**โครงการ**

# การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** ผลของระดับความเค็มที่แตกต่างต่อพัฒนาการเหงือกและเซลล์คลอไรด์ของปลา *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 ในจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย

Effects of different salinity levels on the gill and the chloride cell of *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 in Samut Prakan Province, Thailand.

**ชื่อนิสิต** นางสาวศิริรัตน์ สาธร **เลขประจำตัว** 5832830023

**ภาควิชา** วิทยาศาสตร์ทางทะเล

**ปีการศึกษา** 2562

**คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

# ผลของระดับความเค็มที่แตกต่างต่อพัฒนาการเหงือกและเซลล์คลอไรด์ของปลา *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 ในจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย

ศิริรัตน์ สาธร

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

# Effects of different salinity levels on the gill and the chloride cell of *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 in Samut Prakan Province, Thailand.

Sirirat Sathorn

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Bachelor of Science in Marine Science
Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2019

| | |
|---|---|
| **หัวข้อโครงการ** | ผลของระดับความเค็มที่แตกต่างต่อพัฒนาการเหงือกและเซลล์คลอไรด์ของปลา *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 ในจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย |
| **โดย** | นางสาว ศิริรัตน์ สาธร |
| **ภาควิชา** | วิทยาศาสตร์ทางทะเล |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการหลัก** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจษฎ์ เกษตระทัต |

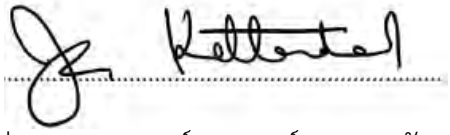
---

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงการฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2309499 โครงงานวิทยาศาสตร์

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

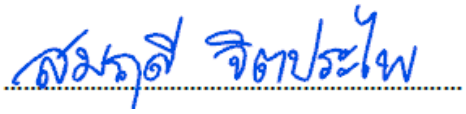
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรณพ วิยกาญจน์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน



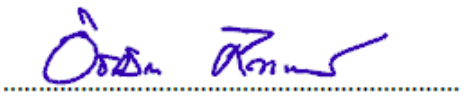
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจษฎ์ เกษตระทัต)



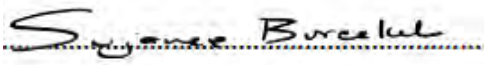
กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมฤดี จิตประไพ)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อิชฌิกา ศิวายพราหมณ์)



กรรมการ

(อาจารย์ ดร. สุจารี บุรีกุล)

| | |
|---|---|
| **Project Title** | Effects of different salinity levels on the gill and the chloride cell of *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 in Samut Prakan Province, Thailand. |
| **By** | Miss Sirirat Sathorn |
| **Field of Study** | Marine Science |
| **Advisor** | Assistant Professor Jes Kettratad, Ph.D. |

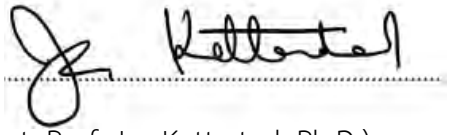
---

Accepted by the Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirement for the Bachelor's Degree.

Head of Marine Science Department

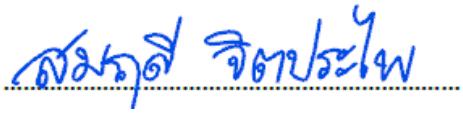
(Assoc. Prof. Voranop Viyakarn, Ph. D.)

PROJECT COMMITTEE



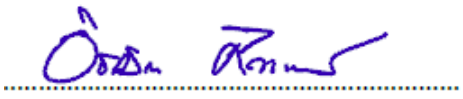
Project Advisor

(Asst. Prof. Jes Kettratad, Ph.D.)



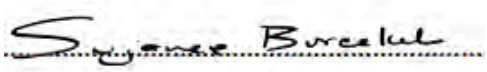
Member

(Asst. Prof. Somrudee Jitpraphai, Ph. D.)



Member

(Asst. Prof. Itchika Sivaipram, Ph. D.)



Member

(Sujaree Bureekul, Ph. D.)

**ชื่อโครงการ** ผลของระดับความเค็มที่แตกต่างต่อพัฒนาการเหงือกและเซลล์คลอไรด์ของปลา *Poecilia mexicana* Steindachner, 1863 ในจังหวัดสมุทรปราการ ประเทศไทย

**ชื่อนิสิต** นางสาว ศิริรัตน์ สาธร

**อาจารย์ที่ปรึกษา** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจษฎ์ เกษตระทัต

**ปีการศึกษา** 2562

**ภาควิชา** วิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

---

## บทคัดย่อ

ปลา *Poecilia mexicana* เป็นปลาต่างถิ่นพบการกระจายตัวได้ทั่วไป ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล ในการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปลาชนิดนี้สามารถอาศัยในบริเวณที่มีความเค็มสูงและในแหล่งน้ำเน่าเสียได้ ทั้งนี้ในการปรับตัวของปลาต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มนั้นปลาจะใช้อวัยวะสำคัญคือเหงือกและไตในการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของโซเดียมและคลอไรด์ไอออนในตัว ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์คลอไรด์ในเหงือกต่อความเค็มที่แตกต่างกันที่พบในปลาชนิดนี้ โดยทำการเก็บปลาจากบริเวณลำคลอง สุขสวัสดิ์ 84 ตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการทำการเลี้ยงในระดับความเค็มต่างๆกันโดยที่นำมาปรับสภาพในน้ำจืดเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง ปลาชนิดนี้จะถูกปรับความเค็มขึ้นในแต่ละระดับความเค็ม ได้แก่ 0,10,20,30,40,50 ppt เพื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์คลอไรด์ที่นับได้ในแต่ละความเค็มและความแตกต่างระหว่างเพศที่ความเค็ม 0,10,30 ppt การศึกษาเนื้อเยื่อของเหงือกปลาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการศึกษาพบว่าปลาในน้ำจืดมีจำนวนเซลล์คลอไรด์บน primary lamella น้อยกว่าปลาในน้ำที่เค็มกว่า ซึ่งจะพบว่ามีจำนวนเซลล์คลอไรด์มากขึ้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้น และไม่พบความแตกต่างของจำนวนเซลล์คลอไรด์ระหว่างเพศ ในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเหงือกเป็นอวัยวะแรกที่ได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงความเค็ม ซึ่งหน้าที่การขับโซเดียมและคลอไรด์ไอออนส่วนเกินของปลาในน้ำเค็มนั้นอยู่ที่เซลล์คลอไรด์บริเวณเหงือก เซลล์ซึ่งมีโครงสร้างพิเศษนี้ใช้กระบวนการทางระดับเซลล์และโมเลกุลในการปรับสมดุลของไอออนแร่ธาตุจึงมีบทบาทสำคัญในการขับเกลือให้อยู่ในระดับที่เหมาะในการดำรงชีวิต

คำสำคัญ : *Poecilia mexicana* เซลล์คลอไรด์ ความเค็ม การปรับสมดุลไอออน การปรับตัว

**Project Title** Effects of different salinity levels on the gill and the chloride cell of *Poecilia mexicana* in Samut Prakan Province, Thailand.

