

ผลของ pH จากน้ำหมักใบหูกวางต่อสัดส่วนเพศในปลากัดจีน

Effects of pH from Tropical Almond Leaves Extract on Sex Ratios of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan)

คำนำ

ปลากัด *Betta splendens* Regan เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่เป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงมาตั้งแต่โบราณ ทั้งนี้เพื่อไว้ดูเล่นและเพื่อเกมกีฬา ปัจจุบันปลากัดได้กลายเป็นปลาที่รู้จักกันแพร่หลายทั่วโลก ปลากัดที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทย มี 2 ชนิด คือ ปลากัดครีบยาวและปลากัดหม้อ ชนิดที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการส่งออกเป็นหลักคือปลากัดครีบยาวเพราะมีลักษณะครีบและสีอันสวยงาม ในขณะที่ปลากัดหม้อเพาะเลี้ยงเพื่อกีฬาปลากัดเป็นหลัก ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลากัดเป็นการค้าอย่างแพร่หลายจนกลายเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปริมาณการส่งออกปลากัดไปต่างประเทศมีประมาณ 100,000 ตัวต่อสัปดาห์ ซึ่งสามารถทำเงินเข้าประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท (อมรรัตน์, 2543)

ในการเพาะขยายพันธุ์ปลากัดทำได้โดยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วปลากัดเพศผู้เท่านั้นที่เป็นที่ต้องการของตลาด และสามารถขายได้ราคาดี ในการเลี้ยงปลากัดในประเทศไทยผู้เลี้ยงจะนิยมเลี้ยงปลากัดในน้ำแช่ใบหูกวางแห้ง โดยมีความเชื่อที่ว่าจะทำให้ปลากัดมีสุขภาพดีและเกล็ดแข็งแรง ซึ่งน้ำแช่ใบหูกวางแห้งจะมีสภาพเป็นกรด ในปลาสวยงามบางชนิดน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่มีสภาพความเป็นกรดจะทำให้สัดส่วนลูกปลามีเพศผู้มากกว่าเพศเมีย (Rubin, 1985)

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ pH จากใบหูกวางต่อสัดส่วนเพศในปลากัดจีน เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาแนวทางการเพิ่มสัดส่วนเพศผู้ในลูกปลากัดต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้จะแยกเพศของลูกปลาโดยใช้วิธีการทางมิถุนวิทยา ศึกษาอวัยวะภายในทั้งนี้เพื่อความแม่นยำในการเก็บข้อมูลเพราะหากรอให้ปลาเจริญเติบโตจนแสดงลักษณะเพศภายนอก จะมีผลของอัตราการอดมาเกี่ยวข้อง นอกจากนั้นแล้ว การศึกษาทางมิถุนวิทยาจะช่วยลดระยะเวลาในการทดลองลงได้มาก ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเวลาเมื่อปลากัดเริ่มมีการเจริญของอวัยวะเพศภายในเป็นเพศใดเพศหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเวลาเมื่อเริ่มเกิดการพัฒนาอวัยวะเพศภายใน
2. ศึกษาค่าพีเอชของน้ำหมักไบโหุงวาง
3. ศึกษาผลของพีเอชจากน้ำหมักไบโหุงวางต่อสัดส่วนเพศในปลากัด
4. ศึกษาผลของน้ำหมักไบโหุงวางพีเอชต่าง ๆ ต่ออัตราการรอดของเชื้อตัวผู้

การตรวจเอกสาร

ปลากัด

ปลากัดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Betta splendens* Regan มีชื่อสามัญว่า Siamese Fighting Fish จัดอยู่ในครอบครัว Belontiidae (Nelson, 1994) แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติทั่วทุกภาคของประเทศ อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนิ่ง เช่น ห้วย หนอง คลอง บึง ฯลฯ ในบริเวณที่มีระดับน้ำตื้น ๆ ค่อนข้างใส ลักษณะสำคัญของปลาในครอบครัวนี้คือ มีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจนอกเหนือจากเหงือกเรียก labyrinth organ (Smith, 1954; Whitem, 1962) ทำให้ปลากัดสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่ไม่มีออกซิเจนได้

ปลากัดพันธุ์ดั้งเดิมในธรรมชาติมีสีน้ำตาลขุ่น หรือสีเทาแกมเขียว ครีบและหางสั้น ปลาเพศผู้มีครีบและหางยาวกว่าปลาเพศเมียเล็กน้อย จากการเพาะพันธุ์และการคัดพันธุ์ทำให้ได้ปลากัดที่มีสีสันสวยงามหลากหลายสี อีกทั้งลักษณะครีบก็แผ่กว้างใหญ่สวยงามกว่าพันธุ์ดั้งเดิมมาก และจากสาเหตุนี้ ทำให้มีการจำแนกปลากัดออกไปได้หลายประเภท โดยแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 3 ประเภท (พิชัย, 2527) ดังนี้

ปลากัดป่า หรือปลากัดลูกทุ่งอาศัยตามท้องร่อง หนอง คลอง บึง มีความยาวลำตัวประมาณ 2 เซนติเมตร ตัวผู้มีครีบออกหรือที่เรียกว่าตะเกียบยาว ครีบหางยาว ครีบหลังหรือที่เรียกว่ากระโดงยาว หางกลมเป็นรูปใบโพธิ์สีของลำตัวเป็นสีน้ำตาลอ่อนหรือหางที่ค่อนข้างดำ ตัวเมียมีลักษณะต่างจากตัวผู้คือ ตะเกียบสั้น หางเล็กมีสีซีด ตามลำตัวมีทางดำ 2 ทาง ขนานกับลำตัว ปลากัดป่าเวลาตกใจจะมีสีขาวซีด หางหุบลิบ กัดไม่เก่ง

ปลากัดลูกหม้อ หรือปลากัดหม้อ เป็นปลาที่เลี้ยงไว้ตามบ้าน ตัวโตกว่าปลากัดป่า แต่ครีบยาว กระโดงสั้นกว่า หางสั้นเป็นรูปพัด เป็นปลาที่นิยมในหมู่คนเลี้ยงปลากัด เพราะทรหดอดทน ปราดเปรียวไม่ตื่นคน ไม่ตกใจง่าย และกัดเก่งมาก มีสีน้ำเงิน แดง เทา เขียว คราม และสีแดงปนน้ำเงิน

ปลากัดจีน หรือปลากัดเขมร เป็นปลากัดที่มีสีสันสวยงาม งดงาม ลำตัวมีสีขาว ดำ หรือแดง เขียว ฟ้ามี่ครีบยาว กระโดง ตะเกียบยาวมาก ปลาชนิดนี้นิยมเลี้ยงไว้ดูเล่นเพื่อความสวยงามไม่ค่อยนิยมให้กัดกัน เพราะส่วนประกอบของลำตัวยาวไม่ว่องไวในการต่อสู้

การศึกษาโครโมโซมของปลากัดหม้อและปลากัดจีน พบว่า ปลากัดหม้อและปลากัดจีนต่างมีจำนวนโครโมโซม 21 คู่ และยังมีคาริโอไทป์ (karyotype) เหมือนกันทุกประการ Ratanatham and Patinawin (1979) ทดลองผสมพันธุ์ระหว่างปลากัดชนิดที่มีครีบยาวและครีบสั้นพบว่าสามารถผสมพันธุ์กันได้ เปอร์เซนต์การฟักเป็นตัวและอัตราการรอดของลูกผสมไม่มีความแตกต่างกับลูกที่เกิดจากการผสมพันธุ์ระหว่างปลากัดพวกเดียวกัน จากการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลากัดทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นชนิดเดียวกัน

วันเพ็ญ และคณะ (2531) ศึกษาการเพาะพันธุ์ปลากัดโดยใช้วิธีเลียนแบบธรรมชาติโดยปล่อยปลาเพศผู้และเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ทางเพศให้ผสมพันธุ์กันเองในภาชนะแคบ ๆ เมื่อปลาผสมพันธุ์วางไข่แล้วแยกปลาเพศเมียออก ปล่อยให้ปลาเพศผู้เฝ้าดูแลไข่ จนกระทั่งไข่ฟักออกเป็นตัว ไข่ปลากัดที่ผสมแล้วจะพัฒนาโดยการแบ่งเซลล์เป็นตัวปลาในเวลา 5-6 ชั่วโมง ลูกปลาจะเริ่มเคลื่อนไหวภายในเวลาประมาณ 30 ชั่วโมง และจะฟักออกจากไข่ในเวลาประมาณ 36 ชั่วโมง ลูกปลาที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะเกาะอยู่ที่หัวอดมีถุงอาหารติดตัวมาด้วย ลูกปลาจะใช้อาหารจากถุงอาหารหมดภายในเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มให้อาหาร เมื่อปลามีอายุ ประมาณ 1.5 เดือน แยกปลากัดเลี้ยงเดี่ยว ๆ (เพียงตัวเดียว) ในภาชนะแคบ ๆ

การพัฒนาเป็นสองเพศ

สุปราณี และคณะ (2534) ศึกษาการเกิดอวัยวะต่าง ๆ ของลูกปลากัด เมื่อลูกปลากัดมีอายุหนึ่งวันหลังจากไข่ฟักออกเป็นตัว ลูกสะสมอาหารจะแยกจากส่วนของลำตัวชัดเจน และยุบหายไปหมดเมื่อปลากัดมีอายุ 4 วัน ลูกปลากัดจะมีลักษณะภายนอกและภายในเหมือนตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 15 วัน และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พัฒนาแยกเป็นรังไข่และอัณฑะ อย่างไรก็ตามจากรายงานพบว่าระยะของ oocyte ที่ปรากฏอยู่ในระยะที่ค่อนข้างพัฒนามากแล้ว มีความเป็นไปได้ว่า การเจริญเป็นเพศเมียอาจจะเริ่มก่อนหน้า

แบบแผนการควบคุมเพศ

Lowe and Larkin (1975) พบว่า การเปลี่ยนเพศปลากัดเพศเมียเป็นเพศผู้โดยผ่าตัดครึ่งไข่ จากนั้นนำเพศเมียที่เปลี่ยนเพศเป็นเพศผู้โดยการผ่าตัดครึ่งไข่ผสมกับเพศเมียปกติจำนวน 11 คู่ มีอยู่ 8 คู่ เท่านั้นที่ให้ลูกเพศเมีย 100 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 3 คู่ ให้ลูกเพศผู้ ซึ่งแต่ละคู่จะให้ลูกเพศเมีย 55, 71, 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเปอร์เซ็นต์ของลูกปลาเพศเมียที่ได้อาจขึ้นอยู่กับยีนของพ่อแม่ปลาซึ่งเป็นเพศเมียทั้งคู่ และยังทดลองพบว่าปลากัดเพศผู้ไม่น่ามีโครโมโซมเพศเป็น heterogametic sex (XY) ในทำนองเดียวกันเพศเมียไม่ควรจะมีโครโมโซมเพศเป็น homogametic (XX)

ผลของพีเอชต่อสัตว์น้ำ

พีเอชของน้ำธรรมชาติโดยทั่ว ๆ ไปจะมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-9.0 พีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไปจะเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยอาจเกิดจากการที่เนื้อเยื่อเหงือกถูกทำลาย การผลิตเมือกบริเวณเหงือกซึ่งไปขัดขวางการหายใจ กระบวนการแลกเปลี่ยนน้ำและเกลือแร่หมดประสิทธิภาพและการที่เลือดอยู่ในสภาวะเป็นกรด ระดับพีเอชที่ไม่ถึงกับเป็นสาเหตุให้สัตว์น้ำตายก็อาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและความต้านทานโรคของสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตาม Rubin (1985) พบว่า พีเอชต่ำมีผลให้สัดส่วนเพศของลูกปลาเปลี่ยนแปลง โดยมีปลาเพศผู้มากขึ้นในปลา *Apistogramma borelli* (พีเอช 5.80), *A. caucatoides* (พีเอช 5.80), *Pelvicachromis pulcher* (พีเอช 5.05), *P. subocellatus* (พีเอช 5.40), *P. taeniatus* (พีเอช 5.50) และ *Xiphophorus helleri* (พีเอช 6.20) Römer and Beisenherz (1996) พบว่าพีเอชที่ระดับ 4.50 ทำให้สัดส่วนเพศของลูกปลา *Poecilia melanogaster* มีเพศผู้มากกว่าเพศเมีย

Ruby *et al.* (1978) ศึกษาผลของการลดค่าพีเอชในปลา flagfish (*Jordanella floridae*) พบว่า ในสภาพพีเอช 6.0, 5.5, 5.0 และ 4.5 ทำให้กระบวนการสร้างสปิร์มลดลง 24.03, 27.03, 37.28 และ 35.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกันการพัฒนาไข่และไข่ในปลา flagfish ก็มีการพัฒนาลดลงด้วย

ต้นहुกวาง

ต้นहुกวางเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูง 15-20 เมตร เป็นไม้ผลัดใบ จัดอยู่ในวงศ์ Combretaceae ชนิดที่พบในประเทศไทยคือ *Terminalia catappa* Linn. มีชื่อสามัญว่า Tropical Almond หรือ India Almond ต้นहुกวางมีเรื้อนยอดค่อนข้างกลมหรือเป็นรูปพีระมิดหนาที่ใบ เปลือกต้นมีสีเทาแตกเป็นร่องตื้น ๆ มีการแตกกิ่งในแนวราบ สามารถทนน้ำท่วมขังได้และยังมีระบบรากที่แข็งแรง

ใบของต้นहुกวางเป็นใบเดี่ยว เรียงเวียนสลับถี่ที่ปลายกิ่งรูปไข่กลับ มีความกว้าง 8-15 เซนติเมตร ยาว 12-15 เซนติเมตร ปลายใบมีติ่งแหลม โคนใบสอบแคบ เว้า และมีต่อม 1 คู่ แผ่นใบหนา มีขนนุ่ม ขอบใบเรียบ ต้นहुกวางออกดอกเป็นช่อที่ซอกใบหรือบริเวณปลายกิ่ง โคนกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็น 5 แฉกรูปสามเหลี่ยม ช่อดอกมีลักษณะเป็นแท่งยาว 8-12 เซนติเมตร ดอกมีสีขาว ไม่มีกลีบดอก ดอกเพศผู้อยู่ปลายช่อ ดอกสมบูรณ์เพศอยู่บริเวณโคนช่อ ต้นहुกวางจะออกดอกเดือน กุมภาพันธ์-เมษายน และสิงหาคม-ตุลาคม ผลของต้นहुกวางเป็นรูปไข่หรือรูปรี ป้อมและแบนเล็กน้อย มีความกว้าง 2-5 เซนติเมตร ยาว 3-7 เซนติเมตร สีเขียว เมื่อแก่แห้งจะเป็นสีคล้ำ (Gilman and Watson, 1994)

ในประเทศได้ค้นพบว่าสามารถใช้ใบहुกวางเป็นยาสมุนไพรพื้นบ้านซึ่งมีผลเกี่ยวกับการบำบัดโรคตับ (Lin and Kan, 1990) และจากการศึกษาพบว่าในใบहुกวางจะมีสารประกอบพวก tannins เช่น punicalagin, punicalin, terflavins A และ B, tergalagin, tercatanin, chebulagic acid, geraniin, granatin B และ corilagin แต่ไม่พบ caffeine (Tanaka *et al.*, 1986)

Chen *et al.* (2000) ทำการสกัดสารจากใบहुกวางพบว่าใบहुกวางมีสารประกอบส่วนใหญ่เป็นพวก tannin ที่มีชื่อว่า punicalagin ซึ่งมีผลยับยั้งการเหนี่ยวนำการเกิดความเป็นพิษต่อพันธุกรรม เนื่องจากมีความสามารถในการเป็นสารประกอบพวกสารต้านอนุมูลอิสระและจากการศึกษาพบว่าในใบहुกวางมีสารสกัดพวก methylene chloride และ methanol ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Goun *et al.*, 2003)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลากัด
2. อุปกรณ์สำหรับใช้ในการวิเคราะห์น้ำ
 - เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Oxyguard) รุ่น Handy Gamma
 - เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น YSI 63
3. อุปกรณ์สำหรับศึกษาทางมิถุนวิทยา
 - เครื่องจัดเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Automatic tissue processor)
 - เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome)

วิธีการ

1. ศึกษาเวลาเมื่อเริ่มเกิดการพัฒนาอวัยวะภายใน

1.1 ศึกษากายวิภาคระบบสืบพันธุ์ของปลากัดทั้งสองเพศ

นำปลากัดจันในระยะเวลาโตเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียเพศละ 4 ตัวมาทำการฆ่าและเก็บรักษาไว้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นนำมาผ่าตัดเพื่อศึกษาดำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งสองเพศภายใต้กล้องกำลังขยายต่ำ ทำการถ่ายภาพและบันทึกลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งสองเพศ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับกำหนดตำแหน่งในการตัดตามขวางของลูกปลาในระยะวัยอ่อน ซึ่งจะนำผลการทดลองในการทดลองนี้ไปใช้ในการทดลองที่ 1.2 ต่อไป

1.2 ศึกษาระยะเวลาเริ่มเกิดการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นอณฑะและรังไข่

ทำการเพาะลูกปลากัดจันโดยคัดพ่อแม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เต็มที่และพร้อมจะผสมพันธุ์มาจำนวน 3 คู่ ทำการผสมพันธุ์ เมื่อลูกปลากัดฟักออกจากไข่และมีอายุครบ 3 วัน จึงเริ่มเก็บตัวอย่างลูกปลา จำนวนชุดละ 10 ตัว คองไว้ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลากัดทุกวัน จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 15 วัน นำตัวอย่างลูกปลาที่แช่ฟอร์มาลินแล้วเป็นเวลาไม่น้อย

กว่า 24 ชั่วโมง ผ่านน้ำยาแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก (50-100%) เพื่อคูดน้ำออกจากเซลล์ แล้วผ่านไซลีน 2 ครั้ง จากนั้นจึงผ่านพาราฟิน 2 ครั้ง ฝัง (embed) ตัวอย่างชิ้นเนื้อในพาราฟิน แล้วทำให้แข็งเป็นแท่ง นำตัวอย่างไปตัดตามขวางความหนาประมาณ 5-6 ไมครอน ซึ่งลูกปลาทุกตัวจะถูกตัดตามขวางในแนวตัดผ่านระหว่างผนังด้านท้ายของช่องท้องไปทางด้านหน้าจนถึงช่องทวารซึ่งในบริเวณดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งสองเพศ (เป็นข้อมูลที่ได้มาจากผลการทดลองที่ 1.1) ตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อจะถูกย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E) โดยวิธีของ Humason (1979) จากนั้นนำไปถ่ายรูปอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 400 และ 1000 เท่า

