ทำการนับจำนวนพ่อแม่พันธุ์ปลากัดที่มีการวางไข่เพื่อเก็บข้อมูลอัตราการวางไข่และวัดค่า pH ของน้ำเมื่อครบ 3 วัน ปิดภาชนะเพาะพันธุ์ทิ้งไว้ 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา

3.4.8.6 เมื่อครบ 5 วัน ทำการนับจำนวนพ่อแม่พันธุ์ปลากัด เพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอด หลังจากนั้นอนุบาลลูกปลากัดตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.7 และทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 7 และ 14 วัน

3.4.9 การทดลองที่ 3.4 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4.9.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD ปัจจัยที่ศึกษา คือ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน 5 ระดับ ได้แก่ ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง (ชุดควบคุม) 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัมแช่ในน้ำปริมาตร 1 ลิตร ต่ออัตราส่วนลูกปลากัดเพศผู้ แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลองละ 5 ซ้ำดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการแช่ใบหูกวางแห้ง (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 2.5 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 5.0 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 7.5 กรัม/ลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร

ระยะเวลาในการทดลอง 2 เดือน

3.4.9.2 นำใบหูกวางแห้งลักษณะตามการทดลองที่ 3.3 ข้อ 3.4.7.2 ล้างทำความสะอาดตากแดดจนแห้งและตัดให้มีขนาด 3x4 เซนติเมตร จากนั้นชั่งน้ำหนักใบหูกวางแห้งที่ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม ห่อด้วยตาข่ายไนลอนให้มีลักษณะคล้ายลูกประคบ (ภาพที่ 3.5)

ภาพที่ 3.5 การห่อใบหูกวางแห้งด้วยตาข่ายไนลอน

3.4.9.3 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.45 กรัม ปลากัดเพศเมีย 1.05 กรัม นำปลาเพศผู้ลงในภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร ใส่ใบหูกวางแห้ง 1 ใบขนาด 3x4 เซนติเมตร จากนั้นปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิททิ้งไว้ 4 ชั่วโมง เพื่อปรับสภาพและเตรียมความพร้อมในการผสมพันธุ์ของปลาเพศผู้

3.4.9.4 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง นำปลาเพศเมียลงภาชนะเพาะพันธุ์และวัดค่า pH ก่อนการผสมพันธุ์และปิดภาชนะเพาะพันธุ์ให้มืดสนิททิ้งไว้ 3 วันเพื่อให้ปลาผสมพันธุ์

3.4.9.5 นำปลาเพศเมียออกจากภาชนะเพาะพันธุ์เมื่อครบ 3 วัน สังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิ มีลักษณะกลมสีขาวขุ่นบนหวอด หลังจากนั้นวัดค่า pH ของน้ำก่อนแช่ใบหูกวางแห้งในภาชนะเพาะพันธุ์ที่มีปริมาณ 0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร นาน 15 ชั่วโมง (จากผลการทดลองที่ 3.2) ดังแสดงในภาพที่ 3.6 นำใบหูกวางแห้งออกและวัดค่า pH ของน้ำ

ภาพที่ 3.6 ลักษณะการแช่ใบหูแห้งที่ห่อด้วยตาข่ายไนลอนในภาชนะเพาะพันธุ์

3.4.9.6 เมื่อครบ 15 ชั่วโมง นำใบหูกวางแห้งออก และวัดค่า pH ของน้ำ และปิดภาชนะเพาะพันธุ์อีก 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา หลังจากนั้นทำการอนุบาลลูกปลากัดตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.7

3.4.9.7 ทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์พร้อมกับทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.8

3.4.10 การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

3.4.10.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองแบบ Independent sample t-test ทำการทดสอบเปรียบเทียบ 2 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ซ้ำ ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 การเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลากัดแบบดั้งเดิมไม่มีการกำหนดปัจจัยอื่นๆ (การผสมพันธุ์ในภาชนะเพาะพันธุ์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร ใบไม้ขนาดเล็ก และใบหูกวางแห้งขนาด 3x 4 เซนติเมตร 1 ใบ ปิดขันเพาะพันธุ์ให้มืดสนิทนาน 7 วัน)

ชุดการทดลองที่ 2 การเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลากัดแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ 30 ºC ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D และค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ ลิตร (ตามผลการทดลองที่ 1-3)

โดยทำการเพาะเลี้ยงปลากัด 2 รอบการผลิต รอบละ 3 เดือน ช่วงฤดูหนาว (พฤศจิกายน 2562 - มกราคม 2563) และ ช่วงปลายฤดูหนาว (ธันวาคม 2562 - กุมภาพันธ์ 2563)

3.4.10.2 คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากัด อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยปลากัดเพศผู้ 1.45±0.07 กรัม และ ปลากัดเพศเมีย 1.05±0.08 กรัม จำนวน 20 คู่ นำปลากัดเพศผู้ใส่ในภาชนะเพาะพันธุ์โดยใช้ขันพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร บรรจุน้ำ 1 ลิตร ทำการควบคุมช่วงเวลาให้แสง ตามผลการทดลองที่ 2 ระยะเวลา 4 ชั่วโมง

3.4.10.3 เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ทำการจับคู่ผสมพันธุ์ตามช่วงเวลาให้แสงที่กำหนด ภายในภาชนะเพาะพันธุ์ใส่ใบหูกวางขนาด 3x4 เซนติเมตร ใช้เวลาในการเพาะพันธุ์ 7 วัน โดยเมื่อผ่านไป 3 วัน นำปลาเพศเมียออก สังเกตบริเวณหวอดของปลาเพศผู้พบไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิ มีลักษณะกลม มีสีขาวขุ่น และทำการวัดค่า pH ก่อนการกระตุ้นการพัฒนาไข่ปลาด้วย pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง ปริมาณตามผลการทดลองที่ 3 โดยนำตาข่ายไนลอนห่อใบหูกวางแห้ง (ภาพที่ 3.5)

3.4.10.4 เมื่อครบเวลาการแช่นำใบหูกวางแห้งออก หลังจากนั้นวัดค่า pH ของน้ำและปิดภาชนะเพาะพันธุ์อีก 5 วัน เพื่อให้ปลาเพศผู้อนุบาลลูกปลา และทำการอนุบาลลูกปลากัดตามการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.7 ควบคุมอุณหภูมิตามผลการทดลองที่ 1 และทำการนับจำนวนลูกปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอดเมื่ออนุบาลครบ 2 สัปดาห์ และ 6 สัปดาห์พร้อมกับทำการแยกเพศจากลักษณะภายนอก เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ข้อ 3.4.1.8

3.5 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลทั้งหมดวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of variance) โดยการทดลองที่ 1 -4 เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple's range test (DMRT) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วย Independent sample t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

3.6.1 ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์การประมง ตึกเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6.2 แชมป์ฟาร์ม 80/3 หมู่7 ตำบล โพรงมะเดื่อ อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม

3.7 ระยะเวลาทำการทดลอง

พฤศจิกายน 2561 – กุมภาพันธ์ 2563

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ดังนี้

4.1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

หลังจากทดลองแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า อุณหภูมิอากาศในขณะทำการทดลองมีค่าเฉลี่ย 31.2±0.02ºC ส่วนอุณหภูมิน้ำในการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.6±0.24, 31.6±0.24, 32.6±0.24 และ35.4±0.24ºC ซึ่งอุณหภูมิมีความแตกต่างกัน ทำให้อัตราการรอดของลูกปลา มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนัก ความยาวลำตัว ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$)

อัตราการรอดเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ (ชุดควบคุม) ร้อยละ 83.67±17.43 อัตราการรอดสูงกว่าช่วงอุณหภูมิน้ำที่ 24-25 , 32-33, 30-31 ºC และ 34-35 ºC ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 48.28±20.03, 47.85±15.27, 50.88±14.94 และ 40.28±8.39

อัตราส่วนเพศผู้ในชุดการทดลองช่วงอุณหภูมิน้ำที่ 34-35ºC มีค่าร้อยละ 68.45±11.56 เนื่องจากอัตราการรอดต่ำที่สุดส่งผลให้จำนวนปลาที่สามารถแยกเพศได้มีน้อยลง รองลงมาคือชุดการทดลองควบคุม ช่วงอุณหภูมิที่ 24-25, 32-33 และ 30-31ºC

น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวของลูกปลากัด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง ($P>0.05$) ลูกปลากัดทุกชุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยระหว่าง 0.12-0.36 กรัม (g) ความยาวลำตัวเฉลี่ย 1.44-3.10 เซนติเมตร (cm) (ตารางที่ 4.1)

จากการทดลองครั้งนี้ พบว่า วิธีการแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิน้ำต่างกันไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัดและส่งผลให้มีอัตราการรอดลดลง ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ลูกปลากัดหลังจากการฟัก 7 และ 14 วัน นำมาทดลองผลของอุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูนโดยเลือกอุณหภูมิน้ำที่ 30 ºC และ 32 ºC ในการทดลองซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ส่งผลต่ออัตราการรอดน้อยที่สุด

ตารางที่ 4.1 ผลของอุณหภูมิน้ำในแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง				
	ชุดควบคุม (28-29 ºC)	24-25ºC	30-31ºC	32-33ºC	34-35ºC
อุณหภูมิอากาศ	31.2±0.2	31.2±0.2	31.2±0.2	31.2±0.2	31.2±0.2
อุณหภูมิน้ำ	28.4±0.24[a]	24.6±0.24[b]	31.6±0.24[c]	32.6±0.24[d]	35.4±0.24[e]
อัตราการรอด (%)	83.67±17.43[a]	48.28±20.03[b]	47.85±15.27[b]	50.88±14.94[b]	40.28±8.39[b]
เพศผู้ (%)	59.24±28.61	57.94±22.19	50.8±26.62	50.99±26.94	68.45±11.56
เพศเมีย (%)	40.75±28.61	42.05±16.71	49.2±12.35	49±35.28	31.55±9.66
น้ำหนัก (g)	0.36±0.09	0.12±0.07	0.19±0.09	0.30±0.08	0.19±0.06
ความยาวลำตัว (cm)	3.1±0.19	1.44±0.61	1.73±0.71	2.64±0.20	2.07±0.54

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.1.2 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 7 วัน ในอุณหภูมิต่างกัน

จากการทดลองอุณหภูมิน้ำส่งผลต่ออัตราการรอดและอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดอายุ 7 วัน พบว่า ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิอากาศระหว่างทดลอง เท่ากับ 30.2±0.02 ºC และค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำระหว่าการทดลอง คือ 28.4±0.31, 30.4±0.24 และ 32.0±0.0ºC ซึ่งไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวของลูกปลา (P>0.05)

หลังจากอนุบาลลูกปลากัดอายุ 7 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างของอัตราการรอดในลูกปลากัดระหว่างชุดการทดลอง โดยลูกปลากัดที่อนุบาลในอุณหภูมิน้ำ 30 ºC มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 87.11±6.60 รองลงมาคือ อุณหภูมิ 32ºC และชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 86.09±4.97 และร้อยละ 85.04±8.03 ตามลำดับ อัตราส่วนเพศผู้ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยอุณหภูมิ 30ºC มีอัตราส่วนเพศผู้เฉลี่ยร้อยละ 49.54±9.83

น้ำหนัก ความยาวลำตัวของลูกปลากัด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ลูกปลากัดทุกชุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยระหว่าง 0.33-0.36 กรัม ความยาวลำตัวเฉลี่ยระหว่าง 2.8-3.2 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.2) ซึ่งจากผลการทดลองนี้อุณหภูมิน้ำที่ 30ºC มีอัตราการรอดและ อัตราส่วนเพศผู้มากกว่าชุดการทดลองอื่น จึงนำอุณหภูมิน้ำที่ 30ºC ใช้ในการทดลอง

เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ ปลากัดแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

ตารางที่ 4.2 ผลของอุณหภูมิน้ำที่ต่างกันในการอนุบาลลูกปลากัดอายุ 7 วัน ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนัก ความยาวลำตัวลูกปลากัดฮาฟมูน เป็นเวลา 14 วัน

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม (28-29 ºC)	30ºC	32ºC
อุณหภูมิอากาศ	30.2±0.2	30.2±0.2	30.2±0.2
อุณหภูมิน้ำ	28.0±0.31[a]	30.4±0.24[b]	32.0±0.0[c]
อัตราการรอด (%)	85.04±8.03	87.11±6.60	86.09±4.97
เพศผู้ (%)	47.10±3.01	49.54±9.83	43.38±3.20
เพศเมีย (%)	52.90±3.01	56.62±3.20	50.46±9.80
น้ำหนัก (g)	0.34±0.02	0.36±0.02	0.33±0.03
ความยาวลำตัว (cm)	3.20±0.01	2.9±0.01	2.8±0.01

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.1.3 อัตราส่วนเพศหลังจากอนุบาลลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 14 วัน ในอุณหภูมิต่างกัน

หลังจากอนุบาลลูกปลากัดอายุ 14 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ไม่มีความแตกต่างของอัตราการรอดในลูกปลาระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) โดยลูกปลาที่อนุบาลในอุณหภูมิน้ำ 30ºC มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 92.92±2.02รองลงมาคือ ชุดควบคุมและอุณหภูมิน้ำ 32ºC มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 85.04±8.03 และร้อยละ 81.19±10.45

ผลการศึกษาอัตราส่วนเพศผู้ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีอัตราส่วนเพศผู้ทุกชุดการทดลองเฉลี่ยร้อยละ 38.93-47.10 พบว่า อัตราส่วนเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีอัตราส่วนเพศเมียทุกชุดการทดลองเฉลี่ยร้อยละ 52.90-61.06

น้ำหนัก ความยาวลำตัวของลูกปลากัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยชุดการทดลองอุณหภูมิน้ำ 32 ºC ลูกปลากัดมีน้ำหนัก และ ความยาวลำตัวเท่ากับ 0.54±0.05 กรัม และ 3.68±0.19 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิน้ำที่ต่างกันในการอนุบาลลูกปลากัดอายุ 14 วัน ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนัก ความยาวลำตัวลูกปลากัดฮาฟมูน เป็นเวลา 14 วัน