**Name** Miss Sirirat Sathorn

**Advisor** Assistant Professor Jes Kettratad, Ph.D.)

**Academic Year** 2019

**Department** Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University

## Abstract

*Poecilia mexicana* is an alien species fish distributing generally in freshwater, brackish and salt water. In the preliminary study found high ability of adaptation in this kind of fish especially in high salinity area and polluted water resources. In order to adapt in the extreme salinity change fish use two vital organs gills and kidneys to maintain homeostasis of Sodium and Chloride ion in the body.The purpose of this study mainly focus on the change in number of Chloride cells in different salinity of this fish species. The fishes were collected from swamp at Suksawad 84 Naiklongbangplakod Prasamuthjedi district Samutprakarn province. *Poecilia mexicana* were acclimated in fresh water for two weeks. Fishes were transferred gradually to salinities of 0,10,20,30,40,50 ppt in order to compare Chloride cell number in each salinity and the gender difference at the salinity level 0, 10,30 ppt. During the histological examination of gill structure were studied by Compound Light Microscopy (LM). The result showed fish in freshwater samples had less chloride cell on primary lamella while fish in salt water chloride cell tended to increase in their number as the salinity increased and there was no significant difference in chloride cell amount between sexes. This study showed that the gill was the primary target organ for acute effects in salinity change. The secretion of excess sodium and chloride by fishes in seawater is carried out by gill chloride cells. These highly specialized cells use cellular and molecular approaches to fish ionic regulation playing a central role in the salt-secretory function of chloride cells.

Keyword : *Poecilia mexicana*, chloride cell, salinity, ion homeostasis, adaptation

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากคณาจารย์และบุคคลหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจษฎ์ เกษตระทัต อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ศิลปชัย เสนารัตน์ อาจารย์ประจำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และ รองศาสตราจารย์ ดร. วรรณีย์ จิรอังกูรสกุล อาจารย์ประจำภาควิชาพยาธิชีววิทยาวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดลเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำในการทำการทดลอง และตรวจสอบแก้ไขโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณ สมนึก กู๋ทะ เจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาพยาธิชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล ที่คอยช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่าง การทดลองและเทคนิคที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง รวมถึงการช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ น้อง ภายในภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ที่คอยช่วยเหลือในการทำการทดลองและเป็นกำลังใจในการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ครั้งนี้ให้สำเร็จไปได้อย่างดี

ศิริรัตน์ สาธร

# สารบัญ

บทคัดย่อ .....ก

Abstract .....ข

กิตติกรรมประกาศ .....ค

สารบัญ .....ง

สารบัญรูป .....จ

สารบัญตาราง .....ฉ

บทที่ 1 บทนำ .....1

1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา .....1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ .....2

1.3 ขอบเขตการศึกษา .....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....2

บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง .....3

2.1 เซลล์คลอไรด์ .....3

2.2 ฮอร์โมน .....4

2.3 Energy allocation .....4

2.4 Stenohaline fresh water .....5

บทที่ 3 วิธีการศึกษา .....6

3.แผนการศึกษา .....6

3.1 ส่วนภาคสนาม .....6

3.2 ส่วนห้องปฏิบัติการ .....6

บทที่ 4 ผลการศึกษา และวิจารณ์ผล .....11

4.1 โครงสร้างพื้นฐานของเหงือกปลา .....11

4.2 การจำแนกเพศปลา *Poecilia mexicana* .....12

4.3 จำนวนเซลล์คลอไรด์ .....13

4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ Two way ANOVA .....14

บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ .....17

5.1 สรุปผลการศึกษา .....17

5.2 ข้อเสนอแนะ .....17

เอกสารอ้างอิง .....18

ภาคผนวก .....20

# สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 แผนภาพการแสดงการทดลองในช่วงความเค็มที่ต่างกันของเพศเมีย..... 8
2 แผนภาพการแสดงการทดลองในช่วงความเค็มที่ต่างกันของเพศผู้..... 9
3 ตัวอย่างแผนภาพการทำการุณยฆาตในปลาเพศเมีย..... 10
4 ตัวอย่างแผนภาพการทำการุณยฆาตในปลาเพศผู้..... 10
5 ภาพแสดงโครงสร้างพื้นฐานของเหงือกปลา..... 11
6 ลักษณะปลา Poecilia mexicana เพศผู้..... 12
7 ลักษณะปลา Poecilia mexicana เพศเมีย..... 12
8 กราฟแสดง ค่าเฉลี่ยระหว่างเพศผู้และเพศเมียในแต่ละความเค็ม..... 13
9 ภาคผนวก ก พื้นที่ออกภาคสนาม..... 21
10 ภาคผนวก ข รูปวิธีการศึกษา Histology..... 22

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 จำนวนเซลล์คลอไรด์ ต่อ primary lamella..... 13
2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อจำนวนเซลล์คลอไรด์..... 14
3 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละระดับความเค็ม..... 14

# บทที่ 1 บทนำ

## 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการศึกษา

ปลาในสกุล *Poecilia* ที่จัดเป็นกลุ่มปลาออกลูกเป็นตัว (ovoviviparous fish) สามารถพบการกระจายตัวได้ทั้งในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล มีถิ่นกำเนิดตั้งแต่สหรัฐอเมริกาภาคตะวันออกอเมริกากลาง จนถึงทางตอนเหนือของทวีปอเมริกาใต้ นอกจากนี้ยังพบในบางส่วนของทวีปแอฟริกาทางตอนใต้ถึงเกาะมาดากัสการ์ เป็นปลาที่อาศัยอยู่รวมเป็นฝูง มีพฤติกรรมหากินอยู่ตามผิวน้ำ (วันเพ็ญ มีกาญจน์, 2545) แม้ว่าปลากลุ่มนี้มีสีลำตัวไม่หลากหลายเท่ากับกลุ่มปลาหางนกยูง แต่มีครีบกระโดงหลังที่สูงและแผ่สะดุด จึงทำให้กลายเป็นปลาที่อยู่ในกลุ่มปลาสวยงามซึ่งนำเข้ามาในประเทศไทยมากกว่า 30 ปี ซึ่งคาดว่าเป็นกระบวนการเคลื่อนย้ายปลากลุ่มนี้เข้ามาในแหล่งน้ำไทย การแพร่กระจายของปลากลุ่มนี้ในประเทศไทยนั้นยังไม่พบรายงานถิ่นอาศัยที่แน่ชัด แต่พบการกระจายตัวตามแหล่งน้ำเสียและตามบริเวณที่มีความเค็มสูง เช่น นาเกลือ โดยทั่วไปแล้วกลุ่มปลาต่างถิ่นที่ประสบความสำเร็จในการตั้งถิ่นฐานในระบบนิเวศใหม่ มักมีความสามารถในการปรับตัวได้ดี มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทำให้ปลาชนิดนี้สามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งพื้นฐานมีถิ่นกำเนิดมาจากต่างประเทศทำให้การเพิ่มประชากรนี้อาจส่งผลต่อห่วงโซ่อาหารเข้ามารุกรานในระบบนิเวศ จึงเกิดคำถามขึ้นว่าเหตุใดปลาชนิดนี้ถึงประสบความสำเร็จในการดำรงชีวิตในพื้นที่ที่หลากหลาย ดังนั้นจึงให้ความสำคัญในเรื่องกลไกการปรับตัวต่อความเค็มนั้นเพื่อให้ทราบถึงกลไกการปรับตัวของปลาชนิดนี้