2. ศึกษาผลของไบฮูควางต่อค่าพีเอชของน้ำ

นำไบฮูควางแก่ที่ร่วงจากต้นมาทำความสะอาดโดยวิธีการล้าง จากนั้นนำมาอบในตู้อบเพื่อไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4-6 ชั่วโมง นำไบฮูควางที่อบแห้งแล้ว มาป่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จากนั้นทำการทดลองหมักไบฮูควางโดยวิธีการนำเอาผงไบฮูควางที่ได้จากการบดให้ละเอียดด้วยเครื่องป่นนำมาชั่งน้ำหนักแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มมีน้ำหนักไบฮูควางเท่ากับ 1.25, 2.5 และ 5 กรัม ตามลำดับ นำไบฮูควางบดที่ชั่งแล้วจากแต่ละกลุ่มไปละลายในน้ำประปาที่พักไว้นาน 3 วัน ในปริมาตรน้ำ 1 ลิตร หลังจากนั้นคนไบฮูควางให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกับน้ำเป็นระยะเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อแยกเอาเศษตะกอนไบฮูควางที่ไม่ละลายน้ำทิ้งไป เก็บน้ำที่ผ่านการกรองแยกใส่ภาชนะขนาด 1 ลิตร และ ติดตามวัดค่าพีเอชของน้ำหมักไบฮูควางที่ได้จากการละลายผงไบฮูควางที่น้ำหนักต่าง ๆ กัน โดยมีน้ำประปาที่พักไว้ 3 วัน เป็นชุดควบคุมการทดลอง ทำการวัดพีเอช ที่เวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

3. ศึกษาผลของพีเอชจากไบฮูควางต่อสัดส่วนเพศในปลากัด

ทดลองเพาะพันธุ์ปลากัดในน้ำหมักไบฮูควางระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ซึ่งมีพีเอช เท่ากับ 7.8, 6.8, 6.4 และ 5.5 ตามลำดับ (ซึ่งเป็นผลจากการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ได้จากการละลายผงไบฮูควางที่น้ำหนัก 0, 1.25, 2.5 และ 5 กรัม ตามลำดับ) สำหรับปลาทดลองใช้ปลากัดที่เจริญพันธุ์จาก ตำบลวังตะกู ตำบลมาบแค และ ตำบลสามควายเผือก จังหวัดนครปฐม ซึ่งปลากัดทั้ง 3 ตำบลเป็นปลากัดที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม (Meejui *et al.*, 2005) ทำการผสมพันธุ์โดยผสมแยกคู่ใช้ตัวผู้และตัวเมียจากประชากรเดียวกันในอัตราส่วน 1:1 ทำการผสมประชากรละ 2 คู่ผสมต่อ

1 ระดับฟิเอช (รวมเป็น 6 คู่สมต่อ 1 ระดับฟิเอช) ปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์ในน้ำหมักใบหูกวางแต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อสังเกตเห็นว่าปลาตัวเมียวางไข่หมดแล้ว ให้รับนำปลาตัวเมียออก ปล่อยให้ปลาตัวผู้ดูแลไข่ จนฟักเป็นตัวโดยใช้เวลาประมาณ 36 ชั่วโมง แต่ยังคงปล่อยให้ปลาตัวผู้ดูแลลูกปลาต่อไปจนกว่าลูกไข่แดงของลูกปลาจะยุบซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน

หลังจากลูกไข่แดงของลูกปลายุบนับจำนวนลูกปลาที่รอดชีวิต ไข่เสีย และลูกปลาที่ตายเพื่อเก็บข้อมูล จากนั้นนำลูกปลามาใส่ในภาชนะขนาด 26.5 x 46 x 17 ลูกบาศก์เซนติเมตร อนุบาลลูกปลาที่ความหนาแน่น 40 ตัว/ลิตร โดยใช้น้ำประปาที่ฟักไว้ อนุบาลลูกปลาด้วยไรแดงที่มีขนาดเล็กเป็นเวลา 3-5 วัน แล้วจึงค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นไรแดงตัวเต็มวัย เมื่อลูกปลามีอายุ 15 วัน เก็บตัวอย่างลูกปลาทั้งหมดซึ่ง-วัด และนำไปผ่านวิธีการศึกษาทางมิชววิทยาเพื่อแยกเพศ ทดสอบสัดส่วนระหว่างเพศผู้ และเพศเมียในแต่ละช่วง pH โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2 (chi-square test) ตามวิธีของ Sokal and Rohlf (1969) วิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอด น้ำหนัก และความยาว เปอร์เซ็นต์การเกิดลูกปลาเพศผู้ ตามแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's new multiple rang test (Steel and Torrie, 1986) ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าฟิเอชกับเปอร์เซ็นต์ลูกปลาเพศผู้โดยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation analysis) ตามวิธีของ Sokal and Rohlf (1969)

4. ศึกษาผลของน้ำหมักใบหูกวางฟิเอชต่าง ๆ ต่ออัตราการรอดของเชื้อตัวผู้

ทำการศึกษาอัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ที่ระดับฟิเอชต่าง ๆ กัน 3 ระดับ ซึ่งเป็นระดับฟิเอชที่มีการวางไข่ผสมพันธุ์ (จากการทดลองที่ 3) ได้แก่ ที่ระดับฟิเอชที่ 7.8, 6.8 และ 6.4 วิธีการศึกษาผลของฟิเอชต่ออัตราการรอดของเชื้อตัวผู้มีดังนี้ ทำการฆ่าตัดเพื่อนำอณูออกมาจากปลากัดตัวผู้จำนวน 1 ตัว หลังจากนั้นนำมาขยี้ในน้ำที่ใช้ในการทดสอบ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ทิ้งไว้นาน 1 และ 2 นาที จากนั้นใส่สี eosin-nigrosin แล้วทำการ smear บนสไลด์อุ่น (40 องศาเซลเซียส) ปล่อยให้แห้ง 3 นาที แล้วนำมาตรวจดูตัวเป็น-ตัวตายภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยายเท่ากับ 1000 เท่า ซึ่งในแต่ละระดับฟิเอชทำตามขั้นตอนดังกล่าวจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแต่ละครั้งใช้อณูจากตัวผู้ 1 ตัว การหาอัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ทำโดยจำแนกและนับจำนวนเชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตได้โดยการสังเกตลักษณะการติดสีของเชื้อตัวผู้โดยที่เชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตจะมีลักษณะใสไม่ติดสี ส่วนเชื้อตัวผู้ที่ตายจะติดสี นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์เชื้อตัวผู้ที่มีชีวิต และทำการ

วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนน้ำเชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตโดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2 (chi-square test) ตามวิธีของ Sokal and Rohlf (1969)

5. สถานที่ทำการศึกษา

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนตุลาคม 2547 ถึง เดือนมีนาคม 2548

ผลการศึกษา

1. ผลการศึกษาเวลาเมื่อเริ่มเกิดการพัฒนาอวัยวะภายใน

1.1 ผลการศึกษากายวิภาคระบบสืบพันธุ์ปลากัดทั้งสองเพศ

ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ปลากัดพบว่า อวัยวะสืบพันธุ์ของปลากัดอยู่ในบริเวณด้านท้ายของช่องท้อง โดยพบอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีลักษณะเป็นเส้น 2 เส้น สีครีม ขนาบอยู่ติดกับทางด้านท้ายของระบบทางเดินอาหารและมีเยื่อยึดติดกับผนังด้านท้ายของช่องท้อง (ภาพที่ 1) ส่วนอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีลักษณะเป็นพู่ 2 พู่ รูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่ สีครีม โดยสามารถเห็นไข่ที่สุกเต็มที่กระจายตัวอยู่ตามผิวด้านนอกของรังไข่ นอกจากนี้รังไข่ไม่ได้จำกัดบริเวณอยู่ในช่องท้องเท่านั้น โดยทางด้านท้ายของรังไข่จะแทรกตัวไปเข้าไปอยู่ในช่องว่างภายในส่วนหน้าของลำตัวอีกด้วย (ภาพที่ 2)

ลักษณะของเนื้อเยื่ออวัยวะและรังไข่ของปลากัดที่โตเต็มวัย จะสามารถพบ เซลล์สืบพันธุ์ใน ระยะต่าง ๆ โดยสามารถแบ่งออกเป็น ระยะต่าง ๆ ดังนี้

อวัยวะประกอบด้วยเซลล์ spermatogonia มีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ขอบเขตของเซลล์ชัดเจน ส่วนไข่โตพลาสซึมติดสีชมพูไม่สม่ำเสมอ และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีจางกว่า ภายในมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่ 1 อัน primary spermatocytes เป็นระยะถัดจาก spermatogonia มีลักษณะเซลล์กลมขนาดเล็กกว่า spermatogonia นิวเคลียสเห็นเป็นกลุ่มชัดเจน ไข่โตพลาสซึมติดสีชมพู ส่วน secondary spermatocytes มีลักษณะเซลล์ขนาดเล็กกว่า primary spermatocytes ภายในนิวเคลียสเห็นกลุ่ม chromatin ชัดเจนขึ้น ไข่โตพลาสซึมมีจำนวนน้อยลง spermatids มีลักษณะเซลล์ขนาดเล็กกว่า secondary spermatocytes นิวเคลียสติดสีน้ำเงินชัดเจน ไข่โตพลาสซึมมีจำนวนน้อยมาก (ภาพที่ 3)

รังไข่ประกอบด้วยไข่ทุกระยะ โดยพบ oogonia ซึ่งอยู่รวมกันเป็นกลุ่มขนาดเล็ก แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน รูปร่างกลมรี ไข่โตพลาสซึมติดสีชมพูจาง ๆ นิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ติดสีแบบเดียวกับไข่โตพลาสซึม ภายในมีนิวคลีโอลัส 1 อัน ไข่ระยะที่ 2 ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ไข่โตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ ไข่ระยะที่ 3 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีลักษณะเป็นเหลี่ยม และมีการพัฒนาของ follicular cell มากขึ้น ไข่โตพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสติดสีชมพู ภายในนิวเคลียสจะมี provitelline nucleoli เห็นเป็นเม็ดกลม ๆ ติดสีน้ำเงินเข้ม

ไข่ระยะที่ 4 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก พบ euvitelline nucleoli อยู่ที่ขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส นิวเคลียสกลมติดสีชมพู ไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงินจางลงเมื่อเปรียบเทียบกับระยะที่ 2 และ 3 ภายใน ไซโทพลาสซึมเริ่มพบ fat vacuoles และ yolk granules กระจายอยู่ใกล้ขอบผนังไข่ ไข่ระยะที่ 5 ไข่ ในระยะนี้มีขนาดใหญ่กว่าระยะที่ 4 ไซโทพลาสซึมติดสีน้ำเงิน ภายในมี fat vacuoles และ yolk granules จำนวนมากขึ้นกระจายอยู่บริเวณใกล้ของผนังไข่ ระยะที่ 6 ไข่ในระยะนี้ภายใน ไซโทพลาสซึมเต็มไปด้วย fat vacuoles ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และ yolk granules ติดสีแดงสด นิวเคลียส มีขนาดเล็กติดสีชมพู ผนังที่ล้อมรอบไข่ระยะนี้จะหนาไม่เท่ากันตลอด (ภาพที่ 4)

จากลักษณะเนื้อเยื่อของรังไข่และอัณฑะ พบว่า เซลล์เบื้องต้นที่เป็นหน่วยเล็กที่สุดของ เซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศ คือ spermatogonia กับ oogonia จะมีความแตกต่างกันทั้งทางด้านขนาด และลักษณะขององค์ประกอบภายในเซลล์ โดยพบว่า spermatogonia มีรูปร่างกลม ขนาดเซลล์ใหญ่ กว่า oogonia ขอบเขตของเซลล์ชัดเจน ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูไม่สม่ำเสมอ และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีจางกว่า ภายในมีนิวคลีโอไลด์ขนาดใหญ่ 1 อัน ส่วน oogonia เป็นเซลล์รูปร่างกลมรี ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูจาง ๆ นิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ติดสีแบบเดียวกับไซโทพลาสซึม ภายในมีนิวคลีโอไลด์ 1 อัน ซึ่งสามารถนำข้อมูลดังกล่าวไปใช้เป็นตัวชี้วัดสำหรับการจำแนกเพศของ ลูกปลากัดในการทดลองต่อไปเพื่อหาระยะเวลาเริ่มการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ไปเป็นอัณฑะและรังไข่ต่อไป

นอกจากนี้จากผลการศึกษาคำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งสองเพศในปลากัดที่โตเต็มวัย สามารถนำไปใช้ในการจำแนกเพศของลูกปลากัดที่มีอายุ 15 วัน ได้ โดย พบว่า อัณฑะและรังไข่ ของปลากัดจะมีตำแหน่งใกล้เคียงกับที่พบในปลาที่โตเต็มวัย ส่วนรังไข่ในปลากัดที่มีอายุ 15 วัน จะมีรังไข่ที่จำกัดบริเวณอยู่ในช่องท้องเท่านั้น นอกจากนั้นจะสามารถจำแนกเพศของลูกปลาที่มีอายุ 15 วัน ได้โดยดูจากรูปร่างลักษณะอวัยวะและลักษณะของเซลล์ที่อยู่ภายใน โดยมองผ่านกล้อง กำลังขยายต่ำ (ภาพที่ 5) โดยอัณฑะจะมีลักษณะเป็นเส้นยาวทอดตัวอยู่ในส่วนท้ายของช่องท้อง โดย ทอดตัวเริ่มต้นจากทางด้านล่างของถุงลมไปสิ้นสุดที่ช่องเปิดเพศ ส่วนรังไข่จะจำกัดบริเวณวางตัวอยู่ ระหว่างลำไส้และผนังด้านท้ายของช่องตัว โดยมีรูปร่างเป็นพวงขนาดใหญ่มากกว่าอัณฑะอย่างเห็นได้ ชัด นอกจากนั้น เมื่อใช้กำลังขยายประมาณ 300 เท่า จะสามารถมองเห็นเซลล์ไข่ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่กำลังขยายเท่ากัน จะไม่สามารถมองเห็นรายละเอียดของเซลล์ที่อยู่ในอัณฑะได้

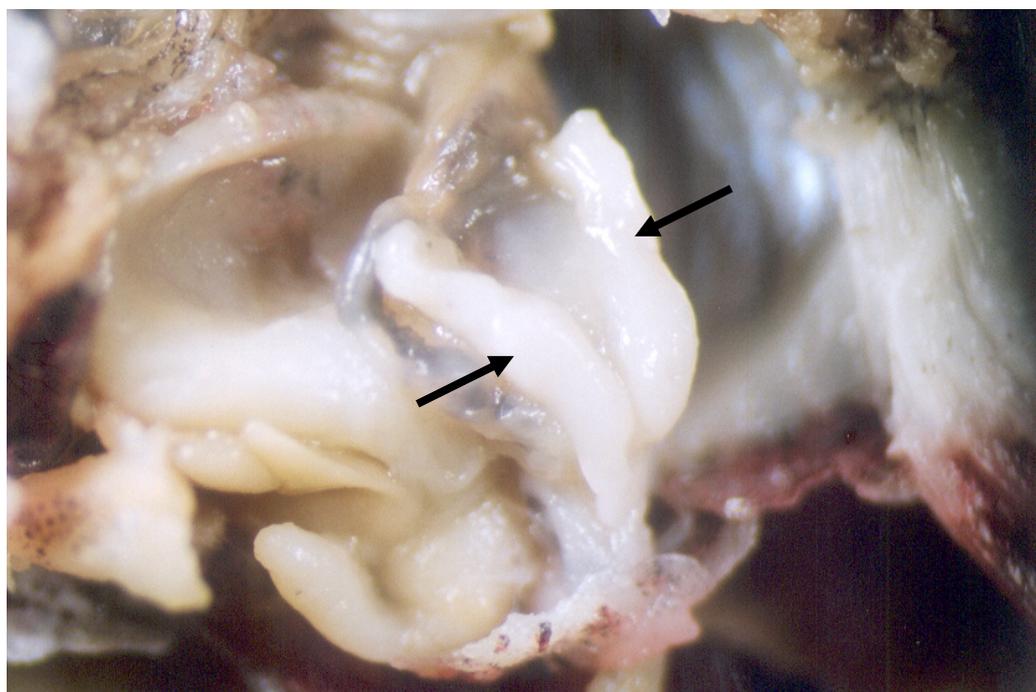
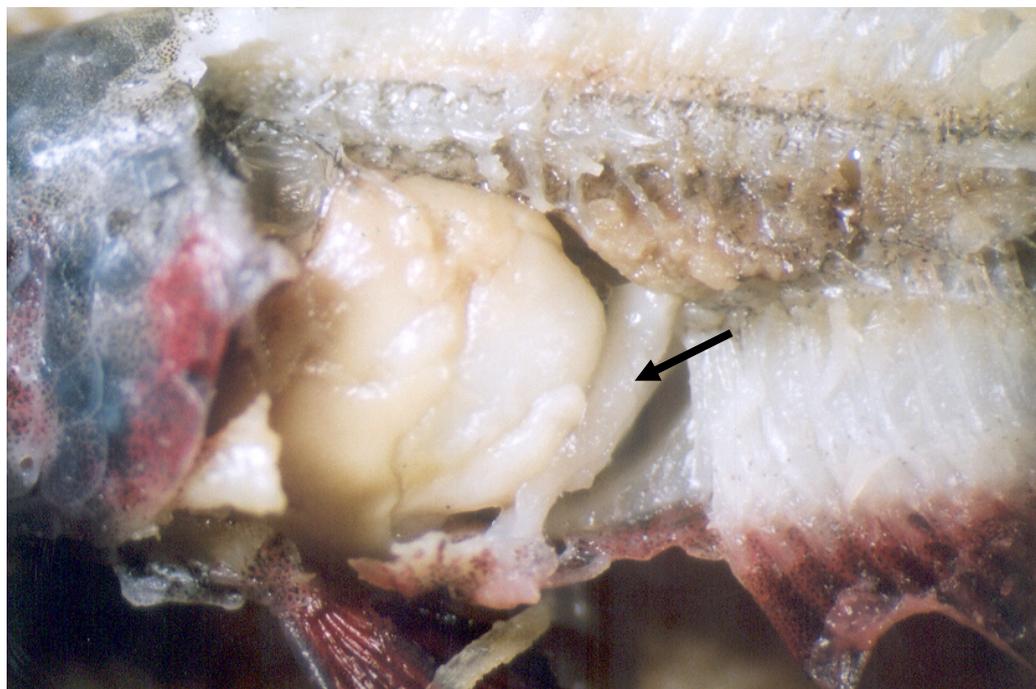
1.2 ผลการศึกษาระยะเวลาเริ่มเกิดการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นอวัยวะและรังไข่

ลักษณะทางมิชรูวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกปลากัดอายุ 3 และ 4 วัน พบว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกปลากัด มีตำแหน่งเกาะติดอยู่ทางด้านล่างของถุงลม อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกปลาทั้ง 10 ตัว ยังไม่สามารถจำแนกเป็นรังไข่ (ovary) และ อัณฑะ (testis) ได้ตามภาพที่ 6