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง		
	ชุดควบคุม (28-29 ºC)	30ºC	32ºC
อุณหภูมิอากาศ	30.2±0.2	30.2±0.2	30.2±0.2
อุณหภูมิน้ำ	28.0±0.31[a]	30.4±0.24[b]	32.0±0.0[c]
อัตราการรอด (%)	85.04±8.03	92.92±2.02	81.19±10.45
เพศผู้ (%)	47.10±3.01	38.93±1.72	43.01±3.17
เพศเมีย (%)	52.90±3.01	61.06±1.72	56.99±3.17
น้ำหนัก (g)	0.34±0.02[a]	0.41±0.03[a]	0.54±0.05[b]
ความยาวลำตัว (cm)	3.20±0.11[a]	3.10±0.04[a]	3.68±0.19[b]

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย ดังนี้

4.2.1. ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

จากการทดลองเพาะพันธุ์ปลากัดในช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกัน โดยมีช่วงเวลาให้แสง 0L:24D เป็นชุดควบคุมเนื่องจากเป็นการเพาะพันธุ์แบบปกติของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากัด พบว่า จำนวนไข่น้ำหนักไข่ ความดกไข่ และอัตราการฟักของลูกปลากัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลอง (P<0.05) (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อ จำนวนไข่ น้ำหนักไข่ ความดกไข่ และ อัตราการฟัก ในลูกปลากัดฮาฟมูน

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง				
	0L:24D (ชุดควบคุม)	12L:12D	16L:8D	8L:16D	24L:0D
จำนวนไข่ (ฟอง)	1,002.5±1.98[a]	381.5±71.09 [bc]	53.0±17.08[d]	232.0±91.10[cd]	487.8±60.76[b]
น้ำหนักไข่ (กรัม/ตัว)	1.17±0.07[a]	0.73±0.06[b]	0.3±0.09[c]	0.21±0.14 [bc]	1.24±0.01[a]
ความดกไข่ (ฟอง/ตัว)	1,106.62±2.72[a]	293.52±70.23[c]	27.67±10.53[c]	116.25±57.44[c]	657.75±93.13[b]
อัตราการฟัก (%)	49.75±6.66 [a]	44.04±11.82 [a]	8.74±7.49[b]	8.56±3.84[b]	62.18±14.21[a]

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ผลการศึกษาจำนวนไข่ที่เพาะพันธุ์ในช่วงเวลาให้แสง 0L:24D มีค่าเฉลี่ยสูงสุด คือ 1,002.5±1.98 ฟอง (P<0.05) รองลงมา คือ ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D, 12L:12D, 8L:16D และ 16L:8D มีจำนวนไข่เฉลี่ย 487.8±60.76, 381.5±71.09, 232.0±91.10 และ 53.0±17.08 ฟอง ตามลำดับ

น้ำหนักไข่ปลากัดที่ได้จากการเพาะพันธุ์ในช่วงเวลาให้แสง 24L:0D มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักไข่ปลามากที่สุด คือ 1.24±0.01 กรัม/ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาให้แสง 0L:24D ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดที่ให้แสง 12L:12D, 8L:16D และ 16L:8D มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 0.73±0.06, 0.21±0.14 และ 0.3±0.09 กรัม/ตัว ตามลำดับ (P<0.05)

ผลของความดกไข่ในปลากัดเพศเมีย พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยช่วงเวลาให้แสง 0L:24D มีความดกไข่สูงสุด 1,106.62±2.72 ฟอง/ตัว รองลงมา คือ 24L:0D, 12L:12D, 16L:8D และ 8L:16D มีความดกไข่เฉลี่ย 657.75±93.13, 293.52±70.23, 116.25±57.44 และ 27.67±10.53 ฟอง/ตัว ตามลำดับ

ผลของอัตราการฟักเป็นตัวของลูกปลากัด พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดยช่วงเวลาให้แสง 24L:0D มีอัตราการฟักเฉลี่ยร้อยละ 62.18±14.21 รองลงมา คือ 0L:24D, 12L:12D, 16L:8D และ 8L:16D มีอัตราการฟักเฉลี่ยร้อยละ 49.75±6.66, 44.04±11.82, 8.74±7.49 และ 8.56±3.84 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองช่วงเวลาให้แสง 24L:0D มีจำนวนไข่ น้ำหนักไข่ ความดกไข่ และอัตราการฟัก ใกล้เคียงกับ ช่วงเวลาให้แสง 0L:24D (ชุดควบคุม) จึงเลือกช่วงเวลาให้แสงที่ 24L:0D ใช้ในการการทดลองเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

อัตราการรอดของลูกปลากัดจากการเพาะพันธุ์ในช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกัน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดย ช่วงเวลาให้ 0L:24D, 12L:12D, 24L:0D และ 16L:8D มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 92.78±2.64, 87.03±6.08, 91.69±2.54 และ71.23±9.89 ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับช่วงเวลาให้ 16L:8D ซึ่งมีอัตราการรอดเฉลี่ย ต่ำสุด คือ ร้อยละ 61.13±9.30 (ตารางที่ 4.5)

จากการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนในช่วงเวลาให้แสงต่างกัน พบว่า ช่วงเวลาให้ไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัด จากตารางที่ 4.5 อัตราส่วนเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง (P>0.05) โดยอัตราส่วนเพศผู้ที่ช่วงเวลาให้ 8L:16D คือ ร้อยละ 53.06±2.36 รองลงมาคือ ช่วงเวลาให้ 24L:0D, 0L:24D, 16L:8D และ 12L:12D มีอัตราส่วนเพศผู้ร้อยละ 49.45±2.94, 46.70±5.61, 39.89±9.69 และ 35.08±10.57 ตามลำดับ ผลของน้ำหนักและความยาวลำตัวของลูกปลากัด พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.17-0.33 กรัม และมีความยาวลำตัวเฉลี่ย 1.54-3.1 เซนติเมตร

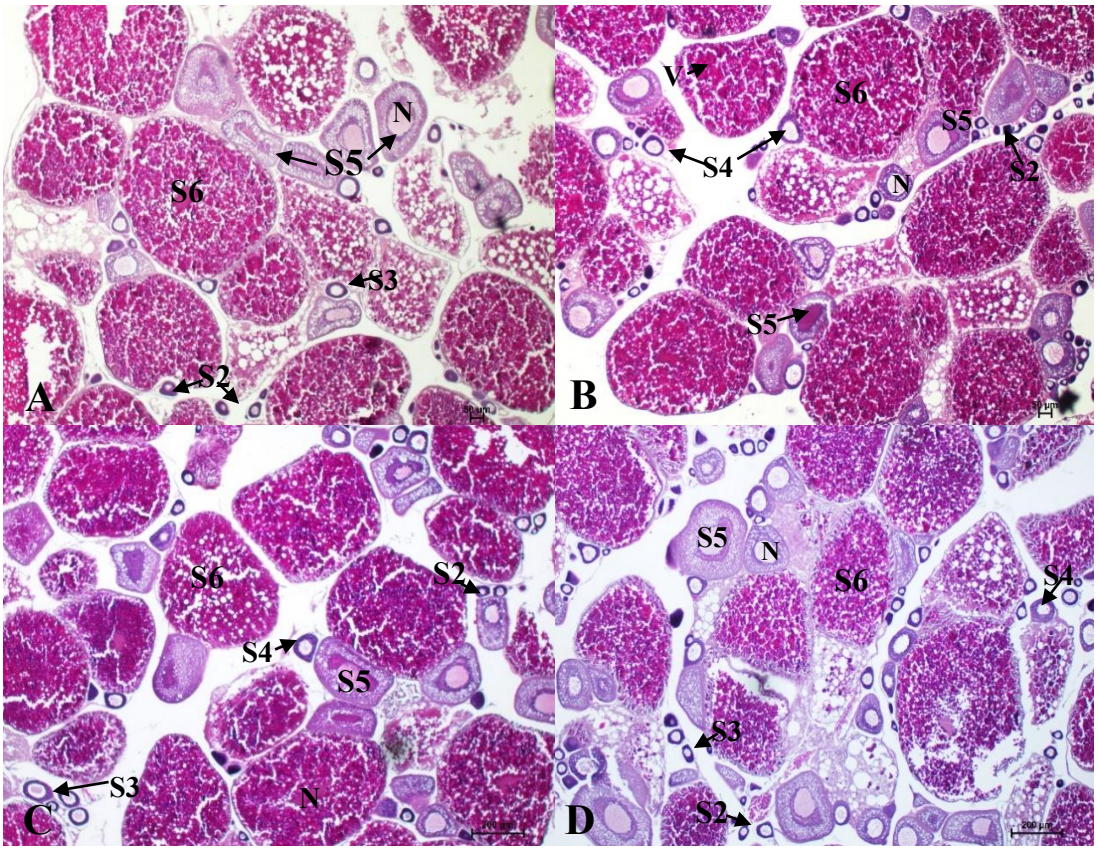
ตารางที่ 4.5 ผลของช่วงเวลาให้แสง ต่อ อัตราการรอด อัตราส่วนเพศ และ น้ำหนัก ความยาวลำตัว ใน ลูกปลากัดฮาฟมูน

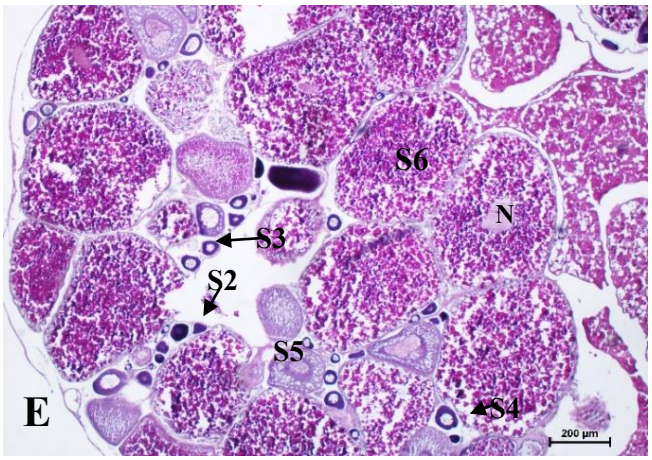
ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง				
	0L:24D (ชุดควบคุม)	12L:12D	16L:8D	8L:16D	24L:0D
อัตราการรอด (%)	92.78±2.64[a]	87.03±6.08[a]	71.23±9.89[ab]	61.13±9.30[b]	91.69±2.54[a]
เพศผู้ (%)	46.7±5.61	35.08±10.57	39.89±9.69	53.06±2.36	49.45±2.94
เพศเมีย (%)	53.23±5.61	64.78±10.46	60.11±9.69	43.52±4.39	50.75±2.94
น้ำหนัก (g)	0.33±0.09	0.21±0.09	0.24±0.08	0.17±0.06	0.19±0.07
ความยาวลำตัว (cm)	3.1±0.19	1.63±0.51	2.24±0.20	2.02±0.34	1.54±0.61

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

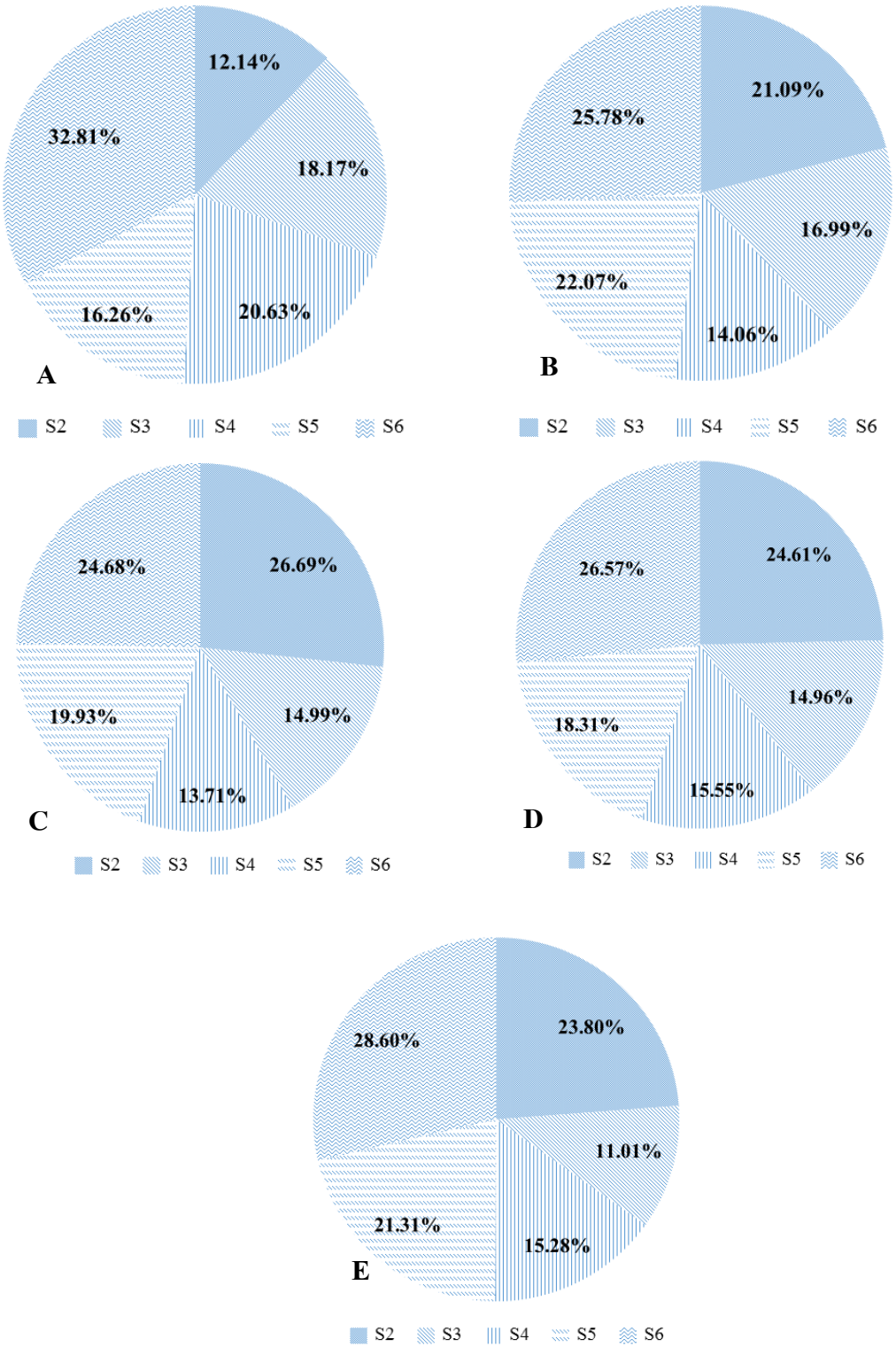
4.2.2 ผลของช่วงเวลาให้แสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน

การศึกษาช่วงเวลาให้แสง ต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดเพศเมีย จากการศึกษาทางพยาธิสภาพมีการย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) พบว่า ระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ในปลากัดเพศเมียสามารถแบ่งออกได้ 5 ระยะ คือ ระยะที่ 2-6 (S2-S6) โดยพบเซลล์ไข่ระยะที่ 2 -6 ในทุกชุดการทดลอง เซลล์ไข่ที่พบมากที่สุด คือ ระยะที่ 5 และ 6 (S5, S6) เป็นระยะที่พร้อมสืบพันธุ์และวางไข่ มีลักษณะเด่นชัดในระยะที่ 5 คือ บริเวณไซโตพลาสซึม ย้อมติดสีน้ำเงินของ hematoxylin นิวเคลียส (N) ย้อมติดสีชมพูของ eosin ลักษณะเด่นระยะที่ 6 คือ ในไซโตพลาสซึม พบ yolk granules (V) ย้อมติดสีชมพูเข้มของ eosin และมีจำนวนมากกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม นิวเคลียสมีขนาดเล็กย้อมติดสีชมพูอ่อน (ภาพที่ 4.1) จากภาพที่ 4.2 แสดงจำนวนเซลล์ไข่แต่ละระยะ พบว่าช่วงเวลาให้แสง 0L:24D (ชุดควบคุม) มีเซลล์ไข่ระยะที่ 6 มากที่สุดคือร้อยละ 32.81±3.20 รองลงมาคือ ช่วงเวลาให้ 24L:0D , 8L:16D, 12L:12D และ 16L:8D โดยมีเซลล์ไข่ระยะที่ 6 ร้อยละ 28.60±3.20, 26.57±3.20, 25.68±3.20 และ 24.57±3.20 ตามลำดับ



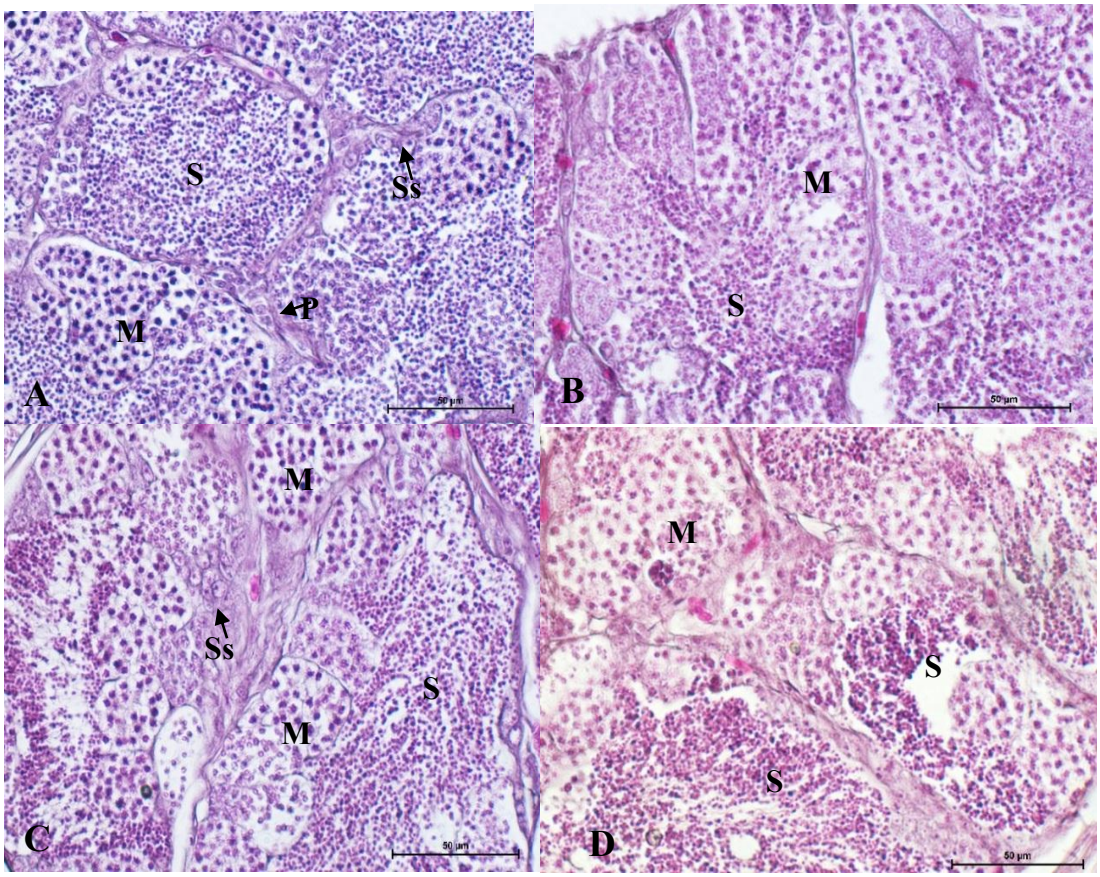


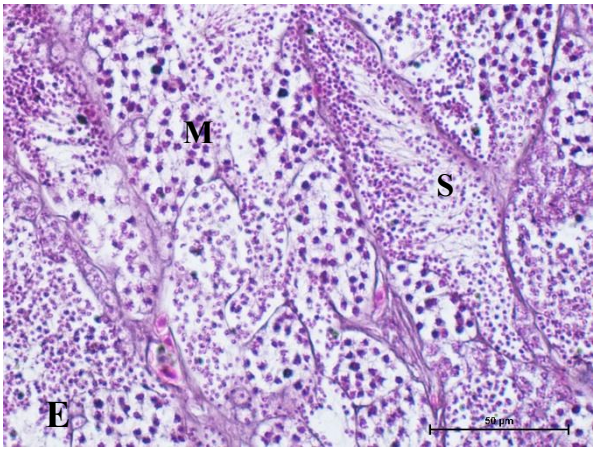
ภาพที่ 4.1 การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศเมียช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ได้แก่ (A) 0L:24D (ชุดควบคุม), (B) 12L:12D, (C) 16L:8D, (D) 8L:16D และ (E) 24L:0D. oocyte stage 2 (S2), oocyte stage 3 (S3), oocyte stage 4 (S4), oocyte stage 5 (S5), oocyte stage 6 (S6), yolk granules (V) และ nuclear (N)



ภาพที่ 4.2 จำนวนเซลล์ไข่แต่ละระยะที่พัฒนาในช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกัน ได้แก่ (A) 0L:24D (ชุดควบคุม), (B) 12L:12D, (C) 16L:8D, (D) 8L:16D และ (E) 24L:0D. oocyte stage 2 (S2), oocyte stage 3 (S3), oocyte stage 4 (S4), oocyte stage 5 (S5), oocyte stage 6 (S6)

จากภาพที่ 4.3 ศึกษาช่วงเวลาให้แสง ที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดเพศผู้ พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ primary spermatocytes (P), secondary spermatocytes (Ss), spermatids (M) และ spermatozoa (S) โดยมีลักษณะแตกต่างกัน ดังนี้ primary spermatocytes ลักษณะที่พบ คือ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เมื่อย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) จะติดสีชมพูเข้ม secondary spermatocytes นิวเคลียสมีขนาดเล็กลงย้อมติดสีน้ำเงินเข้มของสี hematoxylin ผนังเซลล์บางส่วนหายไป spermatids สามารถเห็นได้เพียงนิวเคลียสมีรูปร่างกลมและมีขนาดเล็กกระจายอยู่ใน seminiferous tubules และ spermatozoa มีลักษณะเป็นจุดขนาดเล็กย้อมติดสีน้ำเงินกระจายอยู่ตามบริเวณส่วนกลางของ seminiferous tubules ซึ่งสามารถพบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ได้ทุกระยะในทุก ชุดการทดลอง





ภาพที่ 4.3 การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศผู้ช่วงเวลาให้แสงแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ได้แก่ (A) 0L:24D (ชุดควบคุม), (B) 12L:12D, (C) 16L:8D, (D) 8L:16D และ(E) 24L:0D. primary spermatocytes (P), secondary spermatocytes (Ss), spermatids (M) และ spermatozoa (S)

4.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย ดังนี้

4.3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวาง

จากตารางที่ 4.6 สารแทนนินจากใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันที่สกัดด้วยน้ำ มีปริมาณสารแทนนินในใบหูกวางแห้ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปริมาณสารแทนนินเพิ่มขึ้นตามปริมาณใบหูกวางแห้ง ปริมาณใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร มีค่าสารแทนนินสูงสุด 943 ppm รองลงมาคือ ใบหูกวางแห้ง 7.5, 5.0 และ 2.5 กรัม/ลิตร มีปริมาณสารแทนนิน 816, 314 และ 178 ppm ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวางแห้ง

ปริมาณใบหูกวางแห้ง กรัม/ลิตร	สารแทนนิน (ppm)
0.0	0.0 ± 0.00^{a}
2.5	178 ± 0.01^{b}
5.0	314 ± 0.01^{c}
7.5	816 ± 0.01^{d}
10.0	943 ± 0.01^{e}

หมายเหตุ ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$

4.3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่า pH ในน้ำ

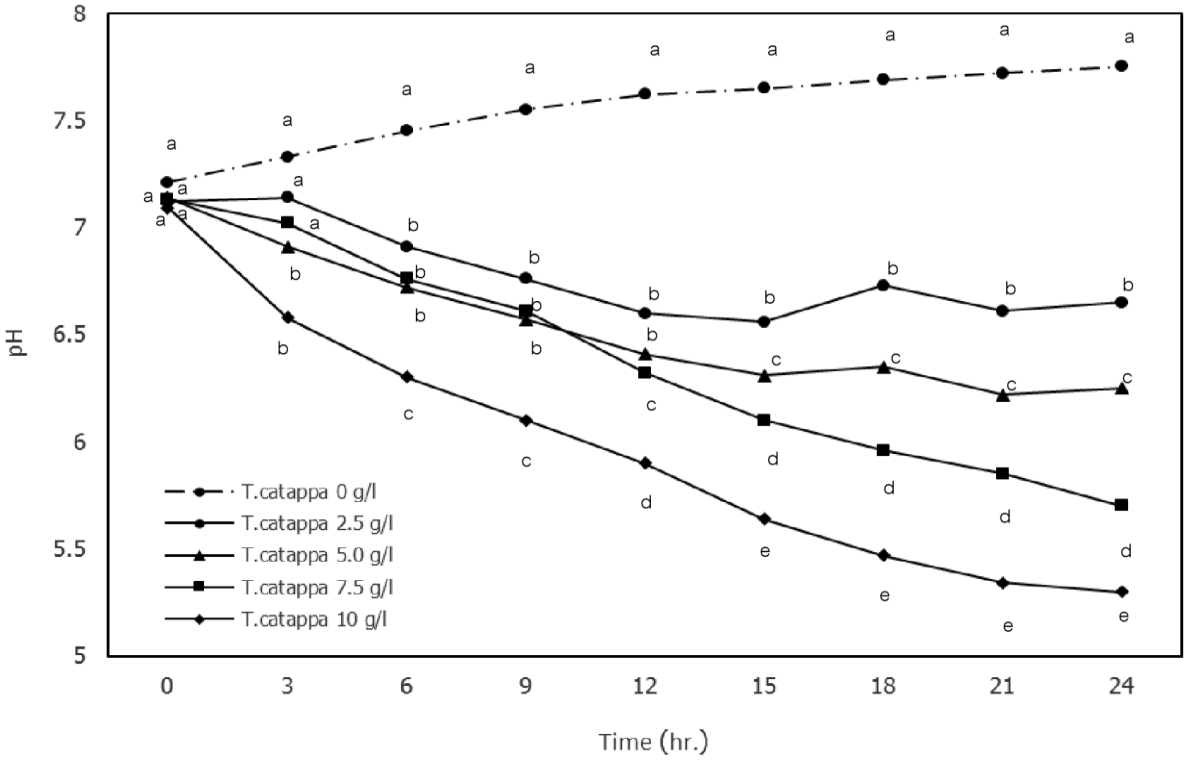
จากการทดสอบแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH เฉลี่ยเริ่มต้นที่ pH 7.21±0.05 พบว่า ปริมาณใบหูกวางแห้งที่ 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 6.65±0.08, 6.25±0.05, 5.70±0.08 และ 5.30±0.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) และเมื่อปริมาณใบหูกวางแห้งเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ปริมาณใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร มีการลดลงของค่า pH ตั้งแต่เวลา 3 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเฉลี่ย pH 5.30±0.05 ซึ่งมีความเป็นกรดมากที่สุด อาจกล่าวได้ว่า เมื่อปริมาณใบหูกวางแห้งและเวลาการแช่ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH ลดลง

ตารางที่ 4.7 การแช่ใบหูกวางแห้งในน้ำ 1 ลิตร ระยะเวลา 24 ชั่วโมงต่อค่า pH ในน้ำ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณใบหูกวางแห้ง (กรัม/ลิตร)				
	0	2.5	5.0	7.5	10
0	7.21±0.05^{a}	7.12±0.14^{a}	7.14±0.09^{a}	7.13±0.04^{a}	7.09±0.07^{a}
3	7.33±0.02^{b}	7.14±0.28^{ba}	6.91±0.20^{b}	7.02±0.06^{ba}	6.58±0.21^{b}
6	7.45±0.01^{c}	6.91±0.20^{ab}	6.72±0.13^{bc}	6.76±0.11^{b}	6.30±0.12^{c}
9	7.55±0.01^{d}	6.76±0.18^{bc}	6.57±0.12^{cd}	6.61±0.13^{b}	6.10±0.19^{cd}
12	7.62±0.01^{e}	6.60±0.14^{bc}	6.41±0.16^{de}	6.32±0.04^{c}	5.90±0.17^{d}
15	7.65±0.01^{ef}	6.56±0.08^{c}	6.31±0.07^{e}	6.10±0.01^{cd}	5.64±0.15^{e}
18	7.69±0.02^{f}	6.73±0.14^{bc}	6.35±0.09^{e}	5.96±0.04^{de}	5.47±0.12^{ef}
21	7.72±0.05^{fg}	6.61±0.09^{bc}	6.22±0.04^{e}	5.85±0.04^{ef}	5.34±0.05^{f}
24	7.75±0.01^{g}	6.65±0.08^{bc}	6.25±0.05^{e}	5.70±0.08^{f}	5.30±0.05^{f}