แม้ว่าหัวข้อข้างต้นจะมีความสำคัญอย่างยิ่ง แต่กลับไม่เคยมีรายงานทางวิชาการมาจวบจนถึงปัจจุบัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเหงือกของปลาชนิด *Poecilia mexicana* เนื่องจากโครงสร้างเหงือกและเซลล์คลอไรด์เป็นส่วนที่สำคัญที่เป็นตัวช่วยสำหรับปรับสมดุลไอออนในร่างกายของปลา เป็นเซลล์พิเศษที่เป็น active ion transport คือขับไอออน เพื่อสร้างสมดุล homeostasis ซึ่งเซลล์คลอไรด์พบได้ในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม

**1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ**

เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์คลอไรด์ของปลาชนิด *Poecilia Mexicana* ที่เลี้ยงในระดับความเค็มที่แตกต่างกัน

**1.3 ขอบเขตการศึกษา**

นับจำนวนเซลล์คลอไรด์ ต่อ 1 primary lamella ต่อตัว ความยาวเฉลี่ย 0.001 มิลลิเมตร กำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 40X จากปลาที่นำมาศึกษาทดลองเลี้ยงในความเค็มต่างกัน นำมาจากลำคลอง สุขสวัสดิ์ 84 ตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

**1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้ข้อมูลความสัมพันธ์กลไกการปรับตัวของจำนวนเซลล์คลอไรด์ในแต่ละความเค็มต่างที่กัน เพื่อให้ได้ข้อมูลมากขึ้นสำหรับปลาต่างถิ่นชนิดนี้และเพื่อเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการป้องกันการแพร่กระจายของประชากรที่เพิ่มขึ้น

# บทที่ 2 ทฤษฎีและการศึกษาที่เกี่ยวข้อง

## 2.1 เซลล์คลอไรด์

ปลากลุ่มนี้มักพบในบริเวณที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มสูง ซึ่งปลาที่อยู่ในบริเวณดังกล่าวนั้นต้องมีการปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายในตัวซึ่งบริเวณที่มีความสำคัญในการปรับเปลี่ยนความเค็มคือเหงือกและไต โดยบริเวณเหงือกนั้นพบเซลล์คลอไรด์อยู่เป็นปริมาณมาก เซลล์คลอไรด์ถูกค้นพบโดย Keys & Wilmer คือ เซลล์ที่ทำหน้าที่ในการนำเข้าโซเดียมและคลอไรด์ไอออนเรียกว่า mitochondria-rich cells หรือ เซลล์คลอไรด์ ช่วยปรับสมดุลไอออนให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เซลล์คลอไรด์เป็น 1 ใน 4 ชนิดของเซลล์ที่พบบนโครงสร้างเนื้อเยื่อเหงือกปลา ได้แก่ pavement cells, mucus cells, neuro-epithelial cells เหงือกปลาประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อผิว 2 ส่วนได้แก่ lamella และ filament epithelia ซึ่งเซลล์คลอไรด์จะอยู่ที่ขอบของ filament epithelium โดยจะพบมากที่บริเวณ inter-lamella และบริเวณระหว่างทางแยกของ filament กับ lamella หน้าที่หลักของเซลล์คลอไรด์คือเป็นที่ขับไอออนโดยผ่านช่องทางหลักดังนี้ (1) CFTR $Cl^-$ channel, (2) $Na^+$,$K^+$-ATPase, (3) $Na^+/K^+/2Cl^-$ cotransporter (4) a $K^+$ channel. ภายในโครงสร้างเซลล์คลอไรด์ประกอบไปด้วยส่วนประกอบที่มีมากคือ mitochondria และ Na ,K –ATPase ในปลาตัวเต็มวัยเซลล์ชนิดนี้จะพบที่บริเวณฐานของ secondary lamella และพบใน opercular epithelium สำหรับตัวอ่อนนั้นยังไม่พบเซลล์คลอไรด์ในบริเวณนี้แต่กลับพบบนที่ผิวหนัง และ yolk sac แทน

การปรับคลอไรด์ไอออนและโซเดียมไอออนภายในเซลล์คลอไรด์เมื่อมีความเค็มเพิ่มขึ้น เริ่มจากเซลล์คลอไรด์จะมีการขนส่งคลอไรด์ไอออนอย่างรวดเร็ว ในขณะที่โซเดียมไอออนเคลื่อนที่ตามระดับความเข้มข้นของไอออน โดยการขับทิ้งนั้นจะผ่านตัวรับคือ catecholamine และ cholinergic นอกจากนี้เซลล์คลอไรด์ยังต้องอาศัย Na-K-2Cl co-transporter และ chloride channels ที่อยู่ใน apical membrane และยังอาศัยการแลกเปลี่ยนของ Na/H และCl/HCO3 เพื่อขับคลอไรด์ไอออนทิ้ง เพื่อควบคุม pH ระหว่างเซลล์ให้ปกติ โดยจะมีการลดการซึมผ่านของเหงือกอย่างรวดเร็วก่อนเป็นอันดับแรกแล้วจะเริ่มการหลั่งคลอไรด์ไอออน การปรับสภาพนี้จะต้องตอบสนองต่อสัญญาณที่รวดเร็วมากทำให้เยื่อบุผิวของการหลั่งคลอไรด์ปั๊มเกลือจากเลือดไปสู่ภายนอก หลังจากการปรับตัวเป็นสัปดาห์ขึ้นไปพบว่าจะมีการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์คลอไรด์ในเหงือกปลาและ Na,K-ATPase นั้นเพิ่มขึ้นเท่ากับเซลล์คลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมาอีกด้วย กระบวนการนี้ของการเพิ่มจำนวนเซลล์และเอนไซม์ในเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกควบคุมโดยฮอร์โมน cortisol (Zadunaisky,1996)