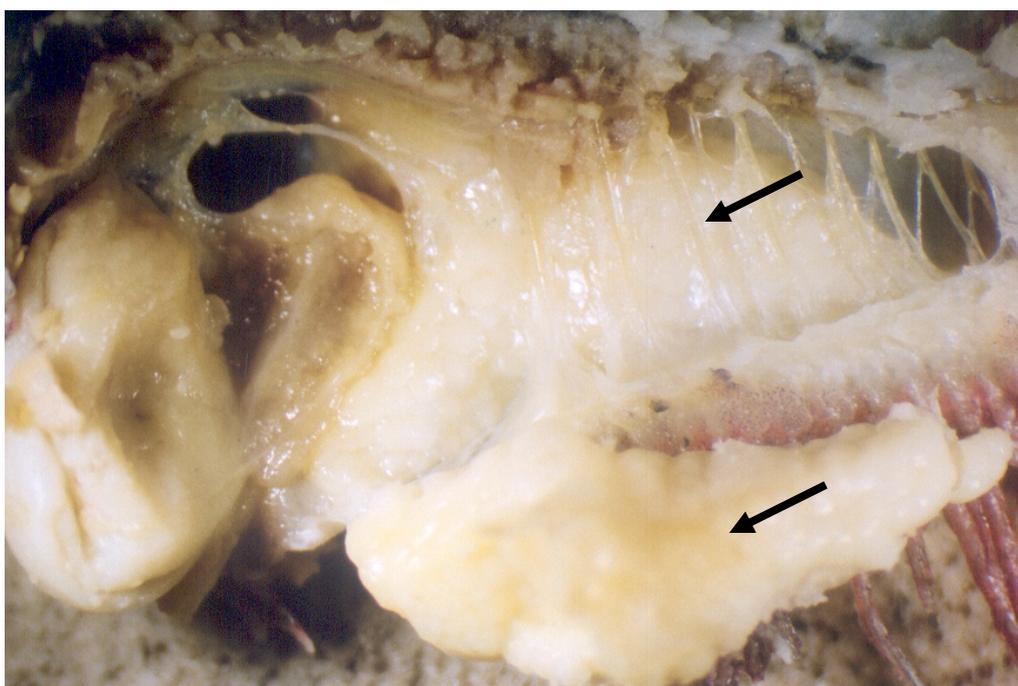
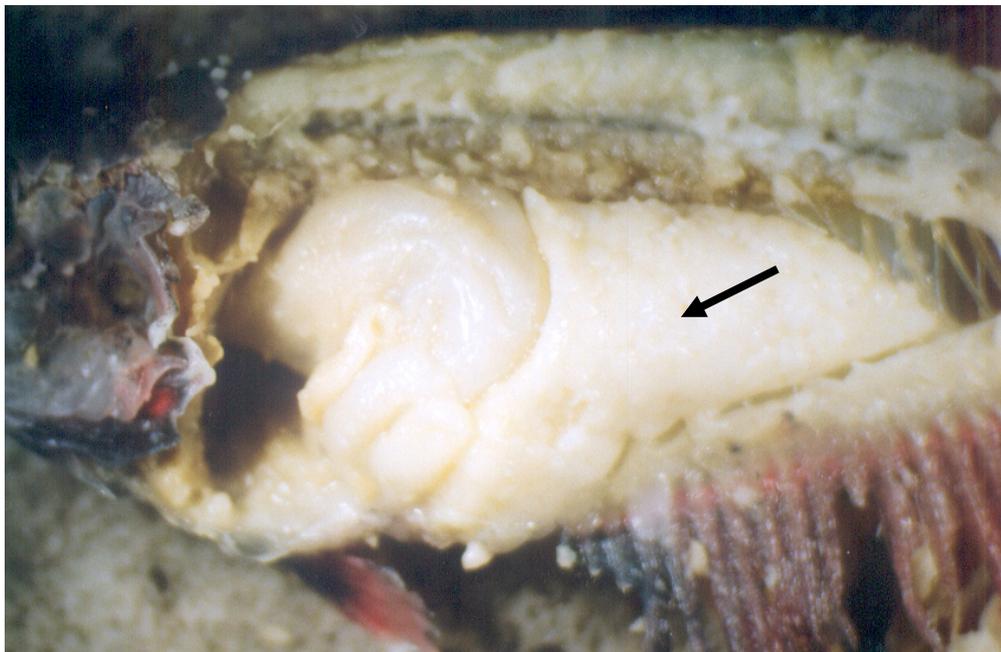
ลูกปลากัดอายุ 5 วัน พบตัวอย่าง 4 ตัว มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเป็นอัณฑะแล้ว โดยอัณฑะในระยะนี้จะพบ spermatogonia อยู่ภายในโดยมีลักษณะเป็นเซลล์กลมขนาดใหญ่ เห็นขอบเขตของเซลล์ได้ชัดเจน ส่วนไซโทพลาสซึมติดสีชมพูไม่สม่ำเสมอ และมี นิวเคลียสขนาดใหญ่ ติดสีจางกว่า ภายในมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ 1 อัน รอบ ๆ ผนังนิวเคลียสมี granule ติดอยู่ เซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ติดอยู่กับผนัง lobule ที่ข้าง ๆ เซลล์มี Sertoli cell ติดอยู่ (ภาพที่ 7) ลูกปลากัด 6 ตัว ในระยะนี้ ยังไม่พบอวัยวะสืบพันธุ์ภายในที่มีลักษณะของรังไข่

ลูกปลาอายุ 8 วัน เป็นระยะที่สามารถพบการเปลี่ยนแปลงจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นรังไข่ได้ โดยพบลูกปลา 6 ตัว มีการพัฒนาการของรังไข่ ในระยะนี้จะพบ จะพบ oogonia มีเซลล์รูปร่างกลมรี มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับ spermatogonia ไซโทพลาสซึมติดสีชมพูจาง ๆ นิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ติดสีเบบเดียวกับไซโทพลาสซึม ภายในมีนิวเคลียส 1 อัน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 9) ส่วนปลากัดเพศผู้ 4 ตัว จะมีการขยายตัวของอัณฑะมากขึ้น โดยภายในอัณฑะจะสามารถพบ spermatogonia จำนวนมาก

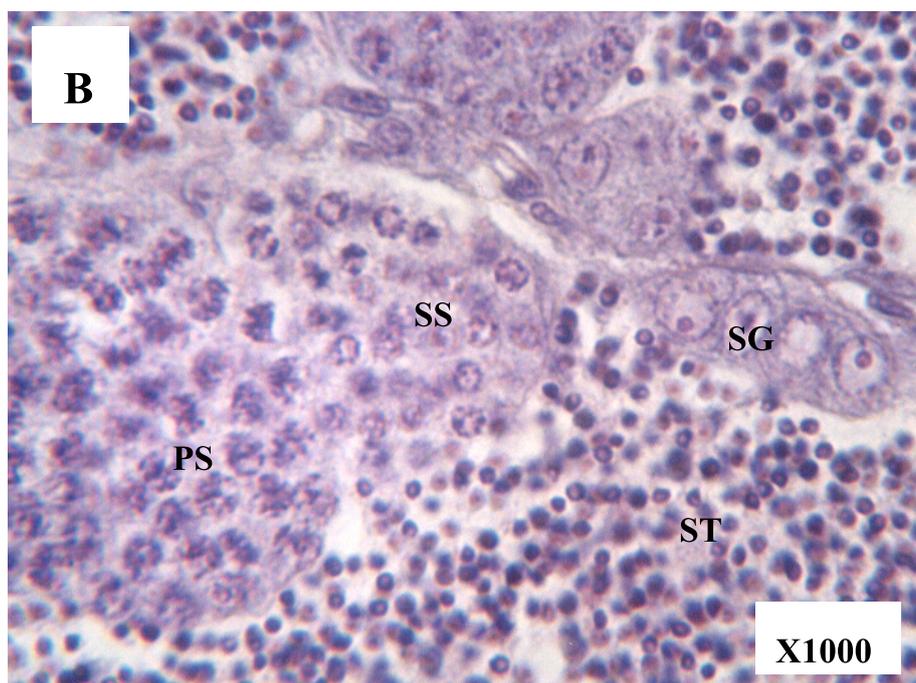
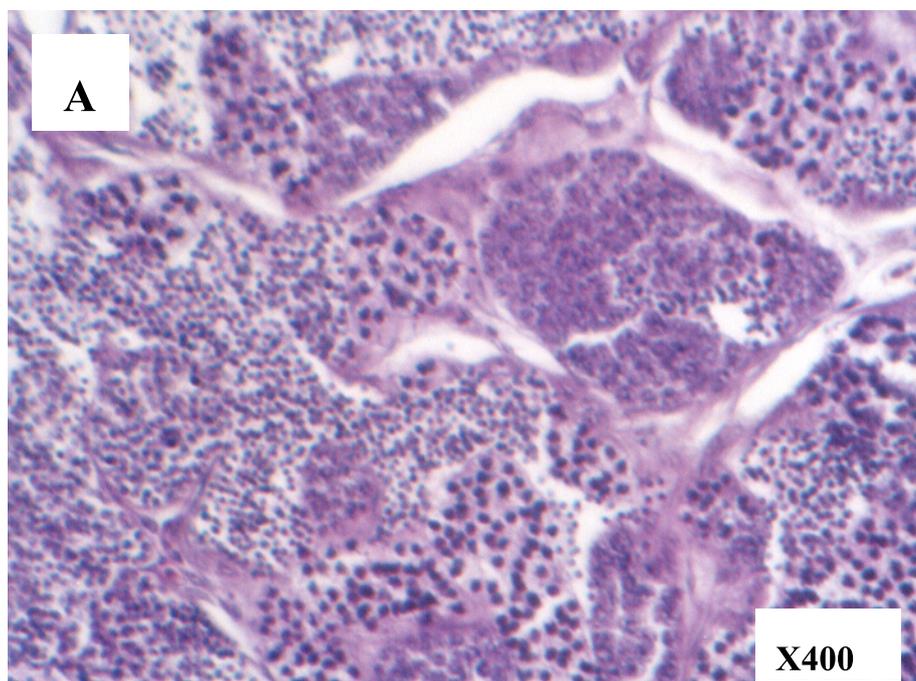
เมื่อสิ้นสุดการทดลองลูกปลาอายุ 15 วัน พบลูกปลา 7 ตัว เป็นเพศเมีย ซึ่งสามารถพบไข่ระยะที่ 3 ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นมีการพัฒนาของ follicular cells มากขึ้น ไซโทพลาสซึมจะติดสีน้ำเงินเข้มมากกว่าในระยะที่ 2 นิวเคลียสติดสีชมพู พบอยู่กลางเซลล์หรืออาจอยู่ด้านในด้านหนึ่งของเซลล์ ภายในนิวเคลียสจะมี provitelline nucleoli เห็นเป็นเม็ดกลม ๆ ติดสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 10) ส่วนปลากัดเพศผู้ 3 ตัว จะมีการขยายตัวของอัณฑะมากขึ้น โดยภายในอัณฑะจะสามารถพบ spermatogonia จำนวนมาก (ภาพที่ 8)



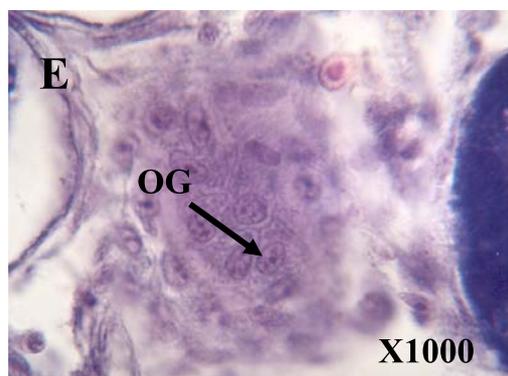
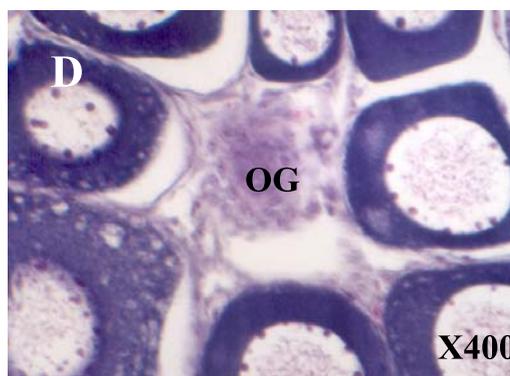
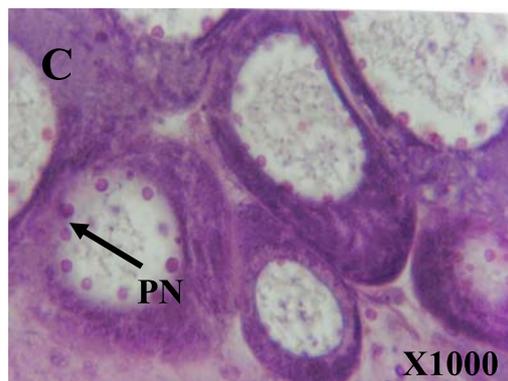
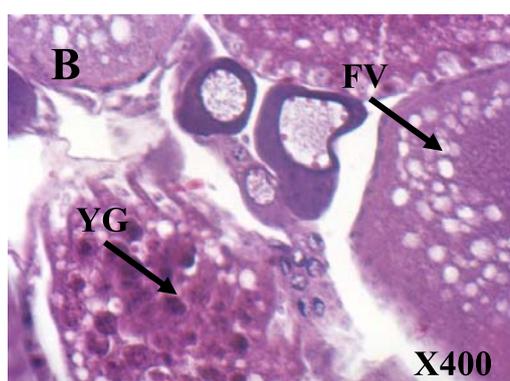
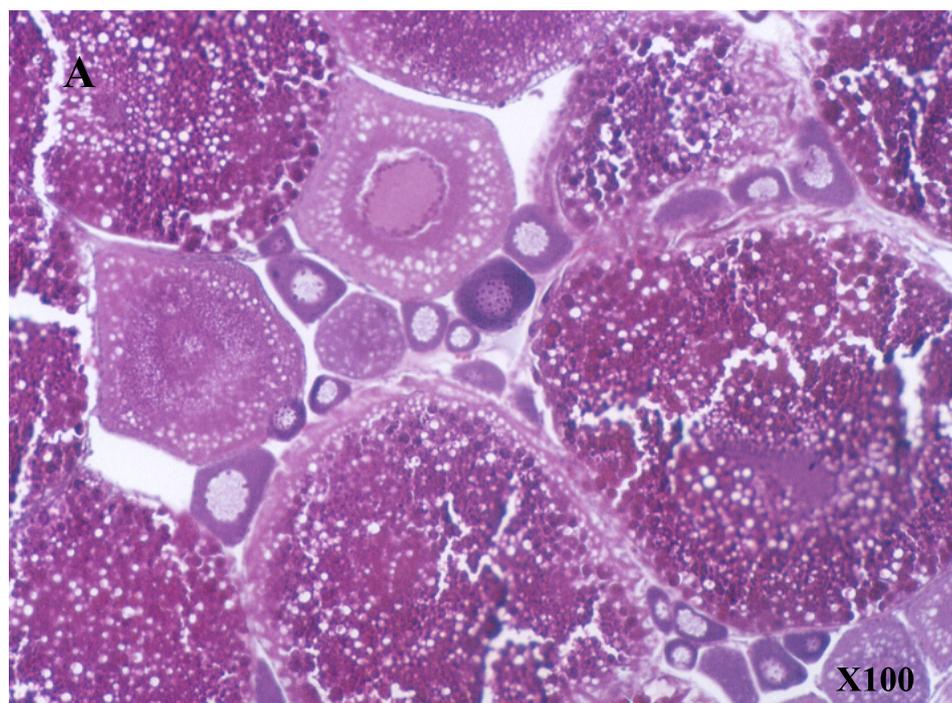
ภาพที่ 1 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลากัดระยะโตเต็มวัย จะมีลักษณะเป็นเส้นยาว 2 เส้น (ลูกสร้อย)



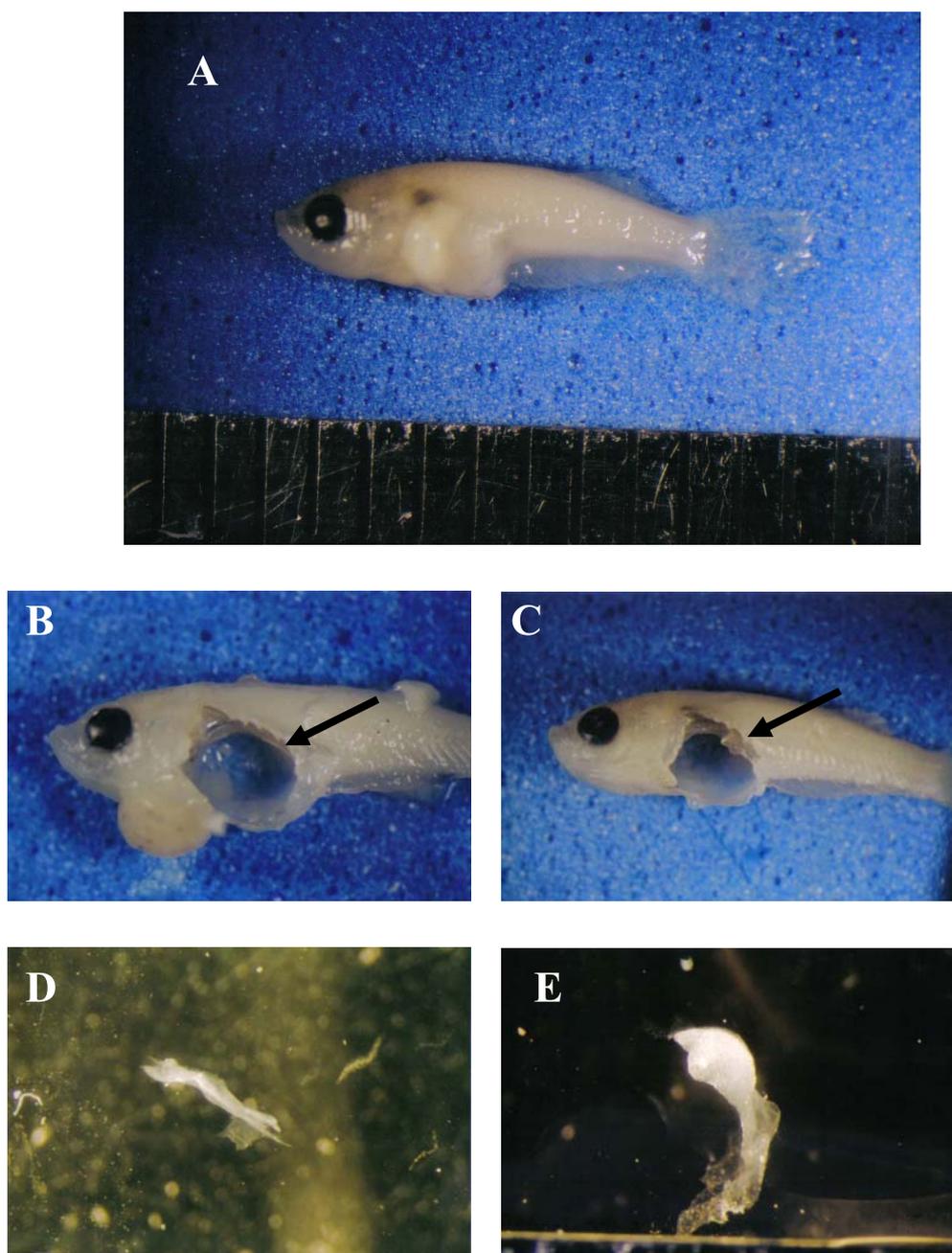
ภาพที่ 2 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของปลากัดระยะ โตเต็มวัย จะมีลักษณะเป็นพู 2 พู (ลูกศรชี้)