หมายเหตุ ^{a,b,c}ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากภาพที่ 4.4 แสดงการลดลงของค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่ปริมาณต่างกันคือ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร ซึ่งระยะเวลาในการแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันส่งผลให้มีค่าความแตกต่างของ pH ตั้งแต่ระยะเวลา 12-24 ชั่วโมง โดยระยะเวลาที่ 15 ชั่วโมง อยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการทดลองที่ 4.5.3 และ 4.5.4 มีค่า pH เฉลี่ย 6.56±0.08, 6.31±0.07, 6.10±0.01 และ 5.64±0.15 ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.4 การแช่ใบหูกวางแห้งที่ปริมาณต่างกันต่อค่า pH ในระยะเวลาต่างกัน

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากตารางที่ 4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างสารแทนนินในใบหูกวางแห้งต่อค่า pH ในน้ำ แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณสารแทนนินเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่า pH ลดลง โดยปริมาณสารแทนนินที่ 943 ppm มีค่า pH 5.30±0.08 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 4.8 ปริมาณสารแทนนินที่ส่งผลต่อ pH ของน้ำ

ปริมาณใบหูกวางแห้ง (กรัม/ลิตร)	สารแทนนิน (ppm)	pH ของน้ำ
0.0	0.0 ± 0.00^{a}	7.75 ± 0.01^{a}
2.5	178 ± 0.01^{b}	6.65 ± 0.08^{b}
5.0	314 ± 0.01^{c}	6.25 ± 0.05^{c}
7.5	816 ± 0.01^{d}	5.70 ± 0.08^{d}
10.0	943 ± 0.01^{e}	5.30 ± 0.05^{e}

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.3 ศึกษาค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน

ปริมาณใบหูกวางแห้งต่างกันหลังจากแช่น้ำ นาน 15 ชั่วโมง พบว่า ค่า pH ของน้ำ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกชุดการทดลอง ($P<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย pH 7.65±0.33, 6.89±0.33, 6.67±0.33, 6.51±0.33 และ 5.67±0.00 ตามลำดับ และค่าความเป็นด่างของน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) มีค่าสูงสุดที่ปริมาณใบหูกวางแห้ง 2.5 กรัม/ลิตร 156.0±12.01 mg/l as $CaCO_3$ ซึ่งค่าความกระด้างของน้ำมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) มีค่ามากที่สุดในชุดควบคุม (0 กรัม/ลิตร) 189 mg/l as $CaCO_3$

ตารางที่ 4.9 ตัวแปรคุณภาพน้ำของน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันที่ระยะเวลา 15 ชั่วโมง

ใบหูกวางแห้ง (กรัม/ลิตร)	pH	Alkalinity (mg/l as $CaCO_3$)	Hardness (mg/l as $CaCO_3$)
0	7.65±0.33[a]	101.0±2.86[b]	189.0±2.90[a]
2.5	6.89±0.33[b]	156.0±12.01[a]	160.0±20.13[b]
5.0	6.67±0.33[c]	121.3±11.62[b]	155.3±2.66[b]
7.5	6.51±0.33[d]	116.0±2.08[b]	163.3±0.88[b]
10.0	5.67±0.00[e]	102.0±6.11[b]	167.3±1.33[b]

หมายเหตุ [a,b,c] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการศึกษาการเพาะพันธุ์ปลากัดโดยใช้ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน มีค่าเฉลี่ย pH 7.90 ± 0.07, 6.67 ± 0.04, 6.48 ± 0.04, 6.33 ± 0.07 และ 5.91 ± 0.17 ตามลำดับ พบว่าการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยค่าเฉลี่ย pH 6.67±0.04 จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่ 2.5 กรัม/ลิตร พบการผสมพันธุ์วางไข่มากที่สุดคือ ร้อยละ 80.0±44.72 ซึ่งมีความแตกต่างกับ ชุดการทดลองที่ไม่ใช้น้ำจากการแช่ใบหูกวางแห้ง ค่าเฉลี่ย pH 7.90 ± 0.07 และชุดการทดลอง pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ที่มีค่าเฉลี่ย pH 5.91± 0.17 ซึ่งพบว่า มีการผสมพันธุ์วางไข่ร้อยละ 20.00±44.72 และ 0.00±0.00 ตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลอง pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่ 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร มีการวางไข่ร้อยละ 60.00±54.77 แต่ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร (pH 5.91± 0.17) มีความเป็นกรดค่อนข้างสูงส่งผลให้ไม่มี

การผสมพันธุ์วางไข่ และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลอง pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งที่ 0, 2.5, 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร

อัตราการรอดของลูกปลากัดอายุ 2 สัปดาห์ ที่เพาะพันธุ์ในน้ำแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)โดย pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 0, 2.5, 5 และ 7.5 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 7.90 ± 0.07, 6.67 ± 0.04, 6.48 ± 0.04 และ 6.33 ± 0.07 ตามลำดับ มีอัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลาร้อยละ 9.16±4.53, 43.68±11.55, 43.72±18.15 และ 40.40±16.61 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับชุดการทดลอง pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 5.91± 0.17 มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 0.00±0.00

ตารางที่ 4.10 ผลของ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่อการวางไข่ อัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์และลูกปลากัดฮาฟมูน

ค่าวิเคราะห์	ใบหูกวางแห้ง (กรัม/ลิตร)				
	0	2.5	5	7.5	10
pH 0 ชั่วโมง	7.27 ± 0.11^{a}	7.25 ± 0.01^{ab}	7.43 ± 0.14^{bc}	7.34± 0.04^{bc}	7.33 ± 0.12^{c}
pH 15 ชั่วโมง	7.90± 0.07^{c}	6.67 ± 0.04^{a}	6.48 ± 0.04^{b}	6.33± 0.07^{d}	5.91 ± 0.17^{e}
pH 1 วัน	7.52 ± 0.08^{a}	6.96 ± 0.08^{b}	6.90 ± 0.03^{bc}	6.75± 0.04^{c}	6.39 ± 0.19^{d}
pH 3 วัน	6.92 ± 0.11^{b}	7.19 ± 0.07^{a}	7.28 ± 0.03^{a}	7.30± 0.05^{a}	6.43 ± 0.21^{c}
อัตราการวางไข่ (%)	20.00±44.72^{b}	80.00±44.72^{a}	60.00±54.77^{ab}	60.00±54.77^{ab}	0.00±0.00^{c}
อัตรารอดพ่อแม่พันธุ์ (%)	100±0.00^{a}	100±0.00^{a}	100±0.00^{a}	100±0.00^{a}	0.00±0.00^{b}
อัตรารอดลูกปลา(%)	9.16±4.53^{ab}	43.68±11.55^{a}	43.72±18.15^{a}	40.40±16.61^{a}	0.00±0.00^{b}

หมายเหตุ ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3.4 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวของลูกปลากัดฮาฟมูน

หลังจากการแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน (0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร) ในไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง พบว่า ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย pH 7.50±0.02, 7.31±0.06, 6.71±0.02, 6.51±0.04 และ 5.42±0.10 ตามลำดับ

อัตราการรอดของลูกปลากัดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดย pH ที่ได้จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 5.42±0.10 หลังจากแช่ในไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว ส่งผลให้ไข่ปลาไม่มีการฟัก แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) กับ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 0, 2.5, 5.0 และ 7.5 กรัม/ลิตร โดยมีอัตราการรอดระหว่างร้อยละ 64.07-95.62

ผลของอัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัด พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 6.71±0.02 มีอัตราส่วนเพศผู้เฉลี่ยสูงสุด คือร้อยละ 74.13±9.08 ซึ่งมีลูกปลากัดเพศผู้เพิ่มขึ้นจากชุดการทดลองควบคุมร้อยละ 35.27±22.97 และอัตราส่วนเพศเมีย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) โดย pH จาก สารสกัดใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร มีอัตราส่วนเพศเมียต่ำสุด คือ ร้อยละ 25.85±1.16

น้ำหนักและความยาวลำตัวของลูกปลาอายุ 6 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยมีค่าน้ำหนักของลูกปลากัดเฉลี่ย 0.25-0.65 กรัม และมีความยาวของลูกปลากัดเฉลี่ย 2.80-3.61 เซนติเมตร (ตารางที่ 4.10)

ตารางที่ 4.11 ผลของสารสกัดใบหูกวางแห้งที่แตกต่างกันต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน

ค่าวิเคราะห์	ใบหูกวางแห้ง (กรัม/ลิตร)				
	0	2.5	5.0	7.5	10
pH 15 ชั่วโมง	7.50±0.02^{a}	7.31±0.06^{b}	6.71±0.02^{c}	6.51±0.04^{d}	5.42±0.10^{e}
เพศผู้ (%)	41.13±6.40^{b}	42.66±7.11^{b}	74.13±9.08^{a}	37.92±11.76^{b}	0^{c}
เพศเมีย (%)	58.86±5.83^{a}	57.34±9.25^{a}	25.85±1.16^{b}	62.07±15.32^{a}	0^{b}
อัตรารอด (%)	95.62±2.08^{a}	94.09±17.89^{a}	83.73±12.62^{a}	64.34±17.35^{a}	0^{b}
น้ำหนัก (g)	0.29±0.21	0.65±0.46	0.25±0.11	0.38±0.23	0
ความยาว (cm)	2.80±0.26	3.61±0.45	2.88±0.30	2.94±0.32	0

หมายเหตุ ^{a,b,c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

4.4 การเปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

จากการทดลองเปรียบเทียบการเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลากัดแบบดั้งเดิม และแบบควบคุมปัจจัย ช่วงฤดูหนาว ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2562 -มกราคม 2563 มีอุณหภูมิอากาศเฉลี่ย 28.41±0.09ºC พบว่า จากตารางที่ 4.11 การเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลากัดแบบควบคุมปัจจัย มีอัตราการรอดและอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าแบบดั้งเดิม ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 82.41±7.21 และร้อยละ 63.78±4.25 ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนน้ำหนักและความยาวลำตัวลูกปลาของทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.12 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง) ต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2562 -มกราคม 2563)

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง		
	แบบดั้งเดิม	แบบควบคุมปัจจัย	F-test
อุณหภูมิอากาศ (ºC)	28.41±0.09	28.41±0.12	ns
อุณหภูมิน้ำ (ºC)	25.76±0.02[b]	30±0.00[a]	*
pH ของน้ำ	7.74±0.06[b]	6.92±0.02[a]	*
อัตรารอด (%)	66.93±2.05[b]	82.41±7.21[a]	*
เพศผู้ (%)	46.14±5.36[b]	63.78±4.25[a]	*
เพศเมีย (%)	53.86±5.36[b]	36.22±4.25[a]	*
น้ำหนัก (g)	0.36±0.03	0.34±0.04	ns
ความยาว (cm)	3.30±0.13	3.26±0.19	ns

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ช่วงปลายฤดูหนาว ระหว่างเดือนธันวาคม 2562-กุมภาพันธ์ 2563 มีอุณหภูมิอากาศเฉลี่ย 31.10±0.06ºC พบว่า จากตารางที่ 4.12 การเพาะพันธุ์และอนุบาลลูกปลากัดแบบควบคุมปัจจัย มีอัตรา การรอดและอัตราส่วนเพศผู้มากกว่าแบบดั้งเดิม ($P<0.05$) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 87.96±5.27 และร้อยละ 52.88±3.45ตามลำดับ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนน้ำหนักและความยาวลำตัวลูกปลาของทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ ช่วงเวลาให้แสง และ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง) ต่ออัตราการรอด อัตราส่วนเพศ น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ช่วงปลายฤดูหนาว (เดือนธันวาคม 2562 -กุมภาพันธ์ 2563)

ค่าวิเคราะห์	ชุดการทดลอง		
	แบบดั้งเดิม	แบบควบคุมปัจจัย	F-test
อุณหภูมิอากาศ (ºC)	31.10±0.06	31.10±0.10	ns
อุณหภูมิน้ำ (ºC)	26.2±0.20[b]	30.0±0.00[a]	*
pH ของน้ำ	7.98±0.02[b]	6.88±0.09[a]	*
อัตรารอด (%)	66.52±5.91[b]	87.96±5.27[a]	*
เพศผู้ (%)	36.85±5.15[b]	52.88±3.45[a]	*
เพศเมีย (%)	63.15±5.15[b]	47.12±3.45[a]	*
น้ำหนัก (g)	0.39±0.02	0.41±0.02	ns
ความยาว (cm)	3.26±0.09	3.30±0.05	ns

หมายเหตุ ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

[a,b,] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 อุณหภูมิน้ำต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย ดังนี้

5.1.1 การแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

จากทดลองการแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิต่างกันเป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าในชุดควบคุมซึ่งมีอุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 28.4±0.24 ºC มีอัตราการรอดเฉลี่ยร้อยละ 83.67±17.63 และ ช่วงอุณหภูมิน้ำที่ 24-25ºC ซึ่งเป็นอุณหภูมิน้ำต่ำกว่าชุดควบคุมส่งผลให้มีอัตราการรอดร้อยละ 48.28±20.03 ต่ำกว่าชุดควบคุม สอดคล้องกับ Thepot and Jerry (2015) ทดลองการฟักไข่ปลากะพงขาวที่อุณหภูมิ 26, 28, 30, 32, 34 และ 36 ºC พบว่า อุณหภูมิที่ 26 ºC ไม่มีการฟักของลูกปลากะพงขาว และการแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในอุณหภูมิน้ำ 34-35 ºC ส่งผลให้มีอัตราการรอดของลูกปลากัดร้อยละ 40.28±8.39 ซึ่งต่ำกว่าชุดควบคุม ยังสอดคล้องกับ Abozaid et al. (2011) ศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำ 35ºC ต่อการกำหนดเพศในระยะการพัฒนาตัวอ่อนของปลาม้าลายทดสอบระยะการพัฒนาตัวอ่อน 3 ระยะได้แก่ gastrula stage (5-10 hours post fertilization; hpf), segmentation stage (5-24 hpf) และ pharyngula stage (5-48 hpf) พบว่า อุณหภูมิน้ำ 35ºC ส่งผลให้มีอัตราการรอดของลูกปลาม้าลายลดลงในระยะ pharyngula stage (5-48 hpf) มีอัตราการรอดเพียงร้อยละ 2.38 การเพิ่มหรือลดอุณหภูมิน้ำส่งผลให้อัตราการรอดของลูกปลาลดลงและในปลาบางชนิดไม่มีการฟักเป็นตัว เนื่องจากอุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นทำให้เกิดความผิดปกติในการพัฒนาตัวอ่อนและเกิดความเครียดทางกายภาพในช่วงเวลาดังกล่าวโดยอุณหภูมิน้ำบางช่วงไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตจึงส่งผลให้อัตราการรอดลดลง