**2.2 ฮอร์โมน**

Neuroendocrine system มีความเกี่ยวข้องเป็นอันดับแรกของการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมกับ physiological adaptation เพราะเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมเซลล์คลอไรด์ และ Na,K-ATPase ฮอร์โมน cortisol เป็นฮอร์โมนแรกที่จะกระตุ้นเหงือกและ Na,K-ATPase เมื่อสภาพแวดล้อมมีความเค็มสูงขึ้น ทำให้จำนวนเซลล์คลอไรด์เพิ่มขึ้นที่พบในปลาที่ผ่านการศึกษาแล้ว ยกตัวอย่างเช่น American eel, brown trout, tilapia (Foskett, 1981) และพบว่าที่เนื้อเยื่อบุผิวเหงือกปลาพบ cortisol receptors อยู่บนเนื้อเยื่อ โดยที่ฮอร์โมนที่เพิ่มจำนวนเซลล์คลอไรด์เป็นหลักคือ ฮอร์โมน cortisol แต่ยังมีฮอร์โมนอื่นๆที่มีส่วนเกี่ยวข้องด้วยเช่น growth hormone (GH) ทำงานส่งเริมในหลายด้านเช่น การเพิ่ม cortisol receptors บนเนื้อเยื่อบุผิวเหงือกปลาและพบ growth hormone receptor ทั้งในเหงือกปลาและไตของปลา สำหรับ thyroid hormone ช่วยนั้นช่วยพัฒนาเซลล์คลอไรด์ (McCormick, 1995)

การทำงานของฮอร์โมนcortisol ฮอร์โมนชนิดนี้ถูกชักนำจากความเครียดผ่านวงจร Hypothalamo-Pituitary-Interrenal Axis(HPI axis) ส่งผลให้ฮอร์โมน cortisol หลั่งออกจากส่วนของ interrenal ที่ไต (Gamperl, 1994)

**2.3 Energy allocation**

การประสบความสำเร็จในการสืบพันธุ์เพื่อให้มีลูกหลานของสิ่งมีชีวิตนั้นต้องอาศัยพลังงานที่จะถูกใช้ไปสร้างองค์ประกอบ 2 ส่วนที่สำคัญคือ 1) เพื่อการเติบโตและการปรับสมดุลร่างกาย 2)เพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์ ทั้งนี้พบว่า ปลา anadromous คือ ปลาที่ใช้ชีวิตส่วนใหญ่หากินอยู่ในทะเลแต่ต้องอพยพเข้าสู่น่านน้ำจืดเพื่อการผสมพันธุ์และการ วางไข่ ปลาประเภทนี้ได้แก่ ปลาแซลมอน และปลาปากกลม มีการใช้พลังงานทั้งการใช้เพื่อการเจริญเติบโตและการปรับสมดุลร่างกาย รวมทั้งเพื่อการสืบพันธุ์มากกว่าปลาที่อยู่นิ่งอยู่กับที่ไม่มีการอพยพย้ายถิ่น เพราะต้องใช้พลังงานสูงกว่าในการย้ายถิ่นอาศัยไปยังแหล่งสืบพันธุ์ (Jonsson, 1997)

สำหรับการแต่งต่างระหว่างเพศนั้น ปลาเพศผู้และเพศเมีย จะมีการใช้พลังงานเพื่อการเติบโตและการปรับสมดุลร่างกายเท่ากันเมื่อยังไม่โตเต็มวัย แต่จะเริ่มแตกต่างกันเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์แล้วโดยที่เพศเมียจะมีการใช้พลังงานในการสร้างระบบสืบพันธุ์มากกว่าเพศผู้ (Jonsson, 2003)

**2.4 Stenohaline fresh water**

ในปลาน้ำจืดยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าเซลล์คลอไรด์มีตำแหน่งใดที่ชัดเจนบนเนื้อเยื่อบุผิวโครงสร้างเหงือก ในอันดับแรกมีการศึกษาว่าพบ mucous cell ในโครงสร้างเหงือกนั้นทำหน้าที่แทนการขับคลอไรด์ไอออน (munshi, 1964) จากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopic) แต่มีขีดจำกัดคือไม่สามารถแยกเซลล์ได้ชัดเจน แต่เมื่อทำการศึกษาด้วย electron microscope พบว่ามีเซลล์ขนาดใหญ่ภายในมี mitochondria จำนวนมากมีลักษณะเป็นแท่งพบในเนื้อเยื่อบุผิวเหงือกของปลาทอง หลังจากนั้นถูกเรียกว่า Tubili mitochondriales ต่อมามีการศึกษาเซลล์ที่มีลักษณะเดียวกันนี้ถูกตั้งชื่อเรียกว่าเซลล์คลอไรด์ (Henrikson, 1967) จึงเป็นที่มาว่าในปลาน้ำจืดมีเซลล์คลอไรด์เช่นกันแต่ไม่ได้มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์คลอไรด์เมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นได้ในลักษณะเดียวกับ euryhaline fish แต่สามารถเพิ่มขนาดเซลล์ได้อาจเป็นไปได้ที่เซลล์คลอไรด์นี้ทำหน้าที่ ion-transport ในปลาน้ำจืด (Susumu, 1997)

# บทที่ 3 วิธีการศึกษา

## 3.แผนการศึกษา

3.1 ส่วนภาคสนาม

ใช้สัตว์ทดลองที่เก็บจากภาคสนามทั้งหมด 306 ตัว โดยจะออกภาคสนามในช่วงตุลาคม 2562 จะนำตัวอย่างปลา *Poecilia mexicana* จากลำคลองในตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ โดยใช้สวิงขนาดตาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ตักจากคลองพร้อมอัดออกซิเจนใส่ถุง ใช้ 5 ถุง ถุงละ 50 ตัว ขนส่งโดยใช้รถที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเดินทางประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อมายังภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ตึกคลุ้มวัชโรบล

3.2 ส่วนห้องปฏิบัติการ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนการทดลอง คือ