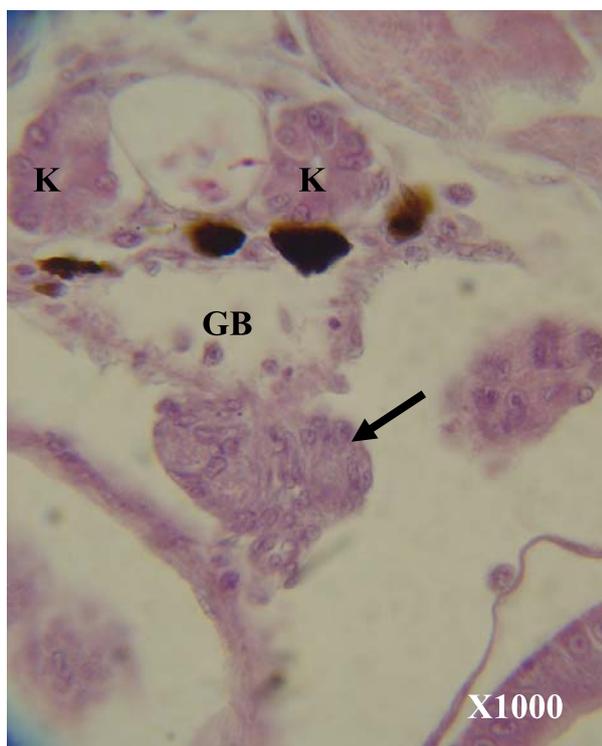
ภาพที่ 3 ลักษณะของเนื้อเยื่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศผู้อายุ 4 เดือน (A) x400 (B) x1000 (Bouin's; H&E); SG=spermatogonia; PS=primary spermatocytes; SS=secondary spermatocytes; ST=spermatids



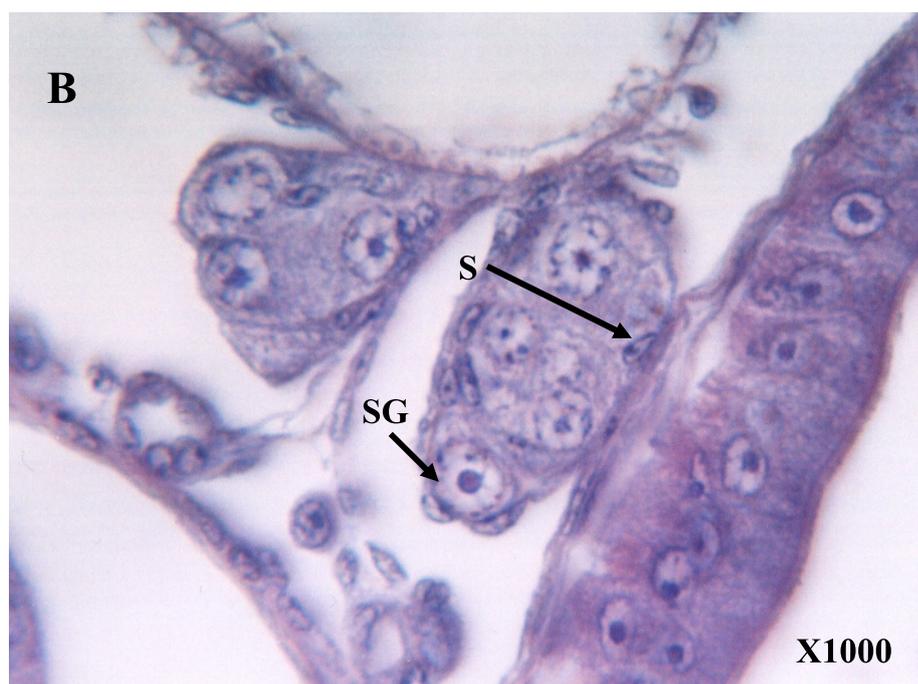
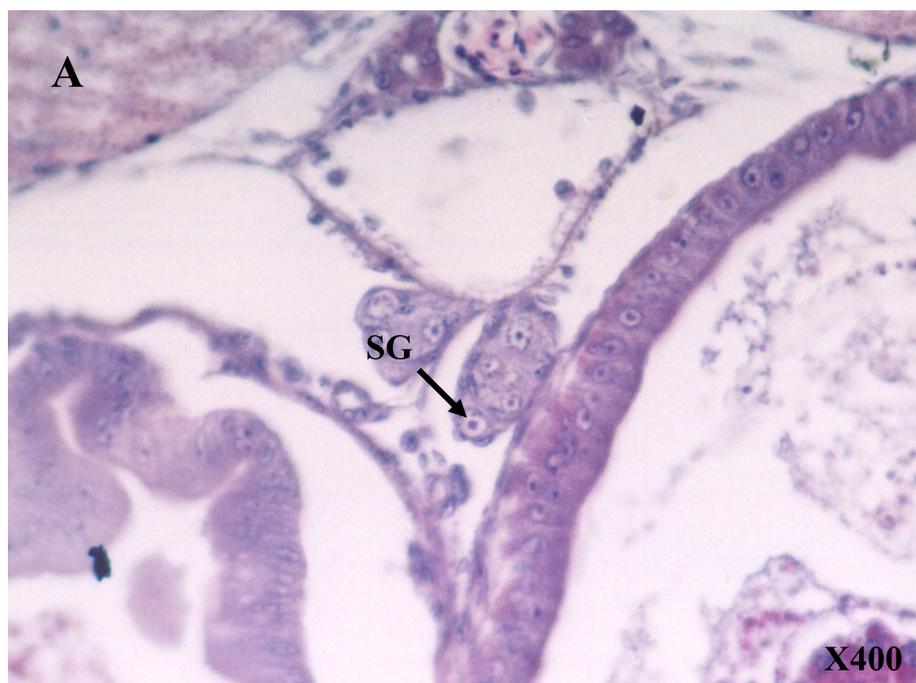
ภาพที่ 4 ลักษณะของเนื้อเยื่อวัยสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดเพศเมียอายุ 4 เดือน (A) x 100 (B) x400 (C) x1000 (D) x400 (E) x1000 (Bouin's; H&E); OG=oogonia; PN=previtellic nucleoli; FV=fat vacuoles; YG=yolk granules



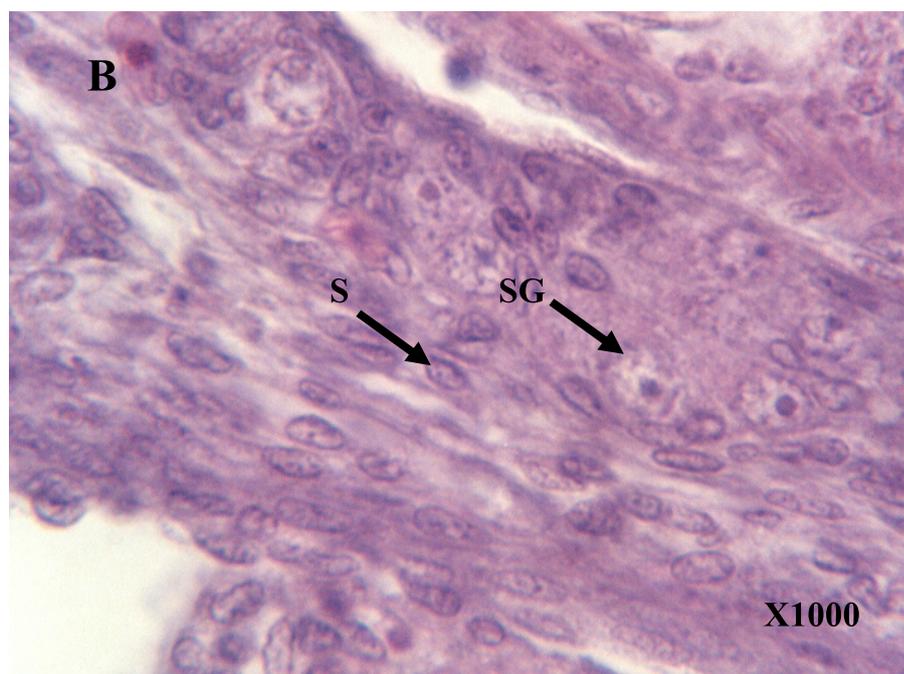
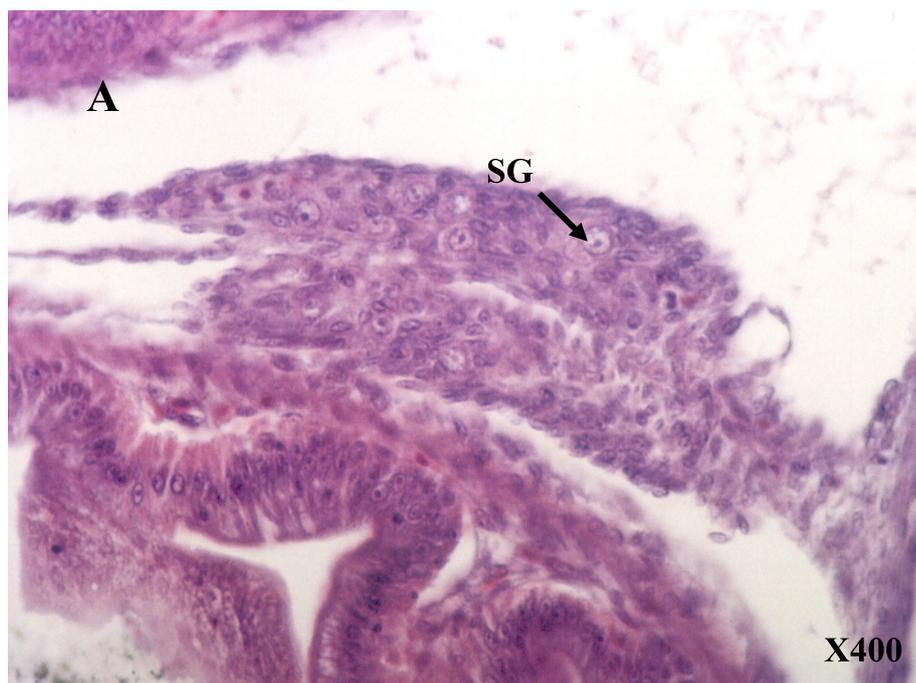
ภาพที่ 5 ลูกปลากัดอายุ 15 วัน (A) ลักษณะภายนอกของลูกปลากัด (B) ตำแหน่งอวัยวะของลูกปลากัด (ลูกศรชี้) (C) ตำแหน่งรังไข่ของลูกปลากัด (ลูกศรชี้) (D) ลักษณะอวัยวะของลูกปลากัดมีลักษณะเป็นเส้น 2 เส้น (E) ลักษณะรังไข่ของลูกปลากัดมีลักษณะเป็นพู 2 พู



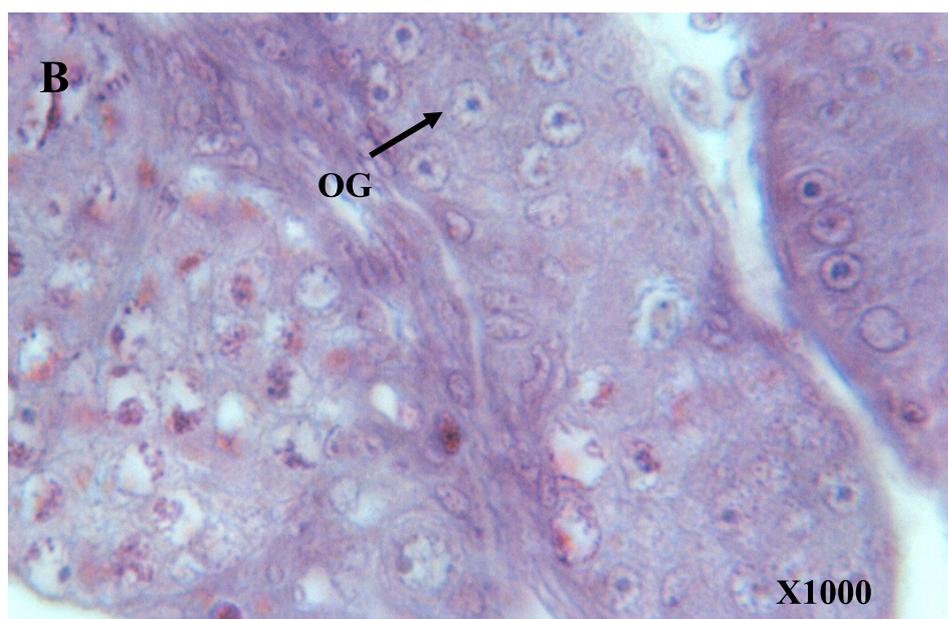
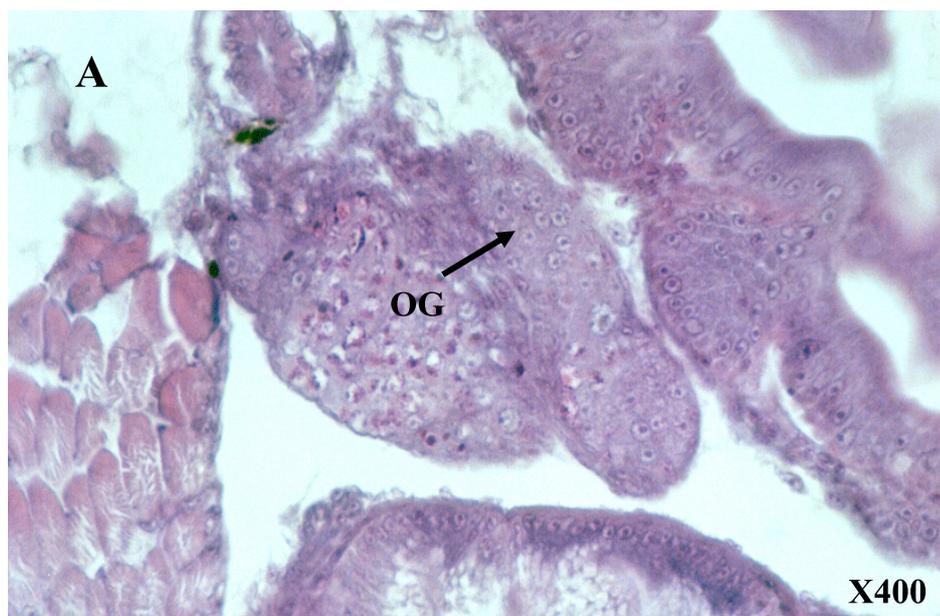
ภาพที่ 6 ลักษณะของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลากัดอายุ 3 และ 4 วัน (ลูกครี) (Bouin's; H&E; x 1000); K=kidney; GB=gas bladder



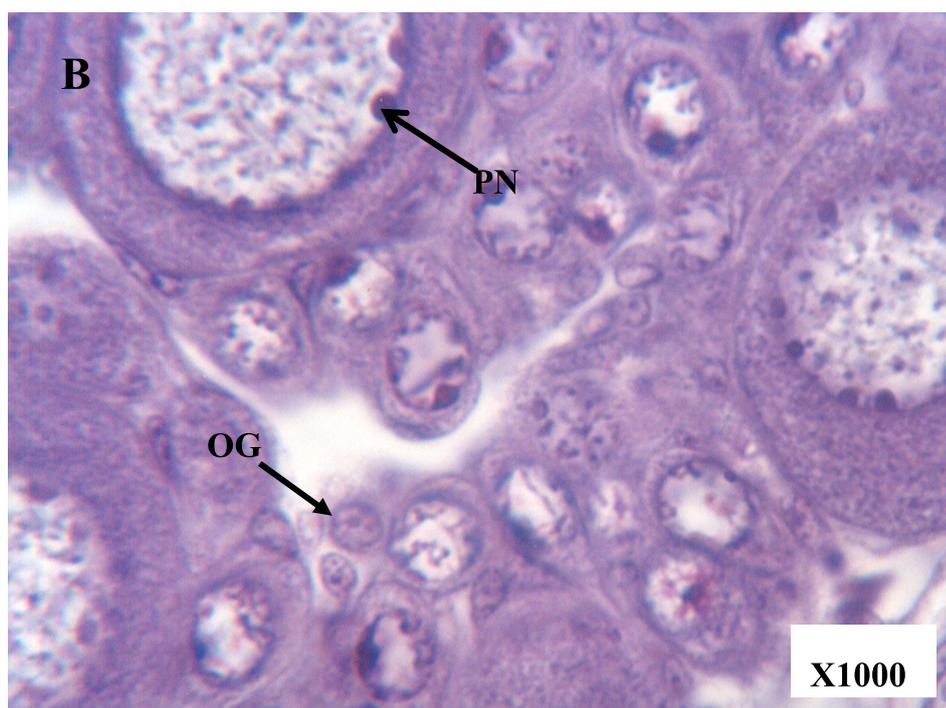
ภาพที่ 7 ลักษณะของเนื้อเยื่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกปลากัดเพศผู้อายุ 5 วัน (A) x400 (B) x1000 (Bouin's; H&E); SG=spermatogonia; S=Sertoli cell



ภาพที่ 8 ลักษณะของเนื้อเยื่อวัยระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกปลากัดเพศผู้อายุ 15 วัน (A) x400 (B) x1000 (Bouin's; H&E); SG=spermatogonia; S=Sertoli cell



ภาพที่ 9 ลักษณะของเนื้อเยื่อรังไข่ ของลูกปลากัดเพศเมียอายุ 8 วัน (A) x400 (B) x1000
(Bouin's; H&E); OG=oogonia

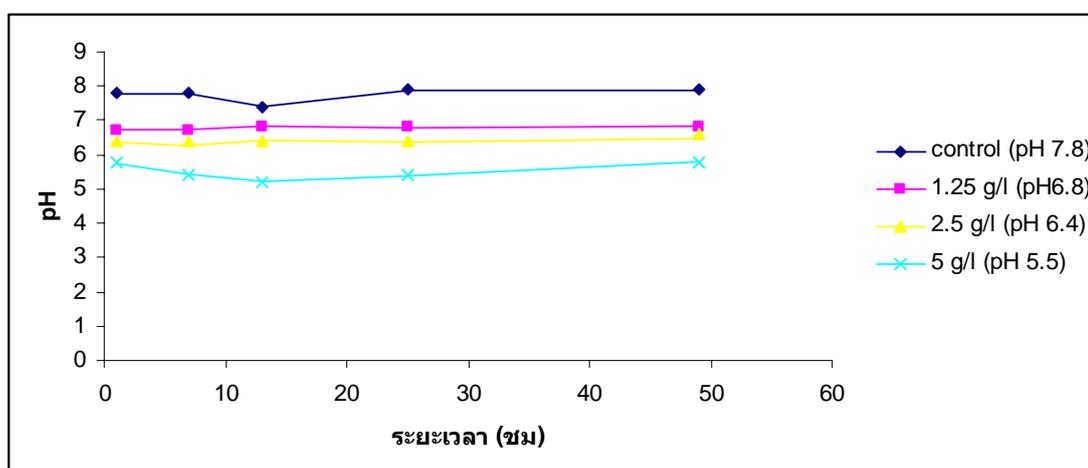


ภาพที่ 10 ลักษณะของเนื้อเยื่อรังไข่ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน (A) x400 (B) x1000 (Bouin's; H&E);