อุณหภูมิที่แช่ไข่ปลากัดไม่มีผลต่ออัตราส่วนเพศผู้ของลูกปลากัดฮาฟมูนจากการทดลองไม่สอดคล้องกับ Selim et al.(2009) ทำการทดลองเปรียบเทียบการฟักไข่ปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*) ที่อุณหภูมิที่ 27 ºC และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจนถึง 32 ºC พบว่า ที่อุณหภูมิสูงขึ้นส่งผลให้ปลามีการแสดงออกทางฟีโนไทป์จากปลาเพศเมียเป็นปลาเพศผู้มากขึ้นในลูกปลาอายุ 0-10 วันหลังจากการฟัก ซึ่งเป็นช่วงที่ลูกปลามีความไวต่อสิ่งกระตุ้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด และ Abozaid et al. (2011) ยังพบว่าอุณหภูมิน้ำ 35ºC มีผลต่อการกำหนดเพศในระยะการพัฒนาตัวอ่อนของปลาม้าลายระยะ pharyngula stage โดยมีลูกปลาม้าลายเพศผู้เพิ่มขึ้นร้อยละ 52.63 ซึ่งอุณหภูมิน้ำสูงส่งผลให้มีการแสดงออกทางฟีโนไทป์จากลูกปลาเพศเมียเป็นลูกปลาเพศผู้

5.1.2 ผลของอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 7 วัน

จากการทดลองอุณหภูมิน้ำที่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดอายุ 7 วัน พบว่า อุณหภูมิน้ำ 30 และ 32ºC อัตราส่วนเพศผู้เฉลี่ยร้อยละ 49.54±9.83 และ 43.38±3.20 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) สอดคล้องกับ Zhang et al. (2016) ทดลองเลี้ยงลูกปลากดหลังจากการฟัก 3 ชนิด ได้แก่ *Pelteobagrus fulvidraco, P. vachelli* และ hybrids (*P. fulvidraco* x *P. vachelli*) ที่อุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 20, 23, 26, 29, 32 และ 34ºC นาน 45 วัน พบว่า อัตราส่วนเพศในลูกปลากดทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกัน โดยประชากรของปลากดเพศผู้และเพศเมียมีอัตราส่วนเพศ 1:1 มากกว่า 4,000 ตัว ซึ่งสรุปได้ว่าช่วงอุณหภูมิไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากดทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่สอดคล้องกับ Wang et al. (2014) ทดสอบอุณหภูมิน้ำในการเลี้ยงต่างกัน 4 ระดับ คือ 17, 23, 29 และ 34 ºC ต่อการกำหนดเพศในลูกปลา buluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) หลังจากการฟัก พบลูกปลาเพศผู้ในอุณหภูมิ 29 และ 34 ºC มากที่สุด เนื่องจาก การกำหนดเพศในปลา bluegill sunfish ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมตามกฎของ Haldane คือ เมื่อมีการผสมพันธุ์ข้ามสายพันธุ์ของปลาส่งผลให้เกิดการขาดหายหรือลดลงของลูกปลาเพศใดเพศหนึ่ง มีการทดสอบเลี้ยงลูกปลาซีกเดียว (*Paralichthys lethostigma*) หลังจากการฟัก ที่อุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ คือ 18, 23 และ 28 ºC พบว่าอุณหภูมิ 28 ºC ส่งผลให้มีลูกปลาซีกเดียวเพศผู้ร้อยละ 96 เนื่องจากปลาซีกเดียว *Paralichthys lethostigms* ในธรรมชาติสามารถดำรงชีวิตได้ในอุณหภูมิ 5-35ºC เมื่อนำมาทดลองในอุณหภูมิน้ำ 28 ºC ส่งผลให้มีลูกปลาเพศผู้เพิ่มขึ้นแต่ลักษณะของลูกปลาที่ปรากฏ คือ ลูกปลาซีกเดียวมี จีโนไทป์เป็นปลาเพศเมีย แต่มีการแสดงออกลักษณะทางฟีโนไทป์เป็นปลาเพศผู้ ดังนั้น อุณหภูมิมีผลต่อการกำหนดเพศแต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางจีโนไทป์ (Luckenbach et al., 2003) และยังไม่สอดคล้องกับ Desprez and Melard (1998) เลี้ยงลูกปลาหมอเทศข้างลาย อายุ 9 วัน (*Oreochromis aureus*) ในอุณหภูมิต่างกัน คือ 21 และ 34 ºC พบว่า อุณหภูมิที่ 34 ºC มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของลูกปลาหมอเทศข้างลายร้อยละ 97.8 ซึ่งการกำหนดเพศของลูกปลาหมอเทศข้างลายด้วยอุณหภูมิน้ำมีความสัมพันธ์กับหลายปัจจัย เช่น ความแตกต่างของสายพันธุ์ การดำรงชีวิตในธรรมชาติ และอัตราการตายของลูกปลาที่ใช้อุณหภูมิในการเลี้ยง

5.1.3 ผลของอุณหภูมิน้ำต่างกันต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน อายุ 14 วัน

จากการทดลองในลูกปลากัดอายุ 14 วัน อุณหภูมิน้ำ 30 และ 32ºC พบว่า อัตราส่วนเพศผู้ของลูกปลากัดฮาฟมูนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกชุดการทดลอง (P>0.05) ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Tessema et al. (2006) ศึกษาอุณหภูมิต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลานิลอายุ 10 วัน

จากแหล่งที่มาต่างกัน (ทะเลสาบ Manzala และทะเลสาบ Rudolph) พบว่า อุณหภูมิ 36 ºC ส่งผลให้ลูกปลานิลจากทะเลสาบ Manzada มีอัตราส่วนเพศผู้เพิ่มขึ้นร้อยละ 80 เมื่อเปรียบเทียบกับลูกปลานิลจากแหล่งที่มาอื่น และ Azaza et al. (2008) ทดลองเลี้ยงลูกปลานิล อายุ 12 วัน ในอุณหภูมิต่างกัน 4 ระดับ คือ 19, 32, 34 และ 36ºC พบว่า ช่วงอุณหภูมิที่ 36.5-36.9ºC มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของลูกปลานิลเพศผู้ร้อยละ 64-80 แต่ในช่วงอุณหภูมิที่ 19, 32 และ 34ºC ไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลานิลอายุ 12 วัน และ Wessels et al. (2011) ศึกษาอุณหภูมิต่อการกำหนดเพศใน ลูกปลานิลอายุ 10-20 วัน เลี้ยงในอุณหภูมิ 34, 36 ºC และ 28 ºC (ชุดควบคุม) พบว่า อุณหภูมิ 34ºC ส่งผลให้มีลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 46.1-61.7 เนื่องจากการกำหนดเพศของลูกปลาขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น พันธุกรรม สายพันธุ์ การผสมพันธุ์ อุณหภูมินั้นเป็นเพียงปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางฟีโนไทป์จากลูกปลาเพศเมียเป็นลูกปลาเพศผู้ได้มากกว่าเท่านั้นแต่ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางจีโนไทป์ ได้แก่ ปลาชิวข้าวสารญี่ปุ่น (Selim et al., 2009) ปลา buluegill sunfish (Wang et al., 2014) ปลาซีกเดียว (Luckenbach et al., 2003) ปลาหมอเทศข้างลาย (Desprez and Melard, 1998) ปลานิล (Tessema et al., 2006, Azaza et al., 2008, Wessels et al., 2011) แต่ไม่ส่งผลต่อปลาบางชนิด ได้แก่ ปลากะพงขาว (Thepot and Jerry, 2015) และปลากด (Zhang et al., 2016) จากการทดลองครั้งนี้ อุณหภูมิไม่ส่งผลต่อลูกปลากัดฮาฟมูนอายุ 7 และ 14 วัน หลังจากการฟัก

5.2 ช่วงเวลาให้แสงที่ส่งผลต่อการสืบพันธุ์และอัตราส่วนเพศในปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย ดังนี้

5.2.1 ช่วงเวลาให้แสงต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

จากการทดลองเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนในช่วงเวลาให้แสงต่างกัน พบว่า จำนวนไข่ ความดกไข่ น้ำหนักไข่ และ อัตราการฟักเป็นตัว มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยสูงสุดของจำนวนไข่และความดกไข่ ที่ชุดการทดลอง 0L:24D (ชุดควบคุม) รองลงมาคือชุดการทดลองช่วงเวลาให้แสง 24L:0D แต่ น้ำหนักไข่และอัตราการฟักเป็นตัวของลูกปลาไม่มีความแตกกันระหว่างชุดการทดลอง 0L:24D (ชุดควบคุม) และ 24L:0D ($P>0.05$) สอดคล้องกับการเพาะพันธุ์ปลา pikeperch (*Sander lucioperca*) ในช่วงเวลาให้แสง 3 ช่วง คือ 24L:0D, 12L:12D และ 0L:24D ความเข้มแสง 630 ลักซ์ พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D ส่งผลให้ปลามีการวางไข่ได้เร็วขึ้น และมีความดกไข่เพิ่มขึ้น จากการสังเกตเวลาในการวางไข่ของปลา pikeperch มีการวางไข่ในช่วงเวลากลางวันมากกว่าเวลากลางคืน จึงส่งผลให้ปลา pikeperch ไม่เกิดความเครียดในการวางไข่

ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D (Sarameh et al., 2012) และสอดคล้องกับการศึกษาเลียนแบบช่วงแสงตามธรรมชาติ (Simulated natural; SNP) และการให้แสงสว่างยาวนานขึ้น (Accelerated long day; ALD) ความเข้มแสง 350 ลักซ์ ส่งผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา black sea bass (*Centropristis striata*) ของ Howell et al. (2003) พบว่า การใช้ช่วงแสง ALD ในปลา black sea bass สามารถเร่งให้เกิดการสืบพันธุ์และวางไข่ได้เร็วขึ้น และการใช้ช่วงแสงเพิ่มผลผลิตลูกปลานิลโดยการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลานิลในช่วงเวลาให้แสงต่างกัน ได้แก่ 6L:8D, 12L:12D, 18L:6D และ 24L:0D พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 18L:6D และ 24L:0D มีการวางไข่ ความดกไข่มากที่สุด เนื่องจาก ช่วงเวลาให้แสงมีส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดการวางไข่โดยช่วงแสงที่เหมาะสมต้องไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากเกินไป (Mendoza et al., 2004) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bapary and Akihiro (2010) ทดสอบช่วงแสงที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา damselfish (*Chrysiptera cyanea*) โดยแบ่งช่วงเวลาให้แสงเป็น 3 ช่วง คือ 10L:14D, 14L:10D และช่วงแสงตามธรรมชาติ พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 14L:10D มีการผสมพันธุ์วางไข่มากที่สุดเมื่อเทียบกับทุกชุดการทดลอง แต่จากผลการทดลองเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนในช่วงเวลาให้แสงต่างกัน ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Migaud et al. (2006) เปรียบเทียบช่วงแสงตามธรรมชาติ 16L:8D และ 24L:0D ความเข้มแสง 500 ลักซ์ พบว่า ช่วงแสง 24L:0D ไม่มีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในปลา eurasian perch (*Perca fluviatilis*) และในช่วงแสง 16L:8D มีขนาดของไข่, น้ำหนักไข่, อัตราการปฏิสนธิ และ อัตราการฟักเป็นตัวของ ลูกปลาน้อยที่สุด เนื่องจากการเพิ่มขึ้นและลดลงของระยะเวลาให้แสงส่งผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศเมียบางชนิด โดยระบุว่าความเข้มแสงอาจจะมีผลต่อการสืบพันธุ์ในปลา eurasian perch โดยความเข้มแสงเป็นสิ่งกระตุ้นที่สำคัญต่อการวางไข่และยับยั้งการวางไข่ เช่นเดียวกับการทดลองของ Giannecchini et al. (2012) ที่ใช้ความเข้มแสง 500 ลักซ์ เพาะพันธุ์ปลากัดในประเทศบราซิลโดยใช้ช่วงเวลาให้แสงต่างกัน พบว่า ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D มีความดกของไข่ น้ำหนักไข่ การวางไข่ ต่ำที่สุดโดยให้เหตุผลว่าช่วงแสงที่มีความสว่างยาวนาน ส่งผลต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และกระบวนการสืบพันธุ์ในปลาหลายชนิด

อัตราการรอดของลูกปลากัดฮาฟมูนที่เพาะพันธุ์ในช่วงเวลาให้แสง 8L:16D มีอัตราการรอดต่ำที่สุด ($P<0.05$) ไม่สอดคล้องกับ Veras et al. (2013) ทดสอบช่วงแสงที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในปลานิล กำหนดช่วงแสงคือ 0L:24D, 6L:18D, 12L:12D, 18L:6D และ 24L:0D ความเข้มแสง 1,200 ลักซ์ พบว่า อัตราการรอดของลูกปลานิลในทุกช่วงแสงไม่มีความแตกต่างกัน แต่ช่วงแสงไม่ส่งผลต่ออัตราการรอด แต่ปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆในการทดลองส่งผลต่อ

อัตราการรอดได้ เช่น pH อุณหภูมิ และอาหาร แต่ ช่วงเวลาให้แสง 8L:16D ส่งผลให้มี ความดกไข่ และ อัตราการฟักเป็นตัวของลูกปลาต่ำจึงทำให้ลูกปลากัดฮาฟมูนที่ได้มีอัตราการรอดน้อยที่สุด

อัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัดฮาฟมูนในช่วงเวลาให้แสงที่ต่างกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Brown et al. (2014) เลี้ยงปลา california grunion (*Leuresthes tenuis*) ในช่วงเวลาให้แสง 2 ช่วง คือ 15L:9D และ 12L:12D พบว่า ช่วงแสง 15L:9D ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลา california grunion ทำให้มีลูกปลาเพศเมียเพิ่มขึ้น เนื่องจากปลา california grunion มีช่วงการสืบพันธุ์และวางไข่ 2 ช่วง คือ เดือนมีนาคม-พฤษภาคม และเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ซึ่งทั้ง 2 ช่วงการสืบพันธุ์มีความเกี่ยวข้องกับฤดูกาล โดยเดือนมิถุนายน-สิงหาคม เป็นช่วงฤดูกาลใบไม้ผลิ มีช่วงแสงสว่างระยะสั้น ส่งผลให้อัตราส่วนเพศปลา california grunion มีเพศผู้เพิ่มขึ้น แต่ปลากัดฮาฟมูนซึ่งเป็นปลาเขตร้อนมีช่วงแสงตามธรรมชาติในรอบปีแตกต่างกันมากทำให้ การกำหนดเพศของปลาเขตร้อนโดยใช้ช่วงแสงจึงมีความแตกต่างกับปลาในเขตหนาว ซึ่งในทางสรีรวิทยาของสัตว์แต่ละชนิดการตอบสนองต่อช่วงเวลาให้แสงในการสืบพันธุ์และวางไข่มีความแตกต่างกัน โดยช่วงเวลาให้แสงสว่างยาวนานส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่ในปลาบางชนิด ได้แก่ ปลากัดฮาฟมูน (จากการทดลองที่ 2.1) ปลา pikeperch (Sarameh et al., 2012), ปลา black sea bass (Howell et al. 2003) ปลานิล (Mendoza et al. 2004) และ ปลา damselfish (Bapary and Akihiro, 2010) แต่ไม่ส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่ใน ปลากัด (ประเทศบราซิล) (Giannecchini et al., 2012) และ ปลา eurasian perch (Migaud et al., 2006) เนื่องจากสภาพภูมิประเทศที่แตกต่างกันในการดำรงชีวิตของปลาซึ่งช่วงเวลาให้แสงมีความสัมพันธ์กับฤดูกาลวางไข่ของปลาในภูมิประเทศนั้นๆ

5.2.2 ผลของช่วงแสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน

ช่วงเวลาให้แสงต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดเพศเมีย พบระยะการพัฒนาเซลล์ไข่ในปลาเพศเมีย ระยะที่ 5 และ 6 มากที่สุดในทุกชุดการทดลอง โดยการใช้ช่วงเวลาให้แสง 0L:24D เป็นเพาะพันธุ์ปลากัดแบบปกติ ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Bapary and Akihiro (2010) ศึกษาช่วงแสงที่ส่งผลต่อเซลล์สืบพันธุ์ในปลา damselfish (*Chrysiptera cyanea*) ซึ่งเป็นปลาในเขตร้อน แบ่งช่วงแสงออกเป็น 3 ช่วง คือ 10L:14D, 14L:10D และ ช่วงแสงตามธรรมชาติ พบว่า การเลี้ยงปลา damselfish เพศเมียในช่วงแสงที่มีความสว่างยาวนานส่งผลให้มีการพัฒนาเซลล์ไข่ ระยะที่ 3 ได้มากกว่าการเลี้ยงในช่วงแสงที่มีความสว่างระยะสั้นและช่วงแสงตามธรรมชาติ ซึ่งช่วงแสง 10L:14D และ ช่วงแสงตามธรรมชาติ พบการพัฒนาเซลล์ไข่ที่ไม่สมบูรณ์มากกว่า และยัง

ไม่สอดคล้องกับ Maitra and Chattoraj (2007) ทำการศึกษาบทบาทของช่วงแสงที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในปลากระโห้อินเดีย โดยการเปรียบเทียบการให้แสงสว่างอย่างต่อเนื่องและช่วงแสงตามธรรมชาติ พบว่า การใช้แสงในการเลี้ยงปลากระโห้เพศเมียส่งผลให้มีการพัฒนาเซลล์ไข่ในระยะที่ 2 และพบการพัฒนาของ follicular เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงแสงธรรมชาติซึ่งพบการพัฒนาเซลล์ไข่ในระยะที่ 3 มากที่สุด มีการอธิบายว่า การพัฒนาเซลล์ไข่ในปลาที่อยู่อาศัยในเขตร้อนขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการผสมพันธุ์ที่จะเกิดขึ้นโดยปลา damselfish และปลากระโห้อินเดีย มีการผสมพันธุ์วางไข่ 1ปี/ครั้ง แต่ปลากัดฮาฟมูนสามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ปีละหลายครั้ง จึงมีความแตกต่างกันในส่วนของการพัฒนาเซลล์ไข่ของปลาเพศเมีย

ช่วงเวลาให้แสงที่แตกต่างกันต่อการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดเพศผู้ พบการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ primary spermatocytes (P), secondary spermatocytes (Ss), spermatids (M) และ spermatozoa (S) ไม่สอดคล้องกับ Momin and Devrim (2018) และ Guner et al. (2016) ศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) เพศผู้ในฤดูผสมพันธุ์ที่มีช่วงแสงธรรมชาติและนอกฤดูผสมพันธุ์โดยการกำหนดช่วงแสงที่ 16L:8D พบว่า ช่วงแสงตามธรรมชาติ มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเพศผู้ได้ดีกว่าช่วงแสง 16L:8D โดยกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเรนโบว์เทราต์เพศผู้ มีปริมาณของ spermatozoa แตกต่างกัน และพบว่า มีอัตราการปฏิสนธิลดลงในกลุ่มปลาที่เลี้ยงด้วยช่วงเวลาให้แสง 16L:8D นอกจากนั้น พบว่า มีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ผิดปกติ ส่งผลต่อการพัฒนาตัวอ่อนของลูกปลาและอัตราการฟักลดลง เนื่องจากสเปิร์มที่ได้จากปลาที่เลี้ยงภายใต้ช่วงแสงที่กำหนดมีการปฏิสนธิแบบ gynogenesis จึงทำให้ไข่ปลาที่ได้รับการปฏิสนธิไม่มีการฟัก

5.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนัก และ ความยาวลำตัวในลูกปลากัดฮาฟมูน ประกอบด้วย 4 การทดลองย่อย ดังนี้

5.3.1 ปริมาณสารแทนนินในใบหูกวาง

ปริมาณสารแทนนินที่สกัดด้วยน้ำเพิ่มขึ้นตามปริมาณใบหูกวางแห้ง ($P<0.05$) จากการศึกษาของพรพิมลและคณะ (2560) พบว่า องค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวางสด มีสารแทนนินร้อยละ 12.67 ใบหูกวางแห้ง มีสารแทนร้อยละ 16.70 และ สมจินตนา และ วรวัต (2560) สารแทนนินในใบหูกวางแห้ง มีปริมาณสารแทนนิน ร้อยละ12.67 จากการศึกษาของ Rajesh et al. (2016) การสกัดสารพฤกษเคมีโดยใช้สารสกัดต่างกันคือ petroleum ether, chloroform, methanol และ น้ำ พบว่า การใช้น้ำสกัด

สารพฤกษเคมีในใบหูกวางและลำต้นทำให้ได้สารแทนนินออกมามากที่สุดโดยพบปริมาณสารแทนนิน 258.5 ppm ในใบหูกวาง 1 กรัม

5.3.2 ระยะเวลาแช่และปริมาณใบหูกวางแห้งที่ต่างกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างในน้ำ

การทดสอบแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่า pH เฉลี่ยเริ่มต้นที่ pH 7.21 พบว่า ปริมาณใบหูกวางแห้งที่ 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 6.65, 6.25, 5.70 และ 5.30 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณใบหูกวางแห้งต่างกันส่งผลให้ค่า pH ในน้ำลดลง สอดคล้องกับการทดลองของ Chansue and Nongnut (2008) ศึกษาผลของสารแทนนินจาก ใบหูกวางต่อคุณภาพน้ำและความพิษในสัตว์น้ำ โดยนำใบหูกวางปริมาณต่างกันแช่ในน้ำทิ้งไว้ 7 วัน พบว่า เมื่อครบ 7 วันสารแทนนินในน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้นและค่า pH ในน้ำมีค่าลดลง และปริมาณใบหูกวาง 10 กรัม/ลิตร ส่งผลให้มีค่า pH 6.09 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nugroho et al. (2016) ทดสอบผลของสารสกัดจากใบหูกวางส่งผลต่อคุณภาพน้ำ พบว่า น้ำที่ได้จากการแช่ใบหูกวางส่งผลให้ค่า pH ลดลง ปริมาณใบหูกวางที่ 125, 250, 375, 500 และ 625 ppm มีค่า pH 6.12, 6.17, 6.21, 6.25 และ 5.05 ตามลำดับ เนื่องจากในใบหูกวางพบสารแทนนินซึ่งมีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนจึงส่งผลให้มีการลดลงของค่า pH ในน้ำ

5.3.3 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่พันธุ์ปลากัดและอัตราการรอดในลูกปลากัดฮาฟมูน

ปริมาณใบหูกวางแห้งต่างกันหลังจากแช่น้ำ นาน 15 ชั่วโมง พบว่า ค่าความเป็นด่างของน้ำมีค่าสูงสุดที่ปริมาณใบหูกวางแห้ง 2.5 กรัม/ลิตร 156 mg/l as $CaCO_3$ ค่าเฉลี่ย pH 6.89 และความกระด้างของน้ำ มีค่ามากที่สุดในชุดควบคุม (0 กรัม/ลิตร) 189 mg/l as $CaCO_3$ ($P>0.05$) ส่งผลให้คุณภาพน้ำเป็นน้ำกระด้าง สอดคล้องกับการทดลองของ Mount (1973) พบว่า เมื่อ pH ลดลงค่าความเป็นด่าง ของน้ำ จะลดลงตามไปด้วย pH 7.5 มีค่าความเป็นด่างของน้ำ 155.6 mg/l^{-1} as $CaCO_3$ และ pH 6.6 มีค่า ความเป็นด่างของน้ำ 102 mg/l^{-1} as $CaCO_3$ เนื่องจากค่า pH และค่าความเป็นด่างของน้ำมีความสัมพันธ์กัน คือ ค่าความเป็นด่างของน้ำแสดงความเป็นด่างในน้ำ หากมีค่าสูงขึ้น ส่งผลให้ค่า pH สูงขึ้นเนื่องจากในน้ำมีปริมาณไฮดรอกไซด์ ไอออน เพิ่มขึ้น และความกระด้างของน้ำมีความสัมพันธ์กับความเป็นด่างของน้ำโดยปริมาณค่าความเป็นด่างของน้ำสามารถประเมินค่าความด้างและชนิดของความกระด้างได้

pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันส่งผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่และอัตราการรอดของพ่อแม่พันธุ์ปลากัด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 10 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH 5.91± 0.17 ไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ และพ่อแม่พันธุ์ปลากัดตายทั้งหมด สอดคล้องกับการวิจัยของ Ikuta et al.(2000) ทดสอบความเป็นกรดของน้ำที่ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ในปลา พบว่า pH ที่มีความเป็นกรดสูงส่งผลต่อสรีรวิทยาในปลาส่งผลต่อระดับ cortisol ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดความเครียดและระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอลง ส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ โดย sex steroids และ ฮอร์โมน gonadotropin มีระดับสูงกว่าปกติ ทำให้กระบวนการสืบพันธุ์หยุดชะงักลง และยับยั้งการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในพ่อแม่พันธุ์ปลา สอดคล้องกับการวิจัยของ Vuorinen et al. (1990) ทำการเลี้ยงปลาใบขนุน (*Coregonus wartmanni*) ที่ pH 5.75 และ 4.75 พบว่า pH ทั้งสองระดับ ส่งผลต่อปลาใบขนุนเพศเมียมากกว่าปลาเพศผู้ โดย ระบบสืบพันธุ์ในเพศเมียมีความอ่อนแอลงกว่าปกติและไม่มีการวางไข่ เนื่องความเป็นกรดของน้ำมีผลต่อกระบวนการสร้างและสะสมไข่แดง (vitellogenesis) และก่อให้เกิดความเครียดในกระบวนการสืบพันธุ์ของปลาใบขนุน ประกอบกับ Baldisserotto (2011) กล่าวว่า ปลาและลูกปลาน้ำจืดสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ที่ระดับ pH 6.0-8.0 หาก pH มีค่าความเป็นกรดมากส่งผลต่ออัตราการรอดในปลาน้ำจืดโดยทำให้ระบบหมุนเวียนเลือดล้มเหลว เนื่องจาก ปริมาณเม็ดเลือดและของเหลวในร่างกายมีการเพิ่มขึ้น

5.3.4 ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกันต่ออัตราส่วนเพศ อัตราการรอด น้ำหนักและ ความยาวลำตัวของลูกปลากัดฮาฟมูน

การแช่ใบหูกวางแห้งปริมาณต่างกัน (0, 2.5, 5, 7.5 และ 10 กรัม/ลิตร) เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิ พบว่า ค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่างชุดการทดลอง (P<0.05) โดยปริมาณใบหูกวางแห้ง 10 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 5.42 ซึ่งมีความเป็นกรด ส่งผลให้ไข่ปลากัดไม่มีการฟักและพ่อพันธุ์ปลากัดตาย สอดคล้องกับ Baldisserotto (2011) ศึกษาผลของ pH ในน้ำต่อการฟักไข่และการเติบโตของปลาน้ำจืด พบว่า เมื่อ pH มีค่าต่ำกว่า pH 6.0 หรือมีค่าสูงกว่า pH 9.0 ส่งผลให้ไข่ปลา grumatã (*Prochilodus lineatus*) ไม่เกิดการฟักเป็นตัว เนื่องจาก ลูกปลาน้ำจืดทั่วไปมีการฟักและมีอัตราการรอดที่ pH 6.0-8.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mount (1973) เลี้ยงปลา fathead minnows (*Pimephales promelas*) ใน pH ต่างกัน พบว่า เมื่อ pH ลดลงถึง pH 5.2 และ 4.5 ส่งผลให้มีอัตราการฟักลดลงและไข่ปลาที่ได้จากการผสมพันธุ์ใน pH ดังกล่าวมีความผิดปกติ เนื่องจากปลา fathead minnows วางไข่ในสภาพแวดล้อม