1. การทดลองเลี้ยงจากสภาพแวดล้อมความเค็มที่ต่างกัน

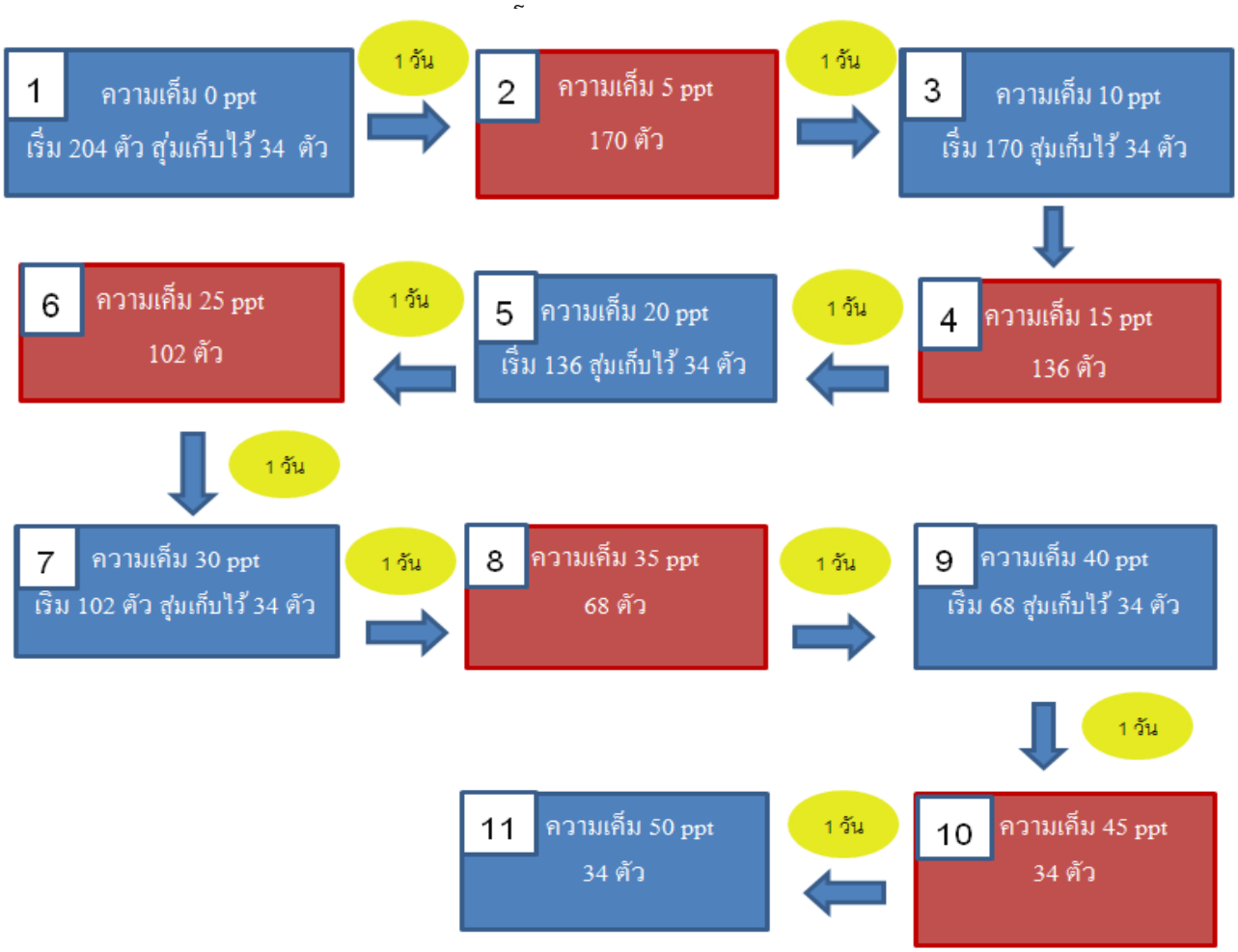
1) นำปลา *Poecilia mexicana* ที่ได้จากภาคสนาม 306 ตัวมาเลี้ยงที่ตู้ความเค็ม 0 ppt เพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 2 สัปดาห์ อาหารที่ให้จะเป็นอาหารเม็ดลอยน้ำยี่ห้อซากุระ
2) เลือกขนาดปลาตัวเมีย 204 ตัว และตัวผู้ 102 ตัว ที่ได้ให้ได้ความยาวตัว total length (TL) คือความยาวตั้งแต่ปลายปากถึงสุดปลายหาง ให้ได้ความยาว 2.5 – 5 เซนติเมตร แล้วนำไปทดลองเลี้ยงตามความเค็มที่ต่างกัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์
3) เลี้ยงปลาในตู้ขนาด 60x40x30 เซ็นติเมตร ในเพศเมียมีทั้งหมด 11 ตู้ ตู้ละ 34 ตัว จะเลี้ยงทดสอบความเค็มที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50 ppt โดยที่จะมีการปรับความเค็มระหว่างวันเพิ่มวันละ 5 ppt คือความเค็มที่ 5,15,25,35,45 ppt เริ่มจาก นำปลาเพศเมียทั้งหมดจำนวน 204 ตัว มาเลี้ยงไว้ที่ความเค็ม 0 ppt เมื่อได้ระยะเวลา 2 วันจะทำการสุ่มตัวอย่างเก็บไว้ 34 ตัว จำนวนปลาที่เหลือ170 ตัวจะย้ายไปที่ความเค็ม 10 ppt เมื่อได้ระยะเวลา 2 วันจะสุ่มตัวอย่างเก็บไว้ 34 ตัว และจำนวนที่เหลือจะย้ายไปความเค็มถัดไปจนถึงความเค็มที่ 50 ppt (ดังรูปที่ 1) ในตัวผู้มีทั้งหมด 7 ตู้ ตู้ละ 34 ตัว สำหรับปลาเพศผู้จะ

เลี้ยงทดสอบความเค็มที่ 0 , 10, 30 ppt โดยที่จะมีการปรับความเค็มระหว่างวันเพิ่มวันละ 5 ppt คือความเค็มที่ 5,15,20,25 ppt เริ่มจากนำปลาเพศผู้ทั้งหมดจำนวน 102 ตัว มาเลี้ยงไว้ที่ความเค็ม 0 ppt เมื่อได้ระยะเวลา 2 วันจะทำการสุ่มตัวอย่างเก็บไว้ 34 ตัว จำนวนปลาที่เหลือ 68 ตัวจะย้ายไปที่ความเค็ม 10 ppt เมื่อเมื่อได้ระยะเวลา 2 วันจะสุ่มตัวอย่างเก็บไว้ 34 ตัว และจำนวนที่เหลือจะย้ายไปความเค็มถัดไปจนถึงความเค็มที่ 30 ppt (ดังรูปที่ 2)

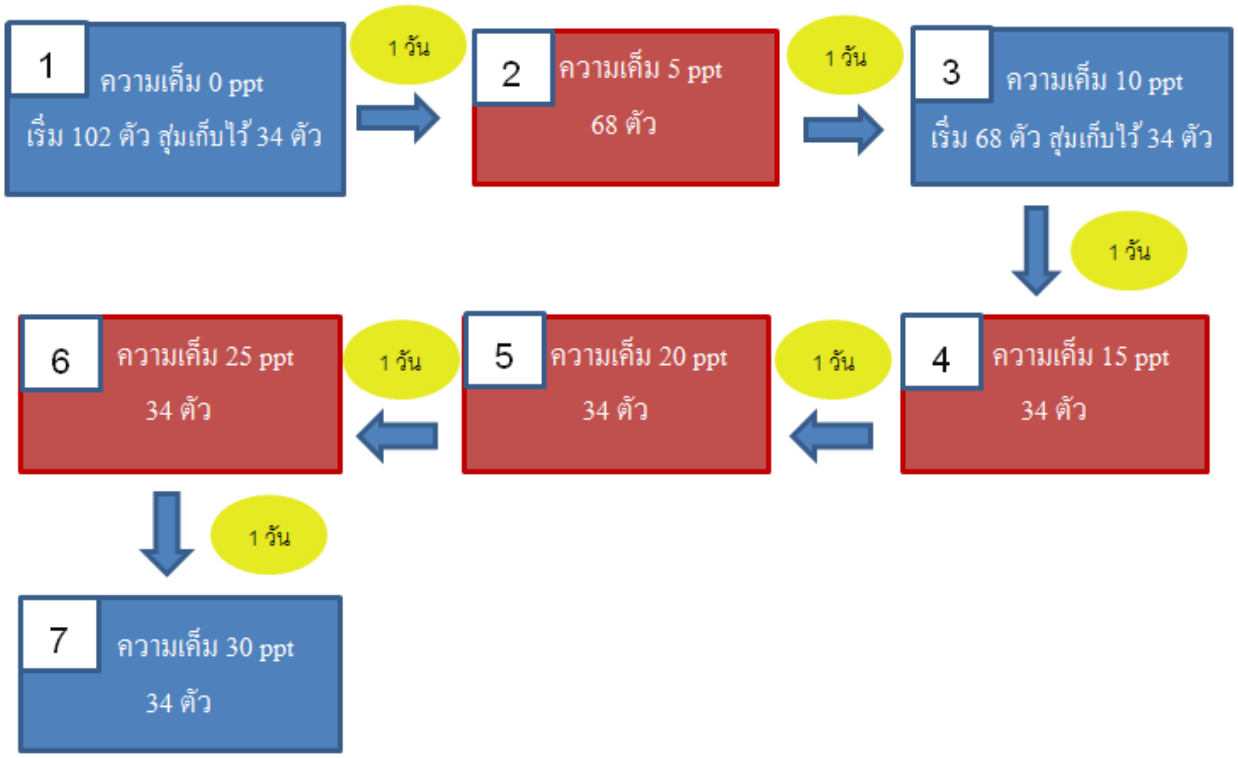
4) เมื่อที่ความเค็ม 0 ppt มีระยะเวลาที่เลี้ยงครบ 14 วัน จะเริ่มทำการการุณยฆาตที่ความเค็ม 0 ppt เป็นอันดับแรก 2 วันถัดไปจะทำการการุณฆาตที่ความเค็ม 10 ppt โดยที่จะทำการการรุณยฆาตทุกๆ 2 วันจนครบ 50 ppt ในเพศเมีย และ 30 ppt ในเพศผู้ (ดังรูปที่ 3,4)

2. ทำการการศึกษา histology ของเหงือกปลา

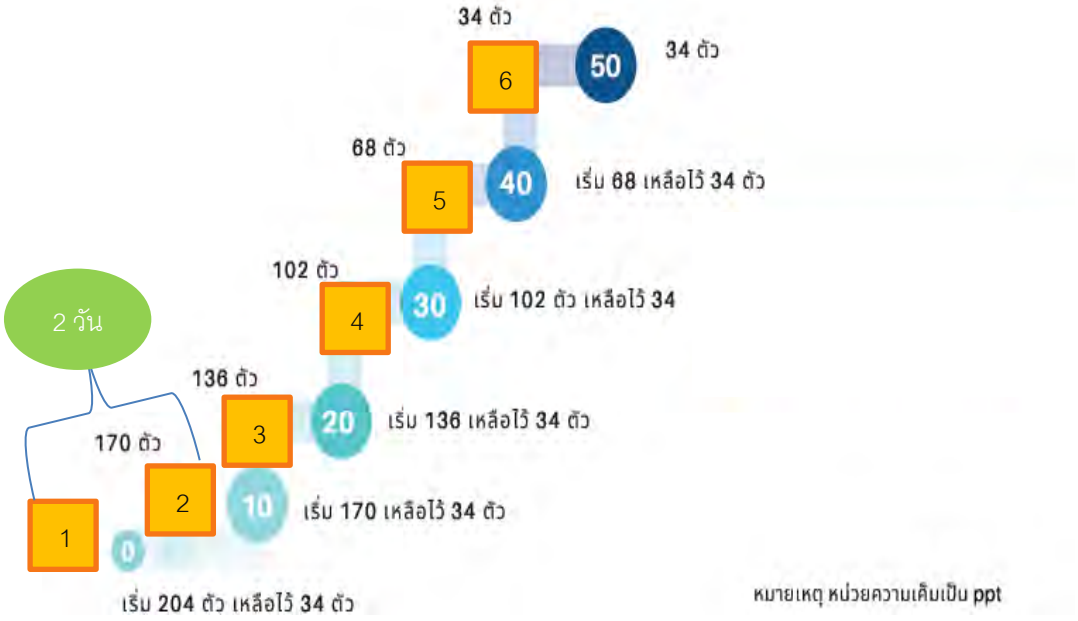
1) หลังจากทดลองเลี้ยงปลาครบกำหนด 2 สัปดาห์ ในระดับความเค็มที่ต่างแล้วมาทำให้สลบด้วยวิธี rapid cooling (Wilson et al.,2009) โดยการแช่ในน้ำเย็นจัด (น้ำผสมน้ำแข็งในอัตราส่วน 1:1) อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส
2) เก็บตัวอย่างปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย ด้วยวิธี Davidson’s fixative 48 ชั่วโมง และเก็บใน70 % Ethanol
3) นำไปศึกษา histologyวิธีมาตรฐาน (Presnell and Schreibman, 1997) นำบล็อกตัวอย่างมาตัดแผ่นบางความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตร และย้อมสีHarris’s haematoxylin and eosin (H&E) แล้วนำสไลด์เนื้อเยื่อมาศึกษาโครงสร้างและพัฒนาของเหงือกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
6) ทำการตัดชิ้นส่วนตัวอย่างละ 2 section แต่ละ section ใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงขนาดกำลังขยายเลนส์ใกล้วัตถุ 40X นับจำนวนเซลล์คลอไรด์ต่อ primary lamella ความยาวเฉลี่ย 0.001 mm.
7) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบทางสถิติ two-way ANOVA