OG=oogonia; PN=provitelline nucleoli

2. ผลของไบโหิวทิวสต่อค่าพีเอชของน้ำ

การเตรียมน้ำหมักไบโหิวทิวสโดยวิธีการใช้ผงไบโหิวทิวสที่ได้จากการอบและปั่นให้ละเอียด เมื่อนำไปละลายในน้ำจะทำให้น้ำเปลี่ยนสีในทันทีและเมื่อทำการกรองกากตะกอนทิ้งไป ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวใช้ระยะเวลาประมาณ 10 นาที จะได้น้ำหมักไบโหิวทิวสที่มีค่าพีเอชลดลงจนถึงระดับที่ต้องการในทุก ๆ กลุ่มการทดลอง ซึ่งถ้าใช้ผงไบโหิวทิวสบดละเอียดในการละลายมากขึ้นจะส่งผลให้ได้น้ำหมักไบโหิวทิวสที่มีค่าพีเอชต่ำลงตามลำดับ โดยค่าพีเอชที่ได้จากการละลายไบโหิวทิวสบดละเอียดที่ระดับความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร พบว่ามีค่าพีเอชเฉลี่ย เท่ากับ 7.8 , 6.8 , 6.4 และ 5.5 ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงระดับ pH จากน้ำหมักไบโหิวทิวสที่ระดับความเข้มข้น 0, 1.25, 2.5 และ 5 กรัม ต่อน้ำ 1 ลิตร

3. ผลของพีเอชจากไบโหิวทิวสต่อสัดส่วนเพศในปลากัด

การผสมพันธุ์วางไข่ของปลากัดที่เพาะในน้ำหมักไบโหิวทิวส พบว่า ที่ชุดการทดลอง pH 7.8 ปลาในประชากร A ไม่วางไข่ 1 คู่ (จากทั้งสิ้น 6 คู่) ชุดการทดลอง pH 6.8 วางไข่ทุกคู่ผสม ชุดการทดลอง pH 6.4 วางไข่ 2 คู่ผสม (ในประชากร B และ C) แต่ชุดการทดลอง pH 5.5 ไม่มีปลาคูใดผสมพันธุ์วางไข่ (ตารางที่ 1)

ลูกปลากัดที่ได้จากชุดการทดลอง pH 7.8 มีเปอร์เซ็นต์ของลูกเพศผู้จากแต่ละคู่ผสมระหว่าง 40-50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่า สัดส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 1:1 ในทุก

กลุ่มผสม (5 กลุ่มผสม) ชุดการทดลอง pH 6.8 ให้ลูกเพศผู้ 50-84 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มผสมที่เป็นปลาจากประชากร A ให้ลูกที่มีสัดส่วนเพศไม่แตกต่างจาก 1:1 ในประชากร B และ C ให้สัดส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ประชากรละ 1 กลุ่มผสม จาก 2 กลุ่มผสมต่อประชากร และ ชุดการทดลอง pH 6.4 ให้เปอร์เซ็นต์ลูกเพศผู้ 50, 68 เปอร์เซ็นต์ ในปลาประชากร B และ C ตามลำดับ มี 1 กลุ่มผสม จากประชากร C ที่ให้สัดส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย (ตารางที่ 2)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า ระดับ pH และ ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรไม่มีผลทำให้ได้ลูกปลาที่มีเพศผู้มากหรือน้อยกว่า pH ปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างค่า pH และ เปอร์เซ็นต์ลูกเพศผู้ พบว่า มีสหสัมพันธ์ต่อกันในทางลบ ($r=-0.577$) โดยค่า r มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.039$) ดังนั้นสามารถสรุปผลการทดลองว่า ระดับ pH ต่ำ สัมพันธ์กับสัดส่วนลูกปลาเพศผู้

อัตราการรอดของลูกปลากัดอายุ 4 และ 15 วันในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) พบว่า ชุดการทดลอง pH 7.8, ชุดการทดลอง pH 6.8 และ ชุดการทดลอง pH 6.4 มีอัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลาอายุ 4 วัน ดังนี้ 99.22 ± 0.81 , 94.90 ± 4.62 และ 99.26 ± 0.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลาอายุ 15 วัน ดังนี้ 90.22 ± 9.13 , 87.67 ± 11.57 และ 90.64 ± 9.46 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ความยาวและน้ำหนักของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ในชุดการทดลอง pH 6.4 ต่ำกว่า ชุดการทดลองที่ pH 7.8 และ pH 6.8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) พบว่า ชุดการทดลอง pH 7.8, ชุดการทดลอง pH 6.8 และ ชุดการทดลอง pH 6.4 มีความยาวเฉลี่ย เท่ากับ 11.83 ± 0.92 , 12.03 ± 0.94 และ 10.51 ± 1.01 มิลลิเมตร ตามลำดับ น้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 0.018 ± 0.003 , 0.019 ± 0.004 และ 0.013 ± 0.004 กรัม (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 12, 13)

ตารางที่ 1 ผลการผสมพันธุ์วางไข่ของปลากัด ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8, 6.4 และ 5.5 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8, 6.4 และ 5.5 ได้มาจากการหมักน้ำด้วย ใบหูกวางน้ำหนัก 1.25, 2.5 และ 5 กรัมต่อปริมาณน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

ชุดการทดลอง(pH)	ประชากร	คู่ผสมที่	การผสมพันธุ์วางไข่
7.8	A	1	ไม่วางไข่
		2	วางไข่ปกติ
	B	1	วางไข่ปกติ
		2	วางไข่ปกติ
	C	1	วางไข่ปกติ
		2	วางไข่ปกติ
6.8	A	1	วางไข่ปกติ
		2	วางไข่ปกติ
	B	1	วางไข่ปกติ
		2	วางไข่ปกติ
	C	1	วางไข่ปกติ
		2	วางไข่ปกติ
6.4	A	1	ไม่วางไข่,สร้างหวอด
		2	ไม่วางไข่,สร้างหวอด
	B	1	วางไข่ปกติ
		2	ไม่วางไข่,สร้างหวอด
	C	1	วางไข่ปกติ
		2	ไม่วางไข่,สร้างหวอด
5.5	A	1	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด
		2	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด
	B	1	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด
		2	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด
	C	1	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด
		2	ไม่วางไข่,ไม่สร้างหวอด

ตารางที่ 2 สัดส่วนของลูกปลากัดเพศผู้และเพศเมีย ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วยใบหู กวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาณน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ และผลการทดสอบ สัดส่วนลูกปลากัดเพศผู้:เพศเมีย โดย χ^2 -test ($H_0 = 1:1$)

ชุดการทดลอง (pH)	ประชากร	เพศผู้	เพศเมีย	สัดส่วนเพศ	χ^2	P
7.8	A	24 (48%)	26	0.92:1	0.08	0.777
	B	23 (46%)	27	0.85:1	0.32	0.572
		20 (40%)	30	0.67:1	2.00	0.157
	C	24 (48%)	26	0.92:1	0.08	0.777
		25 (50%)	25	1:1	0.00	1.000
	รวม	116	134	0.87:1	1.296	0.255
6.8	A	26 (52%)	24	1.08:1	0.08	0.777
	B	31 (62%)	19	1.63:1	2.88	0.090
		38 (76%)	12	3.17:1	13.52	0.000
	C	28 (56%)	22	1.27:1	0.72	0.396
		25 (50%)	25	1:1	0.00	1.000
	รวม	190	110	1.73:1	21.33	0.000
6.4	A	-	-	-	-	-
	B	25 (50%)	25	1:1	0.00	1.000
	C	34 (68%)	16	2.13:1	6.48	0.011
	รวม	59	41	1.44:1	3.24	0.072

ตารางที่ 3 อัตรารอดของลูกปลากัดอายุ 4 วัน และ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วย ไบโหุกวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

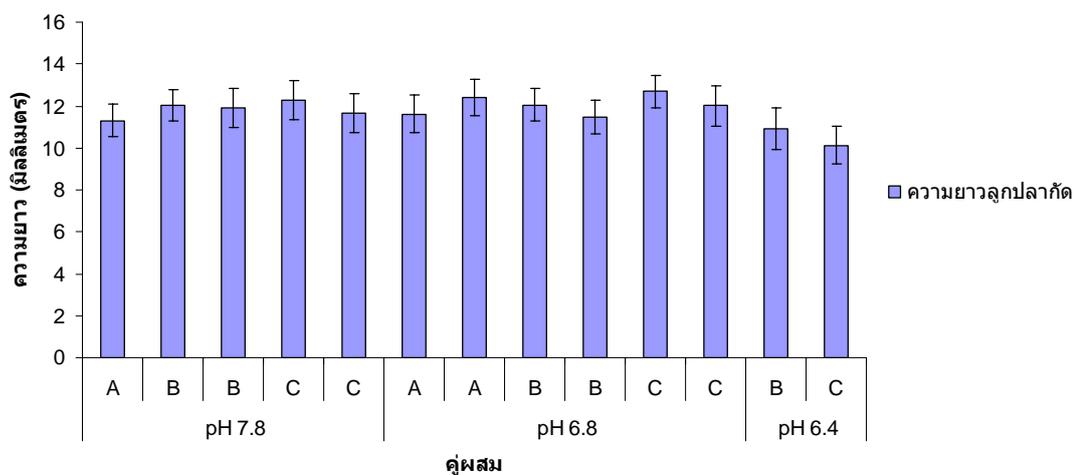
ชุดการทดลอง (pH)	ประชากร	อัตรารอด	
		อายุ 4 วัน	อายุ 15 วัน
7.8	A	99.29	75.28
		100.00	96.93
	C	98.52	87.83
		100.00	94.19
		98.27	96.85
		เฉลี่ย	99.22±0.81 ^a
6.8	A	96.23	85.44
		98.04	94.50
	B	98.75	95.02
		96.74	95.26
		93.36	90.46
		86.28	65.34
เฉลี่ย	94.90±4.62 ^a	87.67±11.57 ^a	
6.4	B	99.89	97.33
	C	98.62	83.95
	เฉลี่ย	99.26±0.90 ^a	90.64±9.46 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

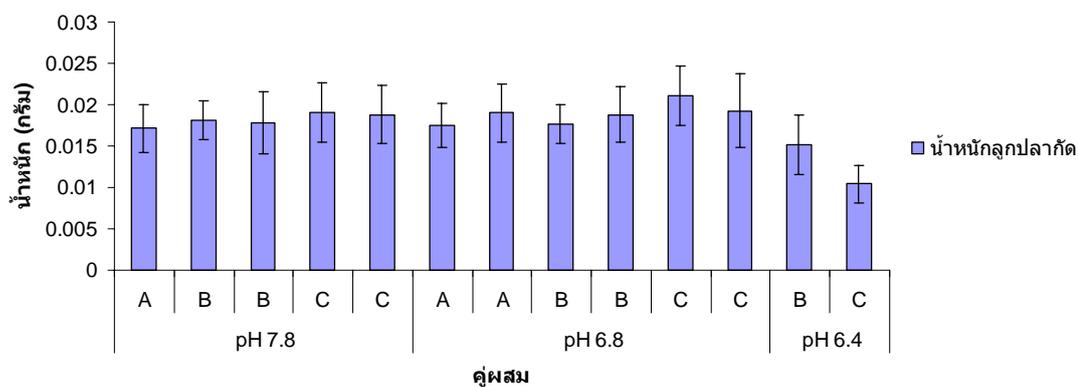
ตารางที่ 4 ความยาวเฉลี่ย (มิลลิเมตร) และน้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วยใบหูกวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาณน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

ชุดการทดลอง(pH)	ประชากร	ความยาว	น้ำหนัก
7.8	A	11.31	0.017
	B	12.03	0.018
		11.89	0.018
		12.29	0.019
	C	11.65	0.019
	เฉลี่ย	11.83 ± 0.92^a	0.018 ± 0.003^a
6.8	A	11.62	0.018
	B	12.39	0.019
		12.04	0.018
		11.47	0.019
	C	12.69	0.021
	เฉลี่ย	12.03 ± 0.94^a	0.019 ± 0.004^a
6.4	B	10.89	0.015
	C	10.13	0.010
	เฉลี่ย	10.51 ± 1.01^b	0.013 ± 0.04^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 12 ความยาวเฉลี่ย (มิลลิเมตร) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วยใบहुกวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 13 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วยใบहुกวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

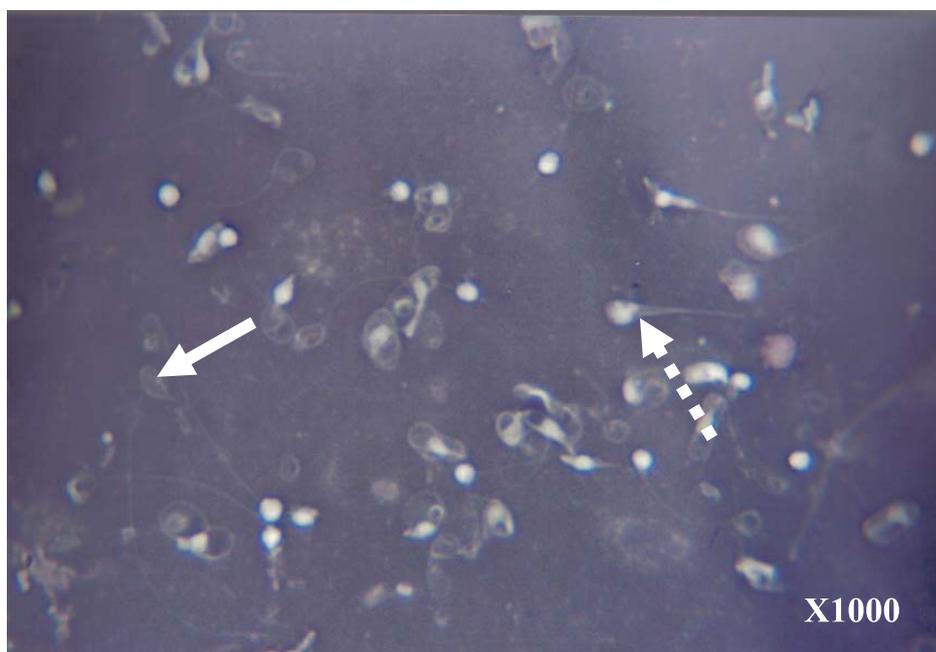
4. ผลของน้ำหมักใบหูกวางที่เอชต่าง ๆ ต่ออัตราการรอดของเชื้อตัวผู้

อัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ปลากัดที่แช่ในน้ำหมักใบหูกวางเวลา 1 และ 2 นาที ในแต่ละชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) พบว่า ชุดการทดลอง pH 7.8, ชุดการทดลอง pH 6.8 และ ชุดการทดลอง pH 6.4 มีอัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ภายหลังแช่น้ำหมักใบหูกวางนาน 1 นาที เท่ากับ 59.33 ± 6.66 , 58 ± 4.00 และ 58 ± 11.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ภายหลังแช่น้ำหมักใบหูกวางนาน 2 นาที เท่ากับ 35.33 ± 8.02 , 24.66 ± 5.03 และ 37.33 ± 2.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตามตารางที่ 5 และ ภาพที่ 14

ตารางที่ 5 อัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ที่แช่ในน้ำหมักใบหูกวางนาน 1 และ 2 นาที ที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยที่น้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 6.8 และ 6.4 ได้มาจากการหมักน้ำด้วยใบหูกวางน้ำหนัก 1.25 และ 2.5 กรัมต่อปริมาตรน้ำ 1 ลิตร ตามลำดับ

ชุดการทดลอง	ซ้ำที่	1 นาที	2 นาที
7.8	1	55	43
	2	56	27
	3	67	36
เฉลี่ย		59.33 ± 6.65^a	35.33 ± 8.02^a
6.8	1	62	30
	2	54	24
	3	58	20
เฉลี่ย		58 ± 4.00^a	24.66 ± 5.03^a
6.4	1	56	36
	2	48	40
	3	70	36
เฉลี่ย		58 ± 11.13^a	37.33 ± 2.31^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 14 เซื้อตัวผู้ปลากัด ภายหลังแช่น้ำหมักใบหูกวางนาน 1 นาที ที่ระดับ pH เท่ากับ 6.8 เซื้อตัวผู้ที่มีชีวิตจะมีลักษณะใสไม่ติดสี (ถูกสรประะ) เซื้อตัวผู้ที่ไม่มีชีวิตจะติดสี (ถูกสรทีบ)
(Eosin-Nigrosin; x 1000)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลากัด ลูกปลาเพศผู้มีการเจริญของอวัยวะที่สามารถสังเกตความแตกต่างทางมิถุนวิทยาได้เมื่อมีอายุ 5 วัน ในขณะที่ปลาเพศเมียมีการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นลักษณะของรังไข่เมื่อมีอายุ 8 วัน ตามลำดับ ซึ่งไม่สามารถสังเกตความแตกต่างกันของเพศ โดยดูจากลักษณะเพศภายนอกได้ ผลการทดลองนี้แตกต่างจากรายงานของ สุปราณี และคณะ (2534) ที่รายงานว่าปลากัดเพศเมียเริ่มพัฒนารังไข่เมื่อ 15 วัน แต่จากการสังเกตภาพประกอบการรายงานดังกล่าว พบว่า การพัฒนาน่าจะเริ่มก่อนหน้านี้อแล้ว เนื่องจากภาพดังกล่าวมี oocyte ในระยะ previtellogenesis จำนวนมาก ระยะเวลาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์แตกต่างกันออกไปตามแต่ละชนิดของปลาและปัจจัยของสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ (Nagamura, 1984) ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ โดยทำการทดลองที่ระดับอุณหภูมิของน้ำที่อยู่ในช่วงปกติที่ 29 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการแปรผันปัจจัยด้านอุณหภูมิ พบว่า ปลากัดมีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์จนเกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้เกิดขึ้นเร็วกว่าเพศเมีย ซึ่งแตกต่างกับปลาคูกยักษ์ (Van Den Hurk *et al.*, 1989) ปลา masu salmon (*Oncorhynchus masou*) ปลา chum salmon (*O. keta*) (Nakamura, 1984) และปลา *Tilapia aureus* (Eckstein and Spira, 1965) ที่พบว่าการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในเพศเมียเกิดขึ้นเร็วกว่าเพศผู้ ส่วนการพัฒนาความแตกต่างของเซลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลา เช่น ปลาสลิดเกิดความแตกต่างของเซลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์เมื่ออายุ 25 วันหลังจากฟักเป็นตัวโดยมีขนาดความยาวร่างกายตั้งแต่ 2.80 เซนติเมตรขึ้นไป ในปลาที่มีขนาดความยาวน้อยกว่านี้ การพัฒนาด้านความแตกต่างของเซลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เกิดขึ้น (นวลมณี และบัญชา, 2538) ในปลาตะเพียนขาวมีการพัฒนาด้านความแตกต่างของอวัยวะสืบพันธุ์เกิดขึ้นเมื่ออายุ 14 สัปดาห์ (98 วัน) ซึ่งพบในปลาที่มีความยาว 8.50 เซนติเมตรขึ้นไป ส่วนปลาขนาดเล็กถึงแม้จะมีอายุมากแต่การพัฒนาทางความแตกต่างของเซลล์ยังไม่เกิดขึ้น (แจ่มจันทร์, 2534) ในปลาช่อนการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์จนมีความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์ได้อย่างชัดเจนเมื่อปลาที่มีความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร (สุปราณี และคณะ, 2536) ส่วนในปลาเจาเกิดความแตกต่างของเซลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงระหว่างอายุ 94-124 วัน หรือมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 10.6 เซนติเมตร (Jensen and Shelton, 1983) และเมื่อเปรียบเทียบการพัฒนาด้านความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์ในปลากัดกับปลาสลิดซึ่งเป็นปลาในครอบครัว Belontiidae เหมือนกันพบว่า ปลาสลิดใช้เวลาในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์จนเกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์สืบพันธุ์นานกว่าปลากัดมากทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปลากัดเป็นปลานขนาดเล็กและสามารถสืบพันธุ์ได้เร็วกว่า โดยปลากัดสามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ

3 เดือนขึ้นไป (วันเพ็ญ และคณะ, 2531) ในปลาสดสามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ 6-8 เดือน หรือมีความยาวตั้งแต่ 8-10 เซนติเมตร (สุปราณี, 2517)

การผสมพันธุ์วางไข่ของปลากัดที่เพาะในน้ำหมักใบหูกวาง ที่พีเอชระดับต่ำกว่าปกติ สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตามปกติ มีเพียงที่ระดับพีเอช 5.5 เท่านั้นที่ไม่มีปลาคู่ใดผสมพันธุ์วางไข่ แสดงว่า ที่พีเอช 5.5 ไม่เหมาะสมในการแพร่พันธุ์ ซึ่งมีรายงานว่าที่ระดับพีเอช 6.5-9.0 เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ (Ellis, 1937) เมื่อระดับพีเอชลดต่ำกว่าระดับ 6.5 จะส่งผลกระทบต่อเนื่องต่อการแพร่พันธุ์ของสัตว์น้ำ (Mount, 1973) ระดับพีเอชที่ต่ำกว่า 4.0 ลงไปจะทำให้ปลาหลายชนิดตาย (ไมตรี, 2530; Ikuta *et al.*, 1999) ในส่วนของการแพร่พันธุ์พบว่า ระดับพีเอชที่ต่ำกว่าปกติมีผลต่อการสืบพันธุ์ของปลาโดยลดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และยังส่งผลต่อระบบต่อมไร้ท่อของเพศเมียที่เจริญพันธุ์โดยการทำลายกลไกในการพัฒนาไข่ หรือยับยั้งการสร้างหรือขาดขวางการทำงานของฮอร์โมน (Fritz, 1980; Haines, 1981) ในขณะที่ระดับพีเอชต่ำแต่ไม่ส่งผลทำให้ปลาตาย ก็จะทำให้เกิดความเครียดซึ่งเป็นเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยา และระบบนิเวศวิทยาของปลาได้ เมื่อลูกปลาที่อยู่ในน้ำพีเอช 4.5 จะแสดงระดับฮอร์โมนที่เกิดจากความเครียดสูงขึ้นและการลดลงของระดับ immuno-globulin (Igm) ซึ่งความเครียดที่เกิดจากความ เป็นกรดทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในปลาลดลง ในปลากลุ่ม salmonid ที่อาศัยอยู่ในน้ำพีเอช 4.5-5.0 จะไปยับยั้งการพัฒนาของลูกปลา ในส่วนของ sex steroids และ gonadotropin พบว่าระดับของ sex steroids และ gonadotropin แสดงในระดับที่ต่ำกว่าปกติ ซึ่งเป็นไปได้ที่ความเครียดจากความเป็น กรดจะไปทำลายการควบคุมระบบต่อมไร้ท่อที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ความเป็นกรดที่ระดับ พีเอช 5.8 ยังไปยับยั้งพฤติกรรมการย้ายถิ่นของปลา sockeye salmon และ ความเป็นกรดอ่อน ๆ ที่ ระดับพีเอชใกล้เคียง 6.0 จะส่งผลต่อการยับยั้งพฤติกรรมการวางไข่ (Ikuta *et al.*, 1999)

จากการทดลองในครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า น้ำใบหูกวางหมักที่พีเอช 6.8 และ 6.4 มีผลทำให้ลูกปลาจากบางคู่ผสมมีสัดส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ทั้งนี้ ยังไม่สามารถหาสาเหตุที่แน่ชัดได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Rubin (1985) ซึ่งทดลองเพาะปลา 6 ชนิด ในน้ำที่มี พีเอชต่ำ (5.05-6.2) พบว่า ทุกชนิดให้ลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย โดยบางชนิดให้ลูกเพศผู้ล้วน นอกจากนี้ Römer and Beisenherz (1996) ทดลองผลของอุณหภูมิ และ พีเอช ต่อสัดส่วนเพศของ ปลา Apistogramma 30 ชนิด, ปลา *Poecilia melanogaster* และ *Pseudo crenilabrus* พบว่า พีเอชต่ำมี ผลให้ปลาบางชนิดมีสัดส่วนลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิ และพีเอช ทั้งนี้ผู้วิจัยไม่สามารถอธิบายสาเหตุที่ทำให้สัดส่วนเพศเปลี่ยนแปลงดังกล่าว

การเกิดลูกปลาเพศใดเพศหนึ่งมากขึ้น ในฟิเอชที่ต่ำกว่าปกติอาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ เช่น เชื้อตัวผู้หรือไข่ ที่มีพันธุกรรมของเพศใดเพศหนึ่งมีอัตรารอด หรือ มีสมรรถนะในการปฏิสนธิลดลงกว่าเชื้อตัวผู้ที่มีพันธุกรรมกำหนดเพศตรงกันข้าม (Römer and Beisenherz, 1996) จากการทดลองครั้งนี้ เชื้อตัวผู้ปลากัดมีอัตรารอดไม่แตกต่างกันในน้ำฟิเอชต่างกัน แสดงว่า ฟิเอชต่ำไม่ได้มีผลให้น้ำเชื้อเพศใดเพศหนึ่ง (หรือทั้ง 2 เพศ) ตายมากกว่าปกติ อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถตัดความเป็นไปได้ที่ว่าเชื้อตัวผู้ที่มีพันธุกรรมเพศเมียอาจสูญเสียสมรรถนะในการปฏิสนธิในน้ำฟิเอชต่ำ ทั้งนี้เพราะเทคนิคการข้อมสามารถแยกเฉพาะเชื้อตัวผู้ที่ตายแล้วกับที่ยังมีชีวิตเท่านั้น แต่ไม่สามารถแยกเชื้อตัวผู้ที่สูญเสียสมรรถนะการปฏิสนธิ อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ ลูกปลากัดจากพ่อแม่หลายคู่ ซึ่งมาจากพ่อแม่หลายประชากร มีสัดส่วนเพศไม่แตกต่างจาก 1:1 แม้จะเพาะในฟิเอชต่ำ (6.8, 6.4) เช่นเดียวกัน ผู้วิจัยไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวได้ นอกจากข้อสันนิษฐานว่า อาจเกิดจากความไวต่อฟิเอชที่แตกต่างกันในปลาแต่ละตัว นอกจากนั้นมีความเป็นไปได้ว่า อาจเกิดปฏิสัมพันธ์ ระหว่างฟิเอชและปัจจัยอื่น ๆ ในน้ำที่ใช้เพาะปลา เช่น อุณหภูมิ ซึ่งปฏิภิกิริยา ระหว่างอุณหภูมิและฟิเอชต่อสัดส่วนเพศมีรายงานในปลา *Apistogramma borellii* โดยถ้าเลี้ยงลูกปลาในฟิเอชต่ำ อุณหภูมิต่ำจะได้ลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ แต่ถ้าฟิเอชต่ำอุณหภูมิสูงจะได้ลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย (Römer and Beisenherz, 1996) ความเป็นไปได้อีกประการหนึ่งก็คือ อาจเป็นเพราะความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละคู่ผสม แม้จะพบว่าปลาต่างประชากรให้ผลของสัดส่วนเพศที่ไม่แตกต่างกัน เช่น ประชากร B เกิดลูกปลาเพศผู้มากกว่าเพศเมีย 1 คู่ จาก 3 คู่ผสม ในขณะที่ปลาประชากร C ให้ลูกเพศผู้มากขึ้น 2 คู่ จาก 3 คู่ผสม

อัตราการรอดของลูกปลากัดอายุ 4 และ 15 วัน ที่ระดับฟิเอชต่างกันพบว่าระดับฟิเอชไม่มีผลต่ออัตราการรอดของลูกปลากัด ในส่วนของการเจริญเติบโตพบว่าที่ระดับฟิเอช 6.4 มีการเจริญเติบโตต่ำกว่าที่ ระดับฟิเอช 7.8 และ 6.8 แสดงว่า ช่วงระดับฟิเอชที่ทำการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้เป็นสาเหตุให้ปลาตายแต่จะมีผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งอาจเป็นเพราะการที่ได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ เนื่องจากมีรายงาน ว่า ฟิเอชที่ต่ำเกินไปมีผลให้เหงือกผิดปกติ โดย Calta (1999) ศึกษาผลของฟิเอชต่อการพัฒนาของเหงือกในระยะวัยอ่อนของปลา Rainbow trout โดยศึกษาผลของฟิเอชที่ระดับ 4.5 พบว่าที่ระดับฟิเอชดังกล่าวทำให้เกิดการหนาตัวขึ้นของส่วนปลาย gill filament นอกจากนั้นจะทำให้ความยาวของ gill lamellae และ gill filament สั้นลงและยังส่งผลให้จำนวน gill lamellae ในแต่ละ gill filament ลดจำนวนลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลอง ซึ่งการที่มีจำนวน gill lamellae ลดลงเนื่องจากเกิดการรวมตัวกันระหว่าง gill lamellae ที่อยู่ใกล้เคียงกัน โดยจะส่งผลต่อ

การรับ-ส่งออกซิเจนได้น้อยลง และยังส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการไหลผ่านเข้าออกของไอออน โดยเฉพาะไอออนประจุบวกซึ่งจะสูญเสียไปอย่างมากเมื่อมีการผิดปกติที่เหงือก

ส่วนผลของพีเอชต่ออัตราการตายพบว่า ภายใน 28 วัน ตัวอ่อนของปลา Rainbow trout ที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีระดับพีเอช 4.5 จะมีการว่ายน้ำผิดปกติคือว่ายน้ำแบบควงส่ววน และการใช้พลังงานน้อยลงโดยสังเกตจากตัวอ่อนของลูกปลาที่อยู่ในระดับพีเอช 4.5 จะคงเหลือถุงไข่แดงอยู่ในขณะที่กลุ่มควบคุมการทดลองมีการยุบตัวของถุงไข่แดงไปจนหมด Ikuta *et al.* (1999) พบว่าเมื่อปลาอยู่ในพีเอชที่ต่ำกว่าปกติจะทำให้เกิดการสูญเสีย โซเดียมและคลอไรด์ไอออน ของของเหลวภายในร่างกายเกิดขึ้น ทำให้เกิดการลดการแลกเปลี่ยนของเหลว พบว่าในปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่คล้ายปลาตะเพียน (*Tribolodon hakonensis*) มีแหล่งอาศัยอยู่ที่ทะเลสาบ Osorezan ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเป็นกรดที่พีเอช 3.6 พบความแตกต่างของเหงือกบริเวณ chloride cell ซึ่งเกี่ยวข้องกับขบวนการ vacuolar-type proton pump (V-ATPase) ที่สูง ซึ่งเป็นขบวนการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อเป็นการขับออกของไฮโดรเจนไอออน

สรุปผลการทดลอง

1. การพัฒนาด้านความแตกต่างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปลากัดจะพัฒนาแยกเป็น อัณฑะ (testis) ได้ที่อายุ 5 วัน และรังไข่ (ovary) ได้ที่อายุ 8 วัน ในอุณหภูมิของน้ำที่อยู่ในช่วงปกติที่ 29 องศาเซลเซียส
2. การผสมพันธุ์วางไข่ของปลากัดที่เพาะในน้ำหมักใบหูกวาง ที่พีเอชระดับต่ำกว่าปกติ สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตามปกติ มีเพียงพีเอช 5.5 ไม่มีปลาคู่ใดผสมพันธุ์วางไข่
3. อัตรารอดของลูกปลาอายุ 4 และ 15 วัน ที่ระดับพีเอชต่างกันไม่มีความแตกต่างในทุก ระดับพีเอช ในส่วนของการเจริญเติบโต ระดับพีเอช 6.4 มีการเจริญเติบโตต่ำกว่า ที่ระดับพีเอช 7.8 และ 6.8
4. ที่พีเอชระดับต่ำกว่าปกติในบางกลุ่มสมให้อัตราส่วนเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ส่วนอัตรารอดของน้ำเชื้อที่ระดับพีเอชต่างกันไม่มีความแตกต่างในทุกระดับพีเอช

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองครั้งนี้ ควรจะทำการศึกษาต่อเนื่อง โดยศึกษาผลของปฏิสัมพันธ์ระหว่าง
พีเอชต่อกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ หรือ พันธุกรรมของพ่อแม่ปลา ต่อสัดส่วนเพศของลูกปลากัด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

แจ่มจันทร์ แสงศรี. 2534. ผลของเมทิลเทสโทสเทอโรนในการเปลี่ยนเพศของปลาทะเลเขี้ยวขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 79 น.

นวลมณี พงศ์ธนา และ บัญชา ทองมี. 2538. การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ปลาสด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 9. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 20 น.

พิชัย สราญรมย์. 2527. ปลากัดไทย. ข่าวสารเกษตรศาสตร์ 26 (6): 54-59.

ไมตรี ดวงสวัสดิ์. 2530. เกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการคุ้มครองทรัพยากรสัตว์น้ำจืด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 75. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. 38 น.

วันเพ็ญ มินกาญจน์, นงนุช เลาหะวิสุทธิ และสุภาพ พรหมยศ. 2531. การเพาะพันธุ์ปลากัด. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 14. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. 16 น.

สุปราณี ชินบุตร. 2517. ชีวิตวิทยาปลาสด. รายงานประจำปี. แผนกทดลองเพาะเลี้ยง, กรมประมง. 72 น.

สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตน์ และชลอ ลิมสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อของปลาช่อน. ม.ป.ท., กรุงเทพฯ. 129 น.

สุปราณี ชินบุตร, พรเลิศ จันทร์รัชชกุล และนงนุช เลาหะวิสุทธิ. 2534. การศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลากัดวัยอ่อน *Betta splendens* Regan. วิทยาศาสตร์(สาขาวิทยาศาสตร์) 25: 421-429.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2543. ปลากัดอัญมณีมีชีวิตจริงหรือ?. สัตว์น้ำ 11(126): 89-96.

Calta, M. 1999. The effects of toxic aluminum and low pH on gill development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) larvae. **Tr. J. of Zoology** 23: 258-291.

- Chen, P.S., J.H. Li, T.Y. Liu and T.C. Lin. 2000. Folk medicine *Terminalia catappa* its major tannin component, punicalagin, are effective against bleomycin-induced genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. **Cancer Letters** 152: 115-122.
- Eckstein, B. and M. Spira. 1965. Effect of sex hormones on gonadal differentiation in a cichlid, *Tilapia aureaus*. **Biol. Bull. (Woods Hole)**. 129(3): 482-489.
- Ellis, M.M. 1937. **Detection and measurement of stream pollution**. U.S. Bureau of Fish. Bull. 22: 367-437.
- Fritz, E.S. 1980. **Potential impacts of low pH on fish and fish pollulations**. US Fish and Wildlife Service, Biological Services Program, National Powerplant Team FWS/OBS-80/40.2.
- Gilman, E.F. and D.G. Watson. 1994. ***Terminalia catappa* Tropical-Almond**. Institute of Food and Agriculture Sciences, University of Florida.
- Goun, E., G. Cunningham, D. Chu, C. Nguyen and D. Miles. 2003. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia** 76: 592-596.
- Haines, T.A. 1981. Acidic precipitation and its consequences for aquatic ecosystems. A review. **Trans. Amer. Fish. Soc.** 110: 669-707.
- Humason, G.L. 1979. **Animal Tissue Techniques**. Freeman and Company, San Fransisco. 559 p.
- Ikuta, K., T. Yada, S. Kitamura and N. Branch. 1999. Effects of acidification on fish reproduction, pp. 39-45. **Spawning and Maturation of Aquaculture Species: Proceedings of the Twenty-eighth UJNR Aquaculture Panel Symposium**. University of Hawai Sea Grant College Program, Hawai.

- Jensen, G.L. and W.L. Shelton. 1983. Gonadal differentiation in relation to sex control of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. **Copeia** 3: 749-755.
- Lin, C.C. and W.S. Ken. 1990. Medicinal plants used for the treatment of hepatitis in Taiwan. **Amer. Jour. of Chin. Med.** 18: 35-43.
- Lowe, T.P. and J.R. Larkin. 1975. Sex reversal in *Betta splendens* Regan with emphasis on the problem of sex determination. **J. Exp. Zool.** 191: 25-32.
- Meejui, O., S. Sukmanomon and U. Na-Nakorn. 2005. Allozyme revealed substantial genetic diversity between hatchery stocks of Siamese fighting fish, *Betta splendens* in the province of Nakornpathom, Thailand. **Aquaculture** 250: 110-119.
- Mount, D.I. 1973. Chronic effect of low pH on fathead minnow survival, growth and reproduction. **Water Res.** 7: 987-993.
- Nakamura, M. 1984. Effects of estradiol-17 β on gonadal sex differentiation in two species of salmonids, the masu salmon, *Oncorhynchus masou* and the chum salmon, *O. keta*. **Aquaculture** 43: 83-90.
- Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the World 3rd ed.** John Wiley & Sons, Inc., USA. 600 p.
- Ratanatham, S. and S. Patinawin. 1979. Cytogenetic studies of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan). **J. Sci. Soc. Thailand** 5: 17-26.
- Römer, U. and W. Beisenherz. 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). **J. Fish Biol.** 48: 714-725.
- Rubin, D.A. 1985. Effect of pH on sex ratio in cichlids and a poeciliid (Teleostei). **Copeia** 1: 233-235.