ที่ไม่เหมาะสม ส่งผลให้การพัฒนาเซลล์ไข่ผิดปกติ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Craig and Baksi (1977) ทดสอบค่า pH ที่ลดลงส่งผลต่อการสืบพันธุ์ การเจริญเติบโตและอัตราการรอดใน ปลา flagfish (*Jordanella floridae*) พบว่า เมื่อค่า pH มีการลดลงส่งผลให้ไข่ปลามีอัตราการฟักต่ำลง ตั้งแต่ระดับ pH 5.5-4.5 เนื่องจากในธรรมชาติปลา flagfish ดำรงชีวิตอยู่ในน้ำที่มีค่า pH 6.0-6.5 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมในการวางไข่ของปลา flagfish เมื่อมีการลดลงของค่า pH จึงส่งผลต่อกระบวนการสืบพันธุ์และวางไข่

อัตราการรอดของลูกปลากัดจากการเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนที่ใช้น้ำแช่ใบหูกวางแห้งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง (P>0.05) ไม่สอดคล้องกับการใช้น้ำที่ผสมสารสกัดจากใบหูกวางใช้ในการเลี้ยงลูกปลา pearl gourami (*Trichopodus leeri*) มีค่าความเป็นกรดเล็กน้อย มีค่า pH 5.8-6.5 ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเลี้ยง ทำให้อัตราการรอดเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของการเลี้ยงด้วยน้ำประปาโดยมีอัตราการรอด 90% (Sung and Munafi, 2019) และการใช้ สารสกัดใบหูกวางที่ 125, 250, 375, 500 และ 625 ppm ในการเลี้ยงลูกปลากัด พบว่า ใบหูกวางปริมาณ 375 ppm ส่งผลให้มีอัตราการรอดของลูกปลากัดสูงขึ้น เนื่องจากสารพฤกษเคมีในใบหูกวางช่วยเสริมภูมิคุ้มกันในปลาได้มากขึ้น (Nugroho et al., 2016)

ปริมาณใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร แช่น้ำนาน 15 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ย pH 6.71±0.02 ส่งผลให้มีอัตราส่วนเพศผู้สูงสุดร้อยละ 74.13±9.08 ซึ่งมีลูกปลากัดเพศผู้เพิ่มขึ้นจากชุดการทดลองควบคุมร้อยละ 35.27±22.97 เนื่องจาก pH เป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมอย่างหนึ่งที่สามารถกระตุ้นในเกิดการกำหนดเพศในปลาได้ สอดคล้องกับการเลี้ยงปลาหมอสี (*Pelvicachromis pulcher*) ในน้ำ pH 5.5 มีอัตราส่วนลูกปลาหมอสีเพิ่มขึ้น แต่ pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้มากกว่าที่ระดับ pH 6.5 โดย pH 5.5 มีจำนวนเพศผู้ 13 ตัวจาก 18 ตัว (Reddon and Peter, 2013) เนื่องจาก pH ของน้ำเป็นปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในปลาซึ่งมีผลต่อการแสดงออกทางฟีโนไทป์จากปลาเพศเมียเป็นปลาเพศผู้ สอดคล้องกับ Baroiler and Cotta (2001) พบว่า ปลาหมอแคระ (Apistogramma) มีอัตราส่วนเพศผู้สูงในสภาวะเป็นกรด คือ (pH 4.5) ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Rubin (1985) ทำการเลี้ยงปลาหมอสี 5 สายพันธุ์ คือ *Pelvicachromis pulcher, P. laemiatus, P.subcellatus, Apistopramma borell, A. caucaloides* โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในระดับ pH ที่แตกต่างกัน คือ ระดับ pH ต่ำ ดังนี้ 5.05, 5.40, 5.50, 5.80, 5.80 และ 6.20 และระดับ pH ที่เป็นกลาง คือ 6.90, 7.00, 7.00, 7.10, 7.10 7.80 พบว่า pH ต่ำส่งผลให้มีลูกปลาเพศผู้เพิ่มขึ้นร้อยละ 96 , 89, 87, 91, 92 และ 100 ตามลำดับ ซึ่งช่วงที่มีระดับ pH เป็นกลางนั้นมีลูกปลาเพศผู้ ร้อยละ 20, 11, 11, 9, 13 และ 3 ตามลำดับ

น้ำหนักและความยาวลำตัวของลูกปลาเมื่อครบ 4 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ไม่สอดคล้องกับ Sung and Munafi (2019) เปรียบเทียบการเลี้ยงลูกปลา pearl gourami (*T. leerii*) ในน้ำผสมสารสกัดจากใบหูกวางและน้ำประปา พบว่า ลูกปลาที่มีการฟักเป็น

ตัวในน้ำผสมสารสกัดจากใบหูกวางมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้นร้อยละ 1.5 ต่อวัน โดยมีการให้เหตุผลว่า การเจริญเติบโตของลูกปลานั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สภาพอากาศ อาหาร และอื่นๆ ซึ่งลูกปลาจะเจริญเติบโตได้ดีในระดับ pH เป็นกลาง Baldisserotto (2011) กล่าวว่า ลูกปลาน้ำจืดจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในระดับ pH 6.0-8.0

pH ระหว่าง 5.42-6.50 ส่งผลต่อกาผสมพันธุ์และอัตราการรอดในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูนและลูกปลากัดเมื่ออนุบาลใน pH ต่ำกว่า 6.5 ส่งผลต่ออัตราการรอดของลูกปลา แต่ pH จากสารสกัดใบหูกวางที่ 5 กรัม/ลิตร (pH 6.71±0.02) ส่งผลให้มีอัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัดเพิ่มขึ้น Romer and Beissenherz (1996) กล่าวว่า จีโนไทป์สามารถกำหนดเพศปลาหลายๆชนิดได้แต่การกำหนดเพศปลาโดยสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นได้ในปลาบางชนิดซึ่งปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลมากที่สุด คือ อุณหภูมิ และ pH ของน้ำ

5.4 เปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงแบบดั้งเดิมกับแบบควบคุมปัจจัยต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

การเพาะพันธุ์ปลากัดแบบดั้งเดิม กับแบบควบคุมปัจจัยในช่วงฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน 2562 – มกราคม 2563) และ ช่วงปลายฤดูหนาว (ปลายเดือนธันวาคม 2562 –กุมภาพันธ์ 2563) ซึ่งทั้ง 2 รอบการผลิตมีอุณหภูมิอากาศ 28.41±0.09 ℃ และ 31.10±0.06 ℃ พบว่า การเพาะพันธุ์ปลากัดแบบควบคุมปัจจัยทั้งช่วงฤดูหนาวและปลายฤดูหนาว ทำให้ อัตราการรอด และอัตราส่วนเพศผู้ในลูกปลากัดฮาฟมูนเพิ่มขึ้นมากกว่าการเพาะพันธุ์แบบดั้งเดิม ($P<0.05$) ซึ่งสิ่งแวดล้อมบางปัจจัยสามารถกำหนดอัตราส่วนเพศและเป็นการกระตุ้นให้เกิดการกำหนดเพศในปลาได้ เช่น อุณหภูมิ และ pH สอดคล้องกับ อัตราส่วนเพศปลากินยุง (*Gambusia affinis*) เพศผู้เพิ่มขึ้นในระบบนิเวศที่มี pH ของน้ำต่ำ อุณหภูมิสูง (Fryxell et al., 2015) และยังสอดคล้องกับปลากลุ่ม Apistogramma, Atherinids, Poecilids, Cichlids, Cyprinids และ Pleuronectidae ซึ่งอุณหภูมิสูงและ pH ของน้ำต่ำ (pH 4.5) ส่งผลให้มีอัตราส่วนเพศผู้เพิ่มขึ้น (Baroiler and Cotta, 2001) แต่ไม่สอดคล้องกับอัตราส่วนเพศเมียในลูกปลา california grunion (*L. tenuis*) ที่ลูกปลาเพศเมียเพิ่มขึ้นในอุณหภูมิที่ 21 ℃ ช่วงแสง 15L:9D แต่เมื่อมีการสืบพันธุ์วางไข่ในช่วงเดือนเดือนมิถุนายน-สิงหาคม ซึ่งเป็นฤดูใบไม้ผลิ ทำให้มีอุณหภูมิสูงและระยะเวลาการส่องสว่างของแสงสั้นลง ส่งผลให้ลูกปลาที่ได้มีอัตราส่วนเพศผู้เพิ่มขึ้น (Brown et al., 2014)

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. อุณหภูมิน้ำระหว่าง 24-32ºC ไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน และอุณหภูมิน้ำสูง (34-35ºC) ส่งผลให้อัตราการรอดของลูกปลากัดฮาฟมูนลดลง

2. ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D ส่งผลให้มีความดกไข่ น้ำหนักไข่ และอัตราการฟัก ไม่แตกต่างกับช่วงเวลาให้แสง 0L:24D (ชุดควบคุม) แต่ช่วงเวลาให้แสงทุกชุดการทดลองไม่ส่งผลต่ออัตราส่วนเพศในลูกปลากัดฮาฟมูน

3. การใช้ pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งต่างกันต่อการผสมพันธุ์วางไข่ในพ่อแม่พันธุ์ปลากัดฮาฟมูน พบว่า มีการผสมพันธุ์วางไข่ใน pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้งปริมาณ 2.5 - 7.5 กรัม/ลิตร ค่าเฉลี่ย pH เท่ากับ 6.33 – 6.67 และการแช่ไข่ปลากัดที่ได้รับการปฏิสนธิในน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ลิตร มีค่าเฉลี่ย pH 6.71±0.02 สามารถเพิ่มผลผลิตปลากัดเพศผู้ได้ร้อยละ 35.27±22.97 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

4. การเพาะพันธุ์ปลากัดฮาฟมูนแบบควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิ 30 ºC ช่วงเวลาให้แสง 24L:0D และค่า pH จากสารสกัดใบหูกวางแห้ง 5 กรัม/ ลิตร) สามารถเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ของลูกปลากัดในรอบการผลิตที่ 1 ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2562 - มกราคม 2563 (ฤดูหนาว) เท่ากับร้อยละ 28.73±10.56 และเพิ่มอัตราการรอดในลูกปลากัด เท่ากับร้อยละ 27.11±15.32 รอบการผลิตที่ 2 ระหว่างเดือนธันวาคม 2562 - กุมภาพันธ์ 2563 (ปลายฤดูหนาว) สามารถเพิ่มอัตราส่วนเพศผู้ของลูกปลากัดเท่ากับร้อยละ 25.88±17.94 และเพิ่มอัตราการรอดในลูกปลากัด เท่ากับร้อยละ 27.77±13.10 เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะพันธุ์แบบดั้งเดิม

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาการเพิ่มจำนวนลูกปลากัดเพศผู้ด้วยปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นๆ เช่น ความหนาแน่นของพื้นที่ในการเลี้ยง ความเค็ม ความกระด้างของน้ำ เป็นต้น

บรรณานุกรม

กองวิจัยและพัฒนาสุขภาพสัตว์น้ำ. 2554. **แนวทางปฏิบัติตามมาตรฐานสินค้าเกษตร** มกษ. 7428-255 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

การุณ ทองประจุแก้ว. 2556. **ชีววิทยาของปลากัดไทย.** หน้า 1-6 ใน วารสารวิทยาศาสตร์ มข.ฉบับที่ 1. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2549. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา.** มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2530. **เนื้อเยื่อของปลาดุกด้าน.**

ธนาทิพย์ แหลมคม. 2556. **สรีรวิทยาเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.** อุบลราชธานี : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

ธนสรณ์ รักดนตรี, ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ, ศตพร โนนคู่เขต โขง, ขจรเกียรติ์ ศรีนวลสม และ รักพงษ์ เพชรคา. 2561. **การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ปลาสลิด (*Trichopodus pectoralis*) ด้วยวิธีการเพิ่มช่วงเวลาที่ปลาได้รับแสงในรอบวัน.** เอกสารประกอบการประชุมวิชาการระดับชาตินเรศวรวิจัยครั้งที่ 14. หน้า 54-64.

ประภาศ โฉลกพันธ์รัตน์. 2553. **การเพาะเลี้ยงปลากัด**. https://home.kku.ac.th/pracha/Betta.htm, 14 มิถุนายน 2563.

พรพิมล พิมลรัตน์, นิวุฒิ หวังชัย, สุพันธ์ณี สุวรรณภักดี, พัชราวลัย ศรียะศักดิ์ และนักศึกษาสาขาวิชาการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร. 2560. **เอกสารประกอบการอบรม สารสกัดแทนนินจากใบหูกวาง วิธีเตรียมอย่างง่ายและการประยุกต์ใช้ในปลาสวยงาม** http://www.chu,phon.mju.ac.th. 13 กันยายน 2562

เมธา คชาภิชาติ, วัฒนา ริ้วทอง, พลชาติ ผิวเณร และ ยงยุทธ อุนากรสวัสดิ์. 2556. **คุณภาพน้ำเชื้อจากอัณฑะปลากดแก้วที่สร้างขึ้นใหม่**. http://elib.fisheries.go.th, 24 กรกฎาคม 2563.

วิมล เหมะจันทร. 2528. **ชีววิทยาปลา**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิวพงษ์ โกสิงห์, ภัทรียา พลซา, กัลย์กนิต พิสมยรมย์, พรพิมล แสงจันทร์ และ สุพัฒน์ พลซา. 2561. การใช้สารสกัดใบหูกวางชนิดผงเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลากัด. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**.3:85-91.

สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ. 2559. **มาตรฐานปลากัดสวยงามในประเทศไทย.** กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 14-17.

สมจินตนา พุทธมาตย์ และ วรวัฒ สุวรรณสาร.2560. **การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบหูกวาง (*Terminalia catappa* L.) และผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำและการยับยั้งแบคทีเรียในน้ำ.** http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/KC4501073.pdf, 9 กันยายน 2562

Abzaid, H., Wessels, S. and Horstgen, S.G. 2011. Effect of rearing temperatures during embryonic development on the phenotypic sex in zebrafish *(Danio rerio*). **Sexual Development.** 5: 259-265.