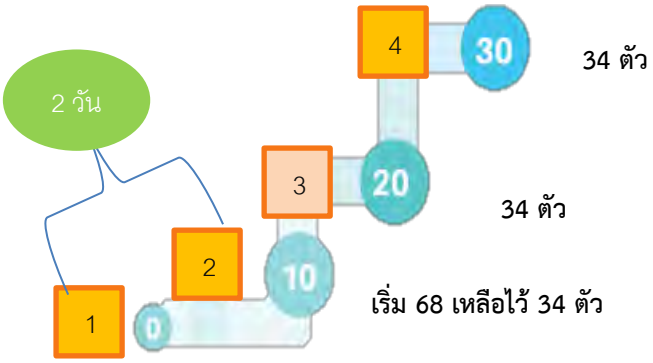

**รูปที่ 1** แผนภาพการแสดงการทดลองในช่วงความเค็มที่ต่างกันของเพศเมีย การปรับระดับความเค็มจะมีการปรับทุกๆ 1 วัน ต่อระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นครั้งละ 5 ppt มีขั้นตอนดังนี้ 1) ที่ความเค็ม 0 ppt มีจำนวนตัวแรกเริ่ม 204 ตัว เมื่อผ่านไป 1 วัน สุ่มเก็บตัวอย่างไว้ 34 ตัว 2) ที่ความเค็ม 5 ppt มี 170 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 3) ที่ความเค็ม 10 ppt มี 170 ตัว สุ่มเก็บไว้ 34 ตัว 4) ที่ความเค็ม 15 ppt มี 136 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 5) ที่ความเค็ม 20 ppt มี 136 ตัว สุ่มเก็บไว้ 34 ตัว 6) ที่ความเค็ม 25 ppt มี 102 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 7) ที่ความเค็ม 30 ppt มี 102 ตัว สุ่มเก็บไว้ 34 ตัว 8) ที่ความเค็ม 35 ppt มี 68 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 9) ที่ความเค็ม 40 ppt มี 68 ตัว สุ่มเก็บไว้ 34 ตัว 10) ที่ความเค็ม 45 ppt มี 34 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 11) ที่ความเค็ม 50 ppt มี 34 ตัว : คือ ความเค็มที่ทำการศึกษา คือ การปรับสภาพความเค็มระหว่างวัน




**รูปที่ 2** แผนภาพการแสดงการทดลองในช่วงความเค็มที่ต่างกันของเพศผู้ การปรับระดับความเค็มจะมีการปรับทุกๆ 1 วันต่อระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นครั้งละ 5 ppt มีขั้นตอนดังนี้ 1) ที่ความเค็ม 0 ppt มีจำนวนตัวแรกเริ่ม 102 ตัว เมื่อผ่านไป 1 วันสุ่มเก็บตัวอย่างไว้ 34 ตัว 2) ที่ความเค็ม 5 ppt มี 68 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 3) ที่ความเค็ม 10 ppt มี 68 ตัว สุ่มเก็บไว้ 34 ตัว 4) ที่ความเค็ม 15 ppt มี 34 ตัว เพื่อปรับสภาพความเค็ม 5) ที่ความเค็ม 20 ppt มี 34 ตัวเป็นการปรับสภาพความเค็ม 6) ที่ความเค็ม 25 ppt มี 34 เพื่อปรับสภาพความเค็ม 7) ที่ความเค็ม 30 ppt มี 34 ตัว : คือ ความเค็มที่ทำการศึกษา คือ การปรับสภาพความเค็มระหว่างวัน




**รูปที่ 3** ตัวอย่างแผนภาพการทำการุณยฆาตในปลาเพศเมีย การทำการุณยฆาตจะทำทุกๆ 2 วัน มีขั้นตอน ดังนี้ 1) ที่ความเค็ม 0 ppt ที่เลี้ยงก่อน 2 วัน เมื่อมีระยะเวลาที่เลี้ยงครบ 14 วัน จะเริ่มทำการการุณยฆาตเป็นอันดับแรก 2) 2 ถัดมา ที่ความเค็ม 10 ppt เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต 3) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 20 ppt เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต 4) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 30 ppt เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต 5) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 40 ppt เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต 6) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 50 ppt เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต

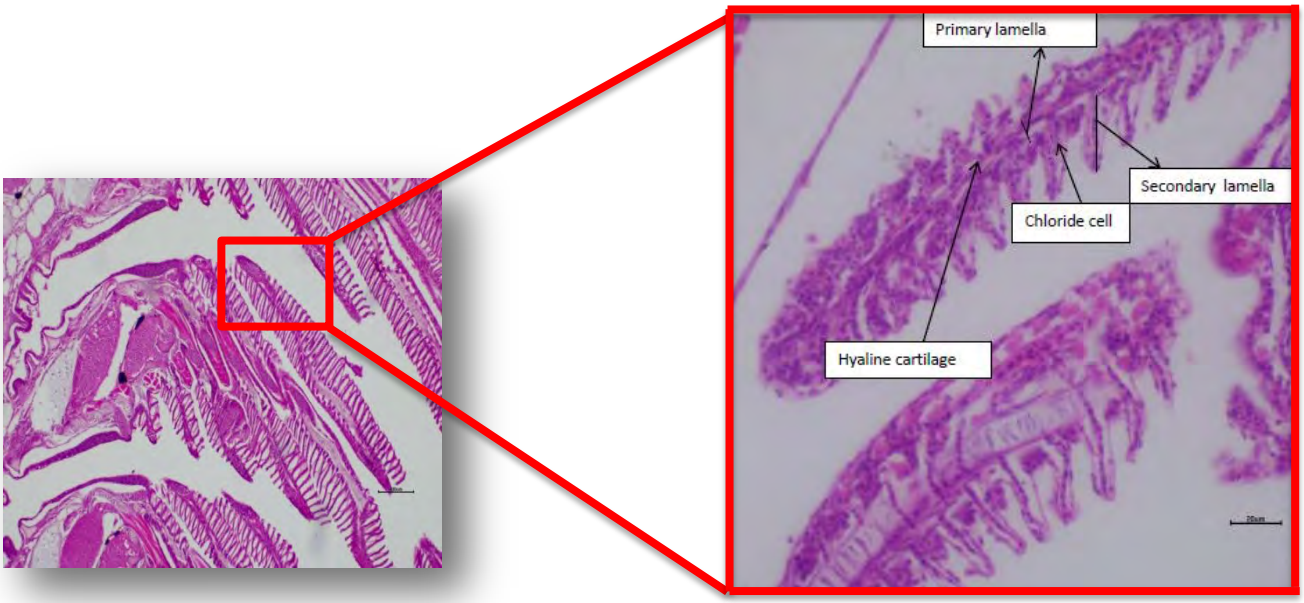



**รูปที่ 4** ตัวอย่างแผนภาพการทำการุณยฆาตในปลาเพศผู้ การทำการุณยฆาตจะทำทุกๆ 2 วัน มีขั้นตอน ดังนี้ 1) ที่ความเค็ม 0 ppt ที่เลี้ยงก่อน 2 วัน เมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงครบ 14 วัน จะเริ่มทำการการุณยฆาตเป็นอันดับแรก 2) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 10 ppt ที่เลี้ยงครบ 14 วันจะถูกการุณฆาต 3) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 20 ppt จะไม่ทำการการุณยฆาตเป็นเพียงการปรับสภาพความเค็ม 4) 2 วันถัดมา ที่ความเค็ม 30 ppt ที่เลี้ยงครบ 14 วัน จะถูกการุณฆาต

# บทที่ 4 ผลการศึกษา และวิจารณ์ผล

## 4.1 โครงสร้างพื้นฐานของเหงือกปลา

ผลการศึกษาองค์ประกอบภายในโครงสร้างเหงือกประกอบไปด้วย Primary lamella คือส่วนที่เป็นแกนกลางหลัก และ Secondary lamella คือส่วน filament ด้านข้าง สำหรับเซลล์คลอไรด์จะพบมากบริเวณ inter-lamellar คือ รอยต่อระหว่าง Primary lamella และ Secondary lamella จะพบว่าย้อมติดสีชมพูมีลักษณะกลม ดังรูปที่ 5




**รูปที่ 5** ภาพแสดงโครงสร้างพื้นฐานของเหงือกปลา *Poecilia mexicanna* ที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 0 ppt : A คือ ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 10x, B คือ ภาพถ่ายที่กำลังขยาย 40x

**4.2 การจำแนกเพศปลา *Poecilia mexicana***

ปลาเพศผู้

มีลักษณะสีสันสวยงามกว่าปลาเพศเมียและมี gonopodium อยู่บริเวณใต้ท้องเป็น modified anal fin ลักษณะเป็นครีบยาว ดังรูปที่ 6

♂

**รูปที่ 6** ลักษณะปลา ***Poecilia mexicana*** เพศผู้

ปลาเพศเมีย

มีลักษณะสีสันน้อยกว่าเพศผู้สีค่อนข้างใสไม่พบและgonopodium อยู่บริเวณใต้ท้อง ดังรูปที่ 7

♀

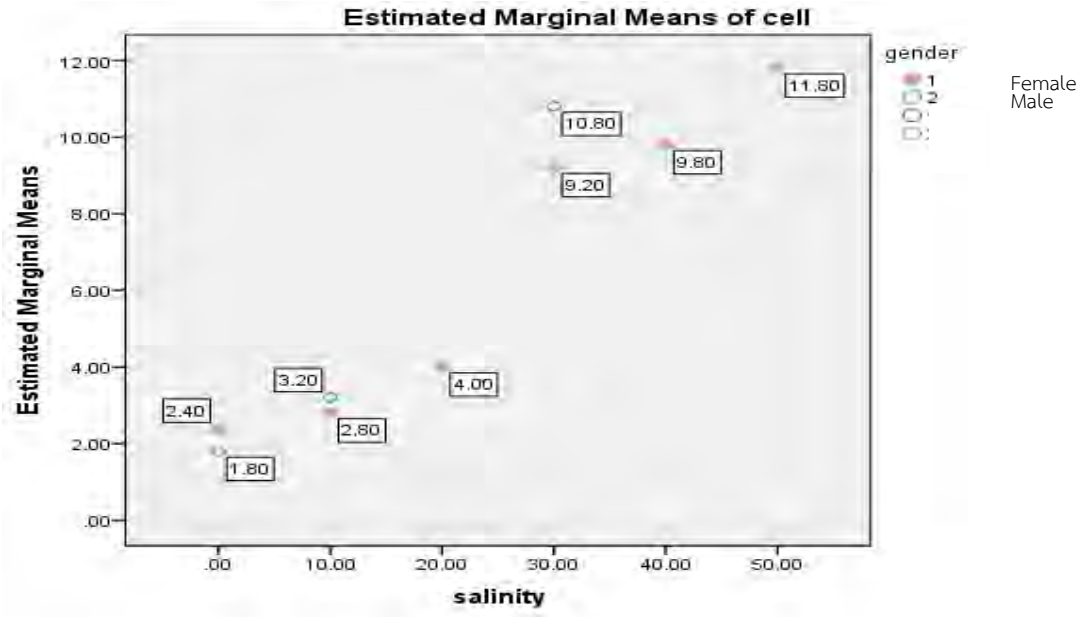
**รูปที่ 7** ลักษณะปลา ***Poecilia mexicana*** เพศเมีย

### 4.3 จำนวนเซลล์คลอไรด์

จากการนับจำนวนเซลล์คลอไรด์ในเพศผู้และเพศเมียของปลา *Poecilia mexicana* ที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 0, 10, 20, 30, 40, 50 ppt พบว่า จำนวนเซลล์คลอไรด์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเค็มสูงขึ้น (ตารางที่ 1)

**ตารางที่ 1** แสดง จำนวนเซลล์คลอไรด์ ต่อ primary lamella (0.001 mm.) ของปลา *Poecilia mexicana* ที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 0, 10, 20, 30, 40, 50 ppt

| ความเค็ม/เพศ | 0 ppt | 10 ppt | 20 ppt | 30 ppt | 40 ppt | 50 ppt |
|---|---|---|---|---|---|---|
| เมีย | 2 | 3 | 4 | 10 | 12 | 13 |
| | 3 | 2 | 3 | 7 | 10 | 12 |
| | 2 | 2 | 5 | 9 | 9 | 12 |
| | 2 | 3 | 6 | 10 | 8 | 11 |
| N = 5 | 3 | 4 | 2 | 10 | 10 | 11 |
| ค่าเฉลี่ย | **2.4** | **2.8** | **4.0** | **9.2** | **9.8** | **11.8** |
| ผู้ | 1 | 2 | | 9 | | |
| | 2 | 4 | | 10 | | |
| | 1 | 5 | | 11 | | |
| | 2 | 2 | | 12 | | |
| N = 5 | 3 | 3 | | 12 | | |
| ค่าเฉลี่ย | **1.8** | **3.2** | | **10.8** | | |




**รูปที่ 8** กราฟแสดง ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์คลอไรด์ระหว่างเพศของปลา *Poecilia mexicana* ปลาเพศเมีย ที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 0, 10, 20, 30, 40, 50 ppt และปลาเพศผู้ ที่เลี้ยงในระดับความเค็ม 0, 10, 30, ppt พบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์คลอไรด์ในแต่ละระดับความเค็มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกันทั้งในปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย

**4.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ Two- way ANOVA**

ปัจจัยของความเค็มที่ระดับต่างๆพบว่าจำนวนเซลล์คลอไรด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.000) ส่วนปัจจัยระหว่างเพศพบว่าที่ความเค็มระดับต่างๆจำนวนเซลล์คลอไรด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P > 0.05) และเมื่อดูปัจจัยทั้ง 2 ที่ส่งผลร่วมกันคือความเค็มและความแตกต่างระหว่างเพศพบว่าในระดับความเค็มต่างๆจำนวนเซลล์คลอไรด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญคือไม่ส่งผลต่อกัน (P > 0.05) (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** แสดงปัจจัยของเพศและความเค็มที่มีอิทธิพลต่อจำนวนเซลล์คลอไรด์จากการวิเคราะห์ Two- way ANOVA ของปลา *Poecilia mexicana* ที่เลี้ยงในความเค็มที่ต่างกัน

**Tests of Between-Subjects Effects**

Dependent Variable: cell

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. | Partial Eta Squared |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 668.400[a] | 8 | 83.550 | 61.635 | .000 | .932 |
| Intercept | 1646.028 | 1 | 1646.028 | 1214.283 | .000 | .971 |
| salinity | 642.733 | 5 | 128.547 | 94.830 | .000 | .929 |
| gender | 1.633 | 1 | 1.633 | 1.205 | .280 | .032 |
| salinity * gender | 6.067 | 2 | 3.033 | 2.238 | .121 | .111 |
| Error | 48.800 | 36 | 1.356 | | | |
| Total | 2447.000 | 45 | | | | |
| Corrected Total | 