- Ruby, S.M., J. Aczel, and G.R. Craig. 1978. The effects of depressed pH on spermatogenesis in flagfish *Jordanella floridae*. **Water Res.** 12: 621-625.
- Smith, H.M. 1945. **The Fresh-Water Fishes of Siam or Thailand.** United States Government Printing Office, Washington. 662 p.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1969. **Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research.** W.H. Freeman and Company. New York. 776 p.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1986. **Principle and Procedures in Statistics.** McGraw-Hill, New York. 633 p.
- Tanaka, T., G.I. Nanaka and I. Nishioka. 1986. **Tannins and related compound. XLII. Isolation and characterization of four new hydrolyzable tannins, terflavin A and B, tergallagin and tercatatin from leaves of *Terminalia catappa* L.** Chem. Pharm. Bull. 34: 1039-1049.
- Van Den Hurk, R., C.J.J. Richter and J.J. Dommerholt. 1989. Effects of 17 α methyltestosterone and 11 β -hydroxyandrostenedione on gonad differentiation in the African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture** 83: 179-191.
- Whitern, W.L. 1962. **Beautiful Bettas.** T.F.H. Pub., Inc., Bulid., New Jersey. 32 p.

ภาคผนวก

พัฒนาการของลูกปลากัดจีน

ลูกปลาอายุ 1 วัน (ภาพผนวกที่ 1a) มีความยาวประมาณ 2.95 mmNL (Notochord length) ลูกปลาลำตัวเรียวยาว มีดกกล้ามเนื้อลำตัว (myomere) 29 มัด ปากยังไม่พัฒนาตั้งอยู่ด้านล่างของส่วนหัว ถุงอาหารสำรอง (yolk sac) มีขนาดใหญ่ ช่องทวารเปิดประมาณ 47%NL หรือที่ตำแหน่งมัดกล้ามเนื้อที่ 10 กระดูกลายหาง (urostyle) เหยียดตรง ครีบหลัง ครีบหาง และครีบกันเป็นเพียงแผ่นเนื้อเยื่อ (fin fold) ยาวไปตามแนวลำตัว ยังไม่มีการพัฒนาของครีบอก และครีบท้อง

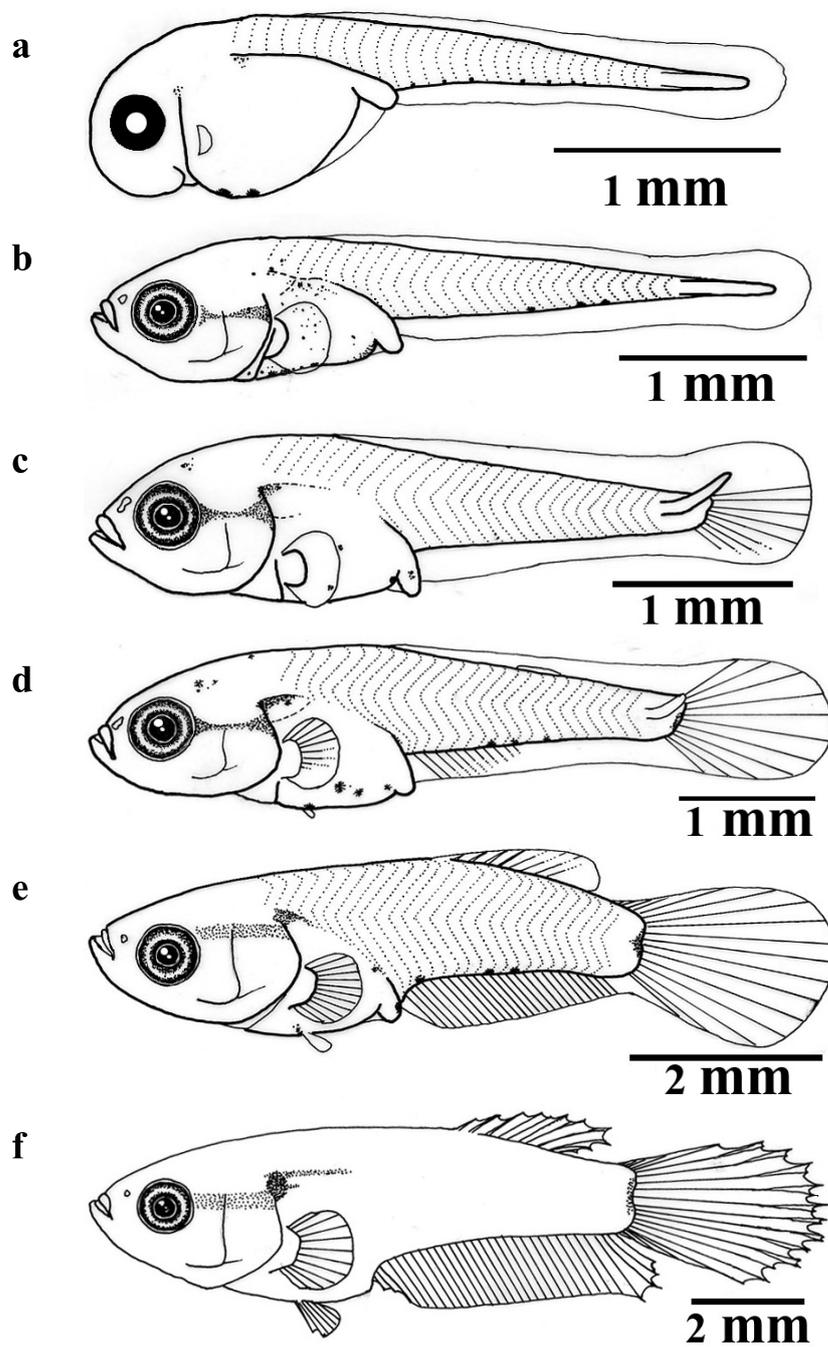
ลูกปลาอายุ 4 วัน (ภาพผนวกที่ 1b) มีความยาวประมาณ 3.85 mmNL ลูกปลามีการพัฒนาของมัดกล้ามเนื้อลำตัวของลำตัวมากขึ้น ปากมีการพัฒนาอย่างชัดเจนตั้งอยู่ปลายสุดของจะงอยปาก ถุงอาหารสำรองลดลง ถุงลมตั้งอยู่เหนือทางเดินอาหารส่วนหน้าจรดกับปลายช่องเปิดเหงือกตอนบน ครีบอกเริ่มพัฒนาให้เห็นเป็นแผ่นเนื้อเยื่อ ครีบท้องยังไม่มีการพัฒนา ส่วนครีบอื่นๆ ยังไม่มีการพัฒนาของก้านครีบ

ลูกปลาอายุ 7 วัน (ภาพผนวกที่ 1c) มีความยาวประมาณ 4.09 mmTL (Total length) ลูกปลา มีการพัฒนาของกระดูกปลายหาง โกงงอขึ้นด้านบน และเริ่มมีการพัฒนาของก้านครีบหางแต่ยังไม่ครบสมบูรณ์

ลูกปลาอายุ 9 วัน (ภาพผนวกที่ 1d) มีความยาวประมาณ 5.49 mmTL ลูกปลา มีการพัฒนาของก้านครีบหางมากขึ้น และเริ่มมีการพัฒนาของก้านครีบกันแต่ยังไม่ครบสมบูรณ์ เริ่มสังเกตเห็นร่องรอยการเกิดครีบท้องและครีบหลัง มีจุดสีสะสมในบริเวณเหนือกระเพาะลม และโคนครีบหาง

ลูกปลาอายุ 13 วัน (ภาพผนวกที่ 1e) มีความยาวประมาณ 7.89 mmTL ลูกปลา มีการพัฒนาของก้านครีบอก ครีบหาง และครีบกันจนครบสมบูรณ์ เริ่มมีการพัฒนาของก้านครีบหลังและแผ่นครีบท้อง

ลูกปลาอายุ 15 วัน (ภาพผนวกที่ 1f) มีความยาวประมาณ 11.83 mmTL ลูกปลา มีการพัฒนาอวัยวะต่าง ๆ จนครบสมบูรณ์เข้าสู่ระยะวัยรุ่น (juvenile stage) มีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยแต่มีขนาดเล็กกว่า ปลายครีบหลัง ครีบหาง และครีบกันมีลักษณะหยักเป็นริ้วๆ มีจุดสีขนาดใหญ่ ตั้งอยู่เหนือช่องเปิดเหงือก และมีแถบสีจางๆ 2 แถว พาดต่อจุดสีดังกล่าวไปทางท้ายลำตัว



ภาพผนวกที่ 1 ลูกปลากัดจีน a. ลูกปลาอายุ 1 วัน ความยาวประมาณ 2.95 mmNL b. ลูกปลาอายุ 4 วัน ความยาวประมาณ 3.58 mmNL c. ลูกปลาอายุ 7 วัน ความยาวประมาณ 4.09 mmTL d. ลูกปลาอายุ 9 วัน ความยาวประมาณ 5.49 mmTL e. ลูกปลาอายุ 13 วัน ความยาวประมาณ 7.89 mmTL และ f. ลูกปลาอายุ 15 วัน ความยาวประมาณ 11.83 mmTL

สารเคมีและวิธีการเตรียมสไลด์ชนิดต่างๆ

1. ขั้นตอนของการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยเครื่อง Automatic Tissue Processor

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา(ชั่วโมง)
1	50% alcohol	0.5-1
2	70% alcohol	0.5-1
3	95% alcohol	0.5-1
4	95% alcohol	0.5-1
5	95% alcohol	0.5-1
6	100% alcohol	0.5-1
7	100% alcohol	0.5-1
8	100% alcohol	0.5-1
9	chloroform I	1
10	chloroform II	1.5
11	paraplast I	1.5
12	paraplast II	2

2. 10% Buffer Formalin

37-40% formalin	100.00	ml
distilled water	900.00	ml
Sodium phosphate, monobasic	4.00	g
Sodium phosphate, dibasic	6.50	g
ผสมเข้าด้วยกัน		

3. Bouin's Solution

Picric acid(sat,aqu)	50.00	ml
37-40% Formalin	250.00	ml
Glacial acetic acid	50.00	ml
ผสมเข้าด้วยกัน		

4. Decalcification Solution

AlCl ₃	7.00	g
หรือใช้ AlCl ₃ .6H ₂ O(AlCl ₃)	12.67	g
HCl	8.50	ml
Formic acid	5.00	ml
Distilled water	87.00	ml

ผสมเข้าด้วยกัน โดยนำ AlCl₃ หรือ AlCl₃.6H₂O ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นจึงเทกรดผสมลงไป

5. สารเคมีและวิธีการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

การเตรียม Mayer's Hematoxylin

Hematoxylin crystal	4.00	g
Sodium iodate	0.80	g
Potassium aluminum sulfate (alum)	100.00	g
Citric acid	4.00	g
Chloral hydrate	200.00	ml
Distilled water	2000.00	ml

ละลาย alum ในน้ำกลั่น แล้วจึงใส่ hematoxylin ลงไปคนให้ละลาย จึงเติม sodium ผสมให้เข้ากัน เติม citric acid และ chloral hydrate คนให้เข้ากันเขย่าจนกว่าสารทั้งหมดละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ จึงนำมาใช้

การเตรียมสี Eosin

Eosin Y.CI 45380	1.00	g
70% Ethyl alcohol	1000.00	ml
Glacial acetic acid	5.00	ml
ผสมเข้าด้วยกัน		

6. วิธีการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

1. นำ paraffin section ไปละลายพาราฟินออกโดยผ่าน xylene และผ่านขบวนการคืนน้ำเข้าโดยผ่านแอลกอฮอล์ระดับต่าง ๆ 100 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ไปจนถึงแช่ในน้ำ กลั่น นานอย่างละ 2-3 นาที
2. ย้อมด้วย Mayer's Hematoxylin นาน 5-10 นาที เวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับคุณภาพสีว่าใช้นานเพียงใด
3. ล้างสีออกโดยให้น้ำประปาไหลผ่าน 2-3 นาที
4. ชบน้ำออกบ้าง ย้อม eosin 5-10 นาที ขึ้นกับคุณภาพของสีเช่นกัน
5. ผ่านขบวนการคืนน้ำออก โดยผ่านแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์ผสม xylene แล้วทำให้แผ่นสไลด์สะอาดด้วย xylene 2 ครั้ง
6. ใช้กระจกปิดสไลด์ ด้วย permount

ผล : นิวเคลียส ติดสีน้ำเงิน

ไซโตพลาสซึม ติดสีชมพูถึงแดง

7. การเตรียมสีย้อม Eosin-Nigrosin Stain

Eosin B	1.00	g
Nigrosin	5.00	g
3% Sodium Citrate (dehydrate)	100.00	ml

ผสมสีกับ citrate

สีนี้เก็บไว้ได้นานกว่า 1 ปี แต่ควรเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อป้องกันแบคทีเรีย

ตารางผนวกที่ 1 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำ
ปกติ ระดับ pH 7.8 ในประชากร A คู่ผสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	10.07	0.015	26	11.46	0.016
2	11.65	0.018	27	11.65	0.023
3	11.86	0.017	28	10.73	0.014
4	10.81	0.016	29	10.72	0.018
5	11.05	0.015	30	11.79	0.023
6	12.10	0.020	31	10.46	0.013
7	10.96	0.017	32	11.40	0.017
8	10.98	0.014	33	10.33	0.013
9	11.91	0.019	34	12.28	0.024
10	12.33	0.021	35	9.44	0.012
11	12.65	0.021	36	11.85	0.020
12	10.86	0.014	37	10.73	0.015
13	12.20	0.019	38	9.66	0.014
14	9.68	0.011	39	11.44	0.017
15	11.25	0.016	40	12.09	0.019
16	10.87	0.021	41	10.86	0.016
17	10.64	0.015	42	10.46	0.014
18	12.38	0.020	43	11.61	0.019
19	11.83	0.019	44	11.66	0.018
20	11.43	0.018	45	11.98	0.020
21	11.36	0.017	46	11.48	0.017
22	12.43	0.019	47	11.19	0.016
23	11.39	0.017	48	11.67	0.017
24	11.90	0.019	49	9.69	0.011
25	11.68	0.017	50	12.68	0.019
			เฉลี่ย	11.31±0.80	0.017±0.003

ตารางผนวกที่ 2 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร A กลุ่มสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.21	0.019	26	12.02	0.020
2	11.36	0.018	27	12.02	0.020
3	12.33	0.018	28	11.11	0.014
4	12.72	0.021	29	13.13	0.020
5	11.90	0.019	30	11.91	0.017
6	12.17	0.021	31	10.92	0.013
7	12.05	0.020	32	11.83	0.019
8	13.10	0.021	33	10.00	0.009
9	11.84	0.018	34	11.09	0.017
10	11.83	0.017	35	12.62	0.021
11	10.93	0.015	36	12.84	0.024
12	11.94	0.018	37	12.84	0.020
13	11.20	0.014	38	11.71	0.018
14	11.47	0.016	39	12.24	0.018
15	13.36	0.017	40	12.20	0.018
16	11.88	0.019	41	12.93	0.021
17	12.07	0.016	42	10.77	0.018
18	10.32	0.016	43	11.51	0.018
19	11.87	0.020	44	11.40	0.018
20	11.30	0.020	45	10.85	0.015
21	11.74	0.017	46	9.03	0.013
22	9.98	0.017	47	12.05	0.017
23	10.31	0.013	48	11.34	0.017
24	11.89	0.018	49	10.37	0.013
25	10.15	0.015	50	11.43	0.016
			เฉลี่ย	11.62±0.91	0.018±0.003

ตารางผนวกที่ 3 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักไบโहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร A คู่ผสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	12.07	0.015	26	12.36	0.015
2	10.64	0.011	27	13.43	0.021
3	11.04	0.015	28	12.24	0.017
4	12.25	0.021	29	11.29	0.015
5	11.29	0.016	30	12.36	0.022
6	13.06	0.020	31	11.84	0.016
7	11.57	0.015	32	12.85	0.023
8	13.67	0.025	33	12.20	0.020
9	12.85	0.023	34	12.06	0.015
10	12.81	0.021	35	12.42	0.018
11	12.37	0.021	36	12.51	0.020
12	11.91	0.017	37	13.46	0.024
13	12.89	0.021	38	12.34	0.018
14	12.26	0.019	39	12.70	0.020
15	12.80	0.021	40	12.41	0.018
16	12.74	0.019	41	11.41	0.016
17	11.24	0.015	42	13.59	0.023
18	12.04	0.016	43	13.72	0.025
19	11.09	0.019	44	13.32	0.025
20	12.39	0.018	45	12.90	0.020
21	13.18	0.021	46	13.62	0.024
22	11.12	0.015	47	9.91	0.009
23	11.87	0.021	48	13.46	0.023
24	12.27	0.021	49	13.49	0.020
25	12.50	0.019	50	13.72	0.022
			เฉลี่ย	12.39±0.87	0.019±0.004

ตารางผนวกที่ 4 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำ
ปกติ ระดับ pH 7.8 ในประชากร B คู่ผสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.63	0.018	26	12.24	0.019
2	12.42	0.020	27	11.81	0.018
3	12.48	0.019	28	11.95	0.022
4	12.32	0.020	29	13.05	0.021
5	12.53	0.018	30	12.59	0.019
6	12.19	0.020	31	10.38	0.011
7	13.44	0.021	32	10.59	0.015
8	10.65	0.013	33	11.10	0.015
9	12.51	0.018	34	11.99	0.017
10	12.23	0.020	35	11.86	0.016
11	11.87	0.016	36	12.53	0.018
12	12.79	0.021	37	10.95	0.017
13	11.23	0.013	38	12.89	0.021
14	11.92	0.018	39	11.73	0.018
15	12.00	0.016	40	11.26	0.017
16	11.77	0.017	41	12.57	0.019
17	11.72	0.017	42	11.80	0.021
18	13.03	0.022	43	11.00	0.020
19	11.20	0.017	44	12.60	0.019
20	12.39	0.018	45	11.51	0.018
21	12.49	0.018	46	11.70	0.016
22	12.04	0.017	47	12.09	0.017
23	13.74	0.022	48	10.82	0.016
24	11.98	0.018	49	11.58	0.018
25	12.89	0.020	50	13.20	0.021
			เฉลี่ย	12.03±0.75	0.018±0.002

ตารางผนวกที่ 5 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำ
ปกติ ระดับ pH 7.8 ในประชากร B คู่ผสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.55	0.014	26	12.92	0.018
2	12.12	0.016	27	12.19	0.020
3	11.87	0.015	28	10.16	0.013
4	12.47	0.015	29	12.31	0.020
5	12.33	0.016	30	12.20	0.020
6	12.43	0.015	31	13.43	0.022
7	12.02	0.016	32	12.49	0.021
8	12.32	0.017	33	11.15	0.018
9	10.52	0.017	34	12.10	0.018
10	12.67	0.020	35	10.54	0.018
11	13.31	0.021	36	12.47	0.022
12	11.82	0.018	37	10.31	0.013
13	11.90	0.018	38	11.49	0.017
14	11.67	0.016	39	12.90	0.021
15	13.76	0.035	40	11.88	0.019
16	12.61	0.022	41	10.55	0.015
17	12.58	0.019	42	10.89	0.016
18	11.69	0.013	43	11.62	0.017
19	13.66	0.020	44	11.37	0.018
20	12.04	0.019	45	10.84	0.015
21	10.75	0.013	46	11.86	0.016
22	10.38	0.012	47	11.18	0.015
23	13.09	0.023	48	11.46	0.018
24	11.98	0.021	49	11.07	0.016
25	13.19	0.019	50	10.62	0.014
			เฉลี่ย	11.89±0.91	0.018±0.004

ตารางผนวกที่ 6 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร B กลุ่มสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	10.50	0.012	26	11.06	0.017
2	12.35	0.017	27	12.12	0.018
3	12.27	0.017	28	12.15	0.017
4	12.12	0.016	29	11.77	0.018
5	12.13	0.017	30	9.18	0.012
6	11.51	0.018	31	12.70	0.017
7	12.67	0.020	32	11.12	0.016
8	11.89	0.016	33	12.99	0.021
9	10.84	0.016	34	13.12	0.021
10	11.92	0.016	35	11.43	0.020
11	11.70	0.019	36	11.56	0.016
12	12.40	0.017	37	12.31	0.016
13	12.66	0.018	38	12.40	0.019
14	13.07	0.021	39	11.81	0.015
15	13.36	0.020	40	10.94	0.014
16	12.00	0.018	41	12.52	0.019
17	11.48	0.016	42	12.13	0.017
18	12.44	0.020	43	12.30	0.017
19	11.50	0.015	44	12.57	0.021
20	11.65	0.015	45	11.99	0.017
21	12.58	0.017	46	12.00	0.017
22	12.56	0.021	47	12.53	0.018
23	13.07	0.022	48	10.82	0.014
24	11.68	0.020	49	12.93	0.020
25	12.43	0.020	50	12.72	0.019
			เฉลี่ย	12.04±0.77	0.018±0.002

ตารางผนวกที่ 7 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร B กลุ่มสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.29	0.013	26	11.87	0.020
2	11.18	0.015	27	10.90	0.016
3	11.97	0.019	28	12.78	0.026
4	11.40	0.016	29	11.85	0.020
5	11.93	0.021	30	12.44	0.022
6	11.64	0.017	31	10.97	0.017
7	12.89	0.020	32	11.52	0.022
8	11.16	0.019	33	10.97	0.018
9	12.39	0.020	34	10.29	0.015
10	12.39	0.024	35	12.03	0.019
11	10.27	0.018	36	10.12	0.013
12	10.87	0.016	37	13.43	0.026
13	10.36	0.014	38	12.69	0.023
14	9.61	0.016	39	10.51	0.016
15	11.29	0.019	40	11.69	0.018
16	11.96	0.016	41	11.51	0.018
17	11.32	0.020	42	11.34	0.016
18	11.95	0.020	43	11.85	0.020
19	11.15	0.018	44	10.64	0.019
20	11.64	0.019	45	11.52	0.022
21	11.78	0.017	46	11.51	0.022
22	11.46	0.020	47	12.89	0.029
23	10.08	0.015	48	10.91	0.021
24	11.30	0.020	49	11.56	0.019
25	10.84	0.0135	50	11.60	0.021
			เฉลี่ย	11.47±0.79	0.019±0.003

ตารางผนวกที่ 8 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.4 ในประชากร B คู่ผสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.98	0.018	26	11.69	0.015
2	10.14	0.012	27	10.06	0.012
3	10.80	0.016	28	9.89	0.013
4	10.90	0.015	29	11.42	0.014
5	9.82	0.013	30	10.39	0.012
6	10.38	0.015	31	11.34	0.015
7	11.88	0.019	32	9.99	0.013
8	10.44	0.012	33	9.85	0.014
9	12.33	0.019	34	10.85	0.017
10	10.13	0.015	35	12.68	0.021
11	10.08	0.015	36	13.55	0.027
12	11.22	0.014	37	9.35	0.011
13	11.58	0.017	38	9.63	0.011
14	10.73	0.012	39	11.06	0.013
15	9.89	0.012	40	10.63	0.014
16	10.07	0.016	41	10.93	0.013
17	12.47	0.021	42	12.83	0.022
18	10.34	0.013	43	10.90	0.016
19	11.33	0.015	44	9.73	0.010
20	11.01	0.021	45	9.90	0.011
21	10.62	0.012	46	10.08	0.012
22	12.00	0.018	47	11.99	0.020
23	11.08	0.016	48	10.04	0.014
24	11.31	0.018	49	9.33	0.010
25	11.30	0.016	50	12.63	0.020
			เฉลี่ย	10.89±0.99	0.015±0.004

ตารางผนวกที่ 9 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำ
ปกติ ระดับ pH 7.8 ในประชากร C คู่ผสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	14.20	0.025	26	12.81	0.021
2	12.84	0.021	27	11.69	0.016
3	11.98	0.016	28	12.14	0.018
4	12.21	0.018	29	12.23	0.019
5	11.65	0.020	30	13.19	0.021
6	13.16	0.021	31	11.86	0.018
7	10.91	0.012	32	10.65	0.013
8	12.41	0.022	33	13.31	0.025
9	12.10	0.018	34	11.84	0.014
10	12.53	0.017	35	11.08	0.019
11	13.30	0.023	36	12.48	0.021
12	11.94	0.017	37	13.39	0.023
13	12.81	0.023	38	12.94	0.021
14	12.86	0.022	39	10.13	0.010
15	13.65	0.024	40	11.26	0.017
16	13.20	0.021	41	10.44	0.014
17	12.22	0.017	42	11.46	0.016
18	12.44	0.019	43	13.15	0.023
19	10.36	0.014	44	11.70	0.017
20	11.22	0.015	45	12.52	0.023
21	12.87	0.021	46	12.57	0.021
22	12.49	0.020	47	12.29	0.021
23	12.16	0.021	48	13.60	0.022
24	13.24	0.022	49	13.13	0.021
25	10.93	0.012	50	13.05	0.022
			เฉลี่ย	12.29±0.93	0.019±0.004

ตารางผนวกที่ 10 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำ
ปกติ ระดับ pH 7.8 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.10	0.017	26	10.67	0.016
2	12.76	0.022	27	12.56	0.020
3	11.75	0.018	28	12.25	0.023
4	11.61	0.018	29	10.55	0.013
5	8.64	0.010	30	11.05	0.020
6	10.53	0.017	31	11.64	0.018
7	11.27	0.018	32	11.20	0.015
8	11.85	0.021	33	11.09	0.016
9	13.63	0.024	34	10.53	0.013
10	11.26	0.016	35	11.42	0.021
11	12.76	0.026	36	12.38	0.020
12	12.97	0.026	37	10.82	0.018
13	13.29	0.024	38	11.50	0.017
14	11.18	0.016	39	10.88	0.018
15	10.88	0.016	40	11.88	0.019
16	11.81	0.020	41	12.32	0.021
17	13.30	0.027	42	11.09	0.018
18	11.17	0.018	43	11.30	0.018
19	10.61	0.016	44	11.47	0.018
20	11.29	0.018	45	11.93	0.020
21	11.55	0.018	46	13.57	0.027
22	12.27	0.019	47	11.86	0.018
23	12.30	0.019	48	11.63	0.017
24	10.66	0.018	49	12.98	0.023
25	11.99	0.019	50	11.71	0.017
			เฉลี่ย	11.65±0.93	0.019±0.003

ตารางผนวกที่ 11 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	12.68	0.020	26	13.32	0.023
2	13.22	0.021	27	12.73	0.019
3	12.70	0.023	28	12.48	0.019
4	12.50	0.017	29	12.45	0.018
5	13.17	0.023	30	13.70	0.028
6	12.53	0.018	31	13.37	0.023
7	12.57	0.017	32	12.95	0.020
8	13.07	0.019	33	12.36	0.027
9	12.55	0.022	34	12.69	0.023
10	10.69	0.016	35	12.28	0.020
11	12.50	0.020	36	11.96	0.019
12	12.93	0.024	37	13.00	0.024
13	12.27	0.020	38	11.85	0.019
14	14.52	0.029	39	12.83	0.020
15	12.39	0.017	40	12.42	0.020
16	14.79	0.031	41	12.33	0.020
17	12.73	0.023	42	11.96	0.020
18	12.49	0.018	43	12.31	0.020
19	12.20	0.020	44	14.03	0.027
20	13.56	0.023	45	13.54	0.024
21	10.49	0.013	46	12.54	0.021
22	12.16	0.021	47	12.06	0.015
23	12.54	0.020	48	13.12	0.021
24	11.93	0.018	49	13.12	0.026
25	13.71	0.025	50	12.07	0.021
			เฉลี่ย	12.69±0.77	0.021±0.004

ตารางผนวกที่ 12 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักไบโอบิวาจา ระดับ pH 6.8 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 2

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	12.66	0.022	26	11.96	0.020
2	11.99	0.020	27	13.08	0.023
3	11.37	0.016	28	12.93	0.021
4	12.69	0.021	29	9.03	0.007
5	11.37	0.015	30	10.81	0.014
6	11.15	0.016	31	12.45	0.024
7	13.15	0.025	32	11.97	0.021
8	12.99	0.023	33	12.23	0.018
9	11.59	0.019	34	12.38	0.025
10	12.29	0.021	35	11.47	0.015
11	11.21	0.016	36	12.41	0.023
12	11.31	0.015	37	9.91	0.011
13	11.41	0.017	38	12.16	0.019
14	10.40	0.010	39	12.82	0.025
15	12.28	0.021	40	11.07	0.014
16	12.83	0.021	41	13.03	0.023
17	11.40	0.017	42	11.63	0.019
18	11.76	0.021	43	11.55	0.015
19	12.35	0.021	44	12.59	0.024
20	11.77	0.018	45	12.92	0.023
21	11.38	0.015	46	12.17	0.019
22	12.74	0.022	47	12.86	0.023
23	13.31	0.025	48	14.07	0.026
24	10.28	0.013	49	13.09	0.027
25	13.21	0.021	50	11.61	0.017
			เฉลี่ย	12.02±0.96	0.019±0.004

ตารางผนวกที่ 13 ความยาว (มิลลิเมตร) และน้ำหนัก (กรัม) ของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมักใบहुกวาง ระดับ pH 6.4 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 1

ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก	ลำดับที่	ความยาว	น้ำหนัก
1	11.40	0.013	26	10.69	0.013
2	9.90	0.007	27	8.60	0.006
3	10.18	0.013	28	8.77	0.010
4	10.72	0.015	29	9.79	0.015
5	10.76	0.010	30	10.51	0.009
6	9.09	0.007	31	10.74	0.011
7	10.20	0.012	32	10.85	0.012
8	9.71	0.008	33	10.18	0.009
9	10.65	0.009	34	10.89	0.013
10	10.40	0.009	35	10.80	0.010
11	11.03	0.012	36	10.62	0.012
12	9.71	0.009	37	9.92	0.009
13	9.43	0.008	38	10.75	0.012
14	10.34	0.010	39	9.55	0.008
15	9.92	0.011	40	10.65	0.012
16	8.94	0.009	41	10.74	0.013
17	11.31	0.014	42	11.07	0.013
18	7.80	0.006	43	10.62	0.010
19	9.35	0.007	44	8.92	0.009
20	10.09	0.009	45	10.72	0.012
21	8.81	0.008	46	10.90	0.014
22	10.46	0.012	47	10.88	0.010
23	7.87	0.007	48	10.72	0.009
24	10.79	0.012	49	8.52	0.009
25	10.76	0.012	50	10.59	0.011
			เฉลี่ย	10.13±0.88	0.010±0.002

ตารางผนวกที่ 14 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในประชากร A คู่ผสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
(chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	24	25	-1.0
Female	26	25	1.0
Total	50		

Test statistic

	Pop A
Chi-square	0.080
d.f.	1
Asymp.sig.	0.777

ตารางผนวกที่ 15 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในประชากร B กลุ่มที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
(chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	23	25	-2.0
Female	27	25	2.0
Total	50		

Test statistic

	Pop B
Chi-square	0.320
d.f.	1
Asymp.sig.	0.572

ตารางผนวกที่ 16 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในประชากร B คู่ผสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
(chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	20	25	-5.0
Female	30	25	5.0
Total	50		

Test statistic

	Pop B
Chi-square	2.000
d.f.	1
Asymp.sig.	0.157

ตารางผนวกที่ 17 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในประชากร C คู่ผสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
(chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	24	25	-1.0
Female	26	25	1.0
Total	50		

Test statistic

	Pop C
Chi-square	0.080
d.f.	1
Asymp.sig.	0.777

ตารางผนวกที่ 18 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในประชากร C คู่ผสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
(chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	25	25	0.0
Female	25	25	0.0
Total	50		

Test statistic

	Pop C
Chi-square	0.000
d.f.	1
Asymp.sig.	1.000

ตารางผนวกที่ 19 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำปกติ
ระดับ pH 7.8 ในทุกประชากร โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	116	125	-9.0
Female	134	125	9.0
Total	250		

Test statistic

	Total 7.8
Chi-square	1.296
d.f.	1
Asymp.sig.	0.255

ตารางผนวกที่ 20 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร A คู่ผสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	26	25	1.0
Female	24	25	-1.0
Total	50		

Test statistic

	Pop A
Chi-square	0.080
d.f.	1
Asymp.sig.	0.777

ตารางผนวกที่ 21 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบบูกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร A คู่ผสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	31	25	6.0
Female	19	25	-6.0
Total	50		

Test statistic

	Pop A
Chi-square	2.880
d.f.	1
Asymp.sig.	0.090

ตารางผนวกที่ 22 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร B กลุ่มสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	38	25	13.0
Female	12	25	-13.0
Total	50		

Test statistic

	Pop B
Chi-square	13.520
d.f.	1
Asymp.sig.	0.000

ตารางผนวกที่ 23 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลาที่อายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ไบโหกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร B กลุ่มสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	28	25	3.0
Female	22	25	-3.0
Total	50		

Test statistic

	Pop B
Chi-square	0.720
d.f.	1
Asymp.sig.	0.396

ตารางผนวกที่ 24 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบบูกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	25	25	0.0
Female	25	25	0.0
Total	50		

Test statistic

	Pop C
Chi-square	0.000
d.f.	1
Asymp.sig.	1.000

ตารางผนวกที่ 25 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบहुกวาง ระดับ pH 6.8 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 2 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	42	25	17.0
Female	8	25	-17.0
Total	50		

Test statistic

	Pop C
Chi-square	23.120
d.f.	1
Asymp.sig.	0.000

ตารางผนวกที่ 26 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ไบฮูกวาง ระดับ pH 6.8 ในทุกประชากร โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	190	150	40.0
Female	110	150	-40.0
Total	300		

Test statistic

	Total 6.8
Chi-square	21.333
d.f.	1
Asymp.sig.	0.000

ตารางผนวกที่ 27 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบहुกวาง ระดับ pH 6.4 ในประชากร B กลุ่มสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	25	25	0.0
Female	25	25	0.0
Total	50		

Test statistic

	Pop B
Chi-square	0.000
d.f.	1
Asymp.sig.	1.000

ตารางผนวกที่ 28 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ใบहुกวาง ระดับ pH 6.4 ในประชากร C กลุ่มสมที่ 1 โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์
 χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	34	25	9.0
Female	16	25	-9.0
Total	50		

Test statistic

	Pop C
Chi-square	6.480
d.f.	1
Asymp.sig.	0.011

ตารางผนวกที่ 29 การวิเคราะห์สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียของลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำหมัก
 ไบฮูกวาง ระดับ pH 6.4 ในทุกประชากร โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2
 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
Male	59	50	9.0
Female	41	50	-9.0
Total	100		

Test statistic

	Total 6.4
Chi-square	3.240
d.f.	1
Asymp.sig.	0.072

ตารางผนวกที่ 30 การวิเคราะห์ผลของ pH ต่ออัตราการรอดของเชื้อตัวผู้ ที่แช่น้ำหมักใบหูกวาง นาน 1 นาที ที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยวิธีตรวจดู ตัวเป็น- ตัวตายด้วยการย้อมสี (Eosin-Nigrosin) โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
7.8	59	58.3	0.7
6.8	58	58.3	-0.3
6.4	58	58.3	-0.3
Total	239		

Test statistic

	1 min
Chi-square	0.011
d.f.	2
Asymp.sig.	0.994

ตารางผนวกที่ 31 การวิเคราะห์ผลของ pH ต่ออัตราการของเชื้อตัวผู้ ที่แช่น้ำหมักใบหูกวาง นาน 2 นาที ที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ โดยวิธีตรวจดู ตัวเป็น-ตัวตายด้วยการย้อมสี (Eosin-Nigrosin) โดยใช้วิธีทดสอบไคสแควร์ χ^2 (chi-square test)

SOV	Observed N	Expected N	Residual
7.8	35	32.3	2.7
6.8	25	32.3	-7.3
6.4	37	32.3	4.7
Total	175		

Test statistic

	2 min
Chi-square	2.557
d.f.	2
Asymp.sig.	0.278

ตารางผนวกที่ 32 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F test ของเปอร์เซ็นต์ลูกปลากัดเพศผู้อายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ

SOV		SS	d.f.	MS	F	Sig.
pH	Between Group	0.000	2	0.000	0.000	1.000
	Within Group	6.240	15	0.416		
	Total	6.240	17			
% male	Between Group	120.492	2	60.246	0.325	0.730
	Within Group	1851.200	10	185.120		
	Total	1971.692	12			

ตารางผนวกที่ 33 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F test ของความยาว และน้ำหนักเฉลี่ยลูกปลากัดอายุ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ

SOV		SS	d.f.	MS	F	Sig.
Length	Between Group	3.596	2	1.798	9.540	0.005
	Within Group	1.885	10	0.188		
	Total	5.481	12			
Weight	Between Group	0.000	2	0.000	13.368	0.001
	Within Group	0.000	10	0.000		
	Total	0.000	12			

Duncan Length

pH	N	Subset for alpha=0.05	
		1	2
6.4	2	10.5115	
7.8	5		11.8356
6.8	6		12.0385
Sig.		1.0000	0.5520

Duncan Weight

pH	N	Subset for alpha=0.05	
		1	2
6.4	2	0.0125	
7.8	5		0.0182
6.8	6		0.0190
Sig.		1.0000	0.4870

ตารางผนวกที่ 34 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และการทดสอบทางสถิติโดยใช้ F test ของอัตรารอดลูกปลากัดอายุ 4 และ 15 วัน ที่เพาะในน้ำที่มีระดับ pH เท่ากับ 7.8, 6.8 และ 6.4 ตามลำดับ

SOV		SS	d.f.	MS	F	Sig.
Day 4	Between Group	60.496	2	30.248	2.751	0.112
	Within Group	109.933	10	10.993		
	Total	170.429	12			
Day 15	Between Group	23.239	2	11.620	0.016	0.900
	Within Group	1092.835	10	109.284		
	Total	1116.075	12			