Athauda, S.,Trevor, A. and Rocky de, N. 2012. Effect of rearing water temperature on protandrous sex inversion in cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*). **General and Comparative Endocrinology.** 175 : 416-423.

Azaza, M.S., Dharaief, M.N. and Kraiem, M.M. 2008. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**. 33: 98-105.

Baldisserotto, B. 2011. Water pH and hardness affect growth of freshwater teleosts. **Revista Brasileira de Zootecnic.** 40: 621-626.

Baroiller, J.F. and Cotta, H.D. 2001. Environment and sex determination in farmed fish **Comparative Biochemistry and Physiology** Part C. 130 : 399-409.

Biswas, A.K., Tetsuro, M., Goro, Y., Masashi, M. and Toshio, T. 2005. Control of reproduction in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by photoperiod manipulation. **Aquaculture.** 243:229-239.

Brown, E.E., Hannes, B. and David, O.C. 2014. Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** 461: 39-43.

Campos-Mendoza, A., McAndrew, B.G., Coward, K. and Bromage, N. 2004. Reproductive of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to photoperiodic manipulation; effect on spawning periodicity, fecundity and egg size. **Aquaculture.** 231: 299-314.

Chansue, N. and Nongnut, A. 2008. The in vitro antibacterial activity andornamentalfish toxicity of the water extract of Indian almond leaves (*Terminalia catappa* Linn.). **KKU.Veterinary Journal.** 18(1): 36-45.

Cheng, X.C., Lin, D.J. and You, Y.L. 2007. Influence of temperature on sex differentiation of teleost, *Pelteobagrus vachelli*. **Zoological Research**. 28: 73–80.

Chitmanat, C., Tongdonmuan, K., Khanom, P., Pachontis, P. and Nunsong, W. 2005. Antiparasitic, antibacterial, and antifungal activities derived from a *Terminalia catappa* solution against some Tilapia (*Oreochromis niloticus*) pathogens. **Proc. WOCMAP III**. 4: 179-182.

Craig, G.R. and Baksi, W.F. 1977. The effects of depressed pH on flagfish reproduction, growth and survival. **Water Research.** 11: 621-626.

Desprez, D. and Meland, C. 1998. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture.** 162: 79-84.

Giannecchini, L.G., Haluko, M. and Joao, B.K.F. 2012. Effects of photoperiod on reproduction of Siamese fighting fish *Betta splendens*. **Revista Brasileira de Zootecnia.** 41:821-826.

Haung, W.B. and Fang, L.C. 2006. Effects of temperature and floating materials on breeding by theparadise fish (*Macropodus opercularis*) in the non-reproductive season. **Zoological Studies.** 45: 475-482.

Howell, R.A., David, L.B. and Terence, M.B. 2003. The effects of photoperiod manipulation on thereproduction of black sea bass, *Centropristis striata*. **Aquaculture.** 218: 651-669.

Ikuta, K., Takashi, Y. and Shoji, K. 2000. Effects of acidification on fish reproduction. **Nikko Branch National Research Institute of Aquaculture.** 28: 39-44.

Jaroensutasinee, M. and Jaroensutasinee, K. 2001. Bubble nest habitat characteristics of wild Siamese fighting fish. **Journal of Fish Biology.** 58: 1311-1319.

Jha S. 2014. Reproduction system in fish/fish anatomy and physiology. **Available Source:** http://www.yourarticlelibrary.com/fish/anatomy-and-physiology, 9 กันยายน 2562.

Levy, G., Dalia, D. and Gad, D. 2011. Effect of environmental temperature on growth and reproduction-related hormones gene expression in the female blue gourami (*Trichogaster trichopterus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**.160: 381-389.

Lin, D.J. and You, Y.L. 2004. A study on the artificial propagation and masculinizing technique ofthe teleost *Pelteobagrus vachelli*. **Fujian Fisheries**. 101: 9–13.

Luckenbach, J.A., John, G., Daniels, V. and Russell, J.B. 2003. Gonad differentiation and effects of temperature on sex determination in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). **Aquaculture.** 216 : 315-327

Maitra, S.K. and Chattoraj A. 2007. Role of photoperiod and melatonin in the regulation of ovarian functions in Indian carp *Catla catla*: basic information for future application. **Fish Physiol Biochem**. 33: 367-382.

Min, B.R., Pinehak, W.E., Merkel, R., Walker, R., Tomita, G. and Anderson, R.C. 2008. Comparative antimicrobial activity of tannin extracts from perennial plants on mastitis pathogens. **Scientific Research and Essay.** 3: 066-073.

Migaud, H., Neil, W., Jean-Noel, G. and Pascal, F. 2006. Influence of photoperiod on reproductive performances in eurasian perch *Perca fluviatilis*. **Aquaculture.** 252: 385-393.

Momin, M. and Devrim, M. 2018. Sperm quality analysis of normal season (NG) and out-season by photoperiod manipulation (PG) of male rainbow trout broodstock (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Physiol. Biochem.** 44: 1551-1560.

Mount, D.I. 1973. Chronic effects of low pH on Fathead minnow survival, growth and reproduction.**Water Research Pergamon Press**.7: 987-993.

Nugroho, R.A., Hetty, M., Dewi, S., Deasy, L. and Firman, M.N. 2016. The effects of *Terminallia catappa* L. leaves extract on the water quality properties, survival and blood profile of ornamental fish (*Betta* sp.) cultured. **Biosaintifika.** 8(2): 240-247.

Patino, R., Kenneth, B.D., Jerolyn, E.S., Cevdetuguz, C.A., Strussmann, N.C., Parker, B.A.S. and Cheryl, A.G. 1996. Sex differentiation of Channel catfish gonads:normal development and effects of temperature. **Experimental Zoology.** 276 : 209-218.

Rajesh, B.R., Potty, V.P. and Sreelekshmy, S.G. 2016. Study of total phenol, flavonoids, tannin contents and phytochemical screening of various crude extracts of *Terminalia catappa* leaf, stem bark and fruit. **International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture.** 2(6): 291-296.

Reddon, A.R. and Peter, L.H. 2013. Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African fish (*Pelvicachromis pulcher*). **Zoology.** 116 : 139-143.

Redrawn, F.H. and Negahama, M. 1978. Fish reproductive endocrinology. Humanity Development Library. **Available Source :** http://www.nzdl.org, 9 กันยายน 2562.

Romer, U. and Beisenherz, W. 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology.** 48: 714-725.

Rubin, D.A. 1985. Effect of pH on sex ratio in *Cichlids* and *Poeciliid* (Teleostei). **Copeia.** 1985(1): 233-235.

Sarameh, S.P., Bahram, F., Ghobad, A.T. and Iraj, E. 2012. Effects of different photoperiods and handling stress on spawning and reproductive performance of pikeperch *Sander lucioperca*. **Animal Reproduction Science.** 132: 213-222.

Saxena, V., Garima, M., Akash, S. and Kamlesh, K.R.V. 2013. A comparative study on quantitative estimation of tannins in *Terminalia chebula, Terminalia belerica, Terminalia arjuna and Saracaindica* using spectrophotometer. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.** 6(3): 148-149.

Selim, K.M., Ai, S., Hiroyuki O., Satoshi, H. and Mitsuru, S. 2009. Effects of high temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes.* **Aquaculture**. 289: 340-349.

Srikrishnan, R., Hirimuthugoda, N. and Rajapakshe, W. 2017. Evaluation of growth performance and breeding habits of fighting fish (*Betta splendens*) under 3 diets and shelters. **Survey in Fisheries Sciences**. 3(2):50-65.

Sung, Y.Y. and Abol-Munafi, A.B. 2019. *Terminalia catappa* leaf extract is an effective rearing medium for larviculture of gouramis. **Journal of Applied Aquaculture.** 24: 1-12.

Tessema, M., Andreas, M.B. and Gabriele, H.S. 2006. Effect of rearing temperatures on the sex ratios of *Oreochromis niloticus* populations. **Aquaculture.** 258: 270-277.

Thepot, V. and Dean, R.J. 2015. The effect of temperature on the embryonic development of barramundi, the Australian strain of Lates calcarifer (Bloch) using current hatchery practices. **Aquacultre Reports.** 2: 132-138.

Veras, G.C., Luis, D.S.M., Priscila, V.R., Marcio G.Z., Matheus, S.S.F. and Jonathan, A.S.L. 2013. Effect of photoperiod on locomotor activity, growth, feed efficiency and gonadal development of Nile tilapia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 42: 844-849.

Vuorinen, P.J., Marja, V. and Seppo, P. 1990. Long-term exposure of adult whitefish (*Coregonus wartmanni*) to low pH/aluminium effects on reproduction, growth,blood composition and gill. **Acidification in Finland**. 941-961.

Wang, H.P., Ze-Xia, G., Dean, R., Paul, O.B., Hong, Y. and Xia-juan, C. 2014. Effects of temperature and genotype on sex determination and sexual size dimorphism of bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. **Aquaculture.** 420-421: S64-S71.

Wessels, S., Sarah, S. and Gabriele, H.S. 2011. Effect of early temperature treatments on sex differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* lines selected for high and low thermo-sensitivity. **Aquaculture.** 316: 139-142.

Zhang, G., Xiuqi, J., Xingda, Y. Peipei, W. and Shaowu, Y. 2016. Effect of water temperature on sex ratio and growth rate of juvenile *Pelteobagrus fulvidraco, P. vachelli* and hybrids [*P. fulvidraco x P. vachelli*]. **Aquaculture Reports**. 3: 115-119

ภาคผนวก

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1.1 นำตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ปลากัดเพศเมียและเพศผู้แช่ในน้ำ Bouin's solution นาน 48 ชั่วโมง และเปลี่ยนน้ำยารักษาสภาพเป็นแอลกอฮอล์ 70%

1.2 นำอวัยวะสืบพันธุ์ปลากัดตัดตามขวางใส่ในตลับเนื้อเยื่อและนำเข้า เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (tissue processor) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยผ่านกระบวนการ ดังนี้

- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 70% แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 80% แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 95% แอลกอฮอล์ นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 100% แอลกอฮอล์ (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 100% แอลกอฮอล์ (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน 100% แอลกอฮอล์ (ครั้งที่ 3) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน xylene (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน xylene (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน melted paraffin (ครั้งที่ 1) นาน 1 ชั่วโมง
- แช่ตัวอย่างเนื้อเยื่อใน melted paraffin (ครั้งที่ 2) นาน 1 ชั่วโมง

1.3 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใส่ในโมลสแตนเลส เติมพาราฟินให้เต็มและทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องก่อนนำไปแช่ในตู้เย็นเมื่อให้พาราฟินแข็งตัว

1.4 นำบล็อกเนื้อเยื่อออกจากโมลสแตนเลส ตัดแต่งให้บล็อกมีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูและนำไปตัดแต่งผิวหน้าบล็อกเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome)

1.5 ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome เป็นแผ่นยาวต่อกัน มีความหนา 4-5 ไมครอน ลอยในน้ำอุ่นเพื่อให้แผ่นพาราฟินที่ได้จากการตัดขยายตัวและตัดแบ่งเนื้อเยื่อลงแผ่นสไลด์ วางบนเครื่อง slide warmer นาน 24 ชั่วโมง

2. การย้อมสีตัวอย่าง

2.1 การย้อมสีเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ปลากัดโดยใช้สี hematoxylin และ eosin stain มีขั้นตอน ดังนี้

- แช่ xylene I นาน 3 นาที
- แช่ xylene II นาน 3 นาที
- แช่ absolute alcohol I นาน 2 นาที

- แช่ absolute alcohol II นาน 2 นาที
- แช่ 95% alcohol นาน 2 นาที
- แช่ 70% alcohol นาน 2 นาที
- ให้น้ำประปาไหลผ่าน นาน 5 นาที
- แช่ hematoxylin นาน 3 นาที
- ให้น้ำประปาไหลผ่าน นาน 5 นาที
- แช่ น้ำผสมแอมโนเนีย นาน 3 นาที
- ให้น้ำประปาไหลผ่าน นาน 5 นาที
- แช่ 50% alcohol นาน 2 นาที
- แช่ 70% alcohol นาน 2 นาที
- แช่ eosin stain นาน 5 นาที
- แช่ 95% alcohol นาน 1 นาที
- แช่ absolute alcohol I นาน 2 นาที
- แช่ absolute alcohol II นาน 2 นาที
- แช่ absolute alcohol III นาน 2 นาที
- แช่ xylene I นาน 3 นาที
- แช่ xylene II นาน 3 นาที
- Permount

3. การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity)

3.1 เตรียมตัวอย่างน้ำปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่และหยดสาร phenolphthalein 2 หยด ไตเตรทด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.02 N (1) ให้สารละลายใสไม่มีสี

3.2 จากนั้นหยดสาร methyl orange 2 หยด ไตเตรทด้วย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.02 N (2) ให้สารละลายมีสีส้มและจดบันทึกปริมาณสารละลาย H_2SO_4 ที่ใช้ในการไตเตรท นำมาคำนวณหาค่าความกระด้างทั้งหมด

3.3 คำนวณหาค่าความกระด้างทั้งหมด

ปริมาณความเป็นด่างทั้งหมด (mg/l as $CaCO_3$) = ปริมาณสารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.02 N (1) และ H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.02 N (2) x 10

4. การวิเคราะห์ค่าความกระด้างของน้ำ (Hardness)

4.1 เตรียมตัวอย่างน้ำ 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร

4.2 จากนั้นหยดสาร eriochrome black indicator 2 หยด ไตเตรทด้วย สารละลายมาตรฐาน EDTA ความเข้มข้น 0.01 M เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงแดงเป็นสีน้ำเงิน และจดบันทึกปริมาณสารละลาย EDTA ที่ใช้ในการไตเตรท

4.3 นำมาคำนวณหาค่าความกระด้างทั้งหมด

ความกระด้างของน้ำ (mg/l as $CaCO_3$) = ปริมาตรของสารละลาย EDTA x 20

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว สุกสกาว รอดปั้น
วัน เดือน ปีเกิด	7 เมษายน 2537
ที่อยู่	76/4 หมู่ 11แขวงศาลาธรรมสพน์ เขตทวีวัฒนา กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	2555-2559 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
	2560-ปัจจุบัน วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การประมง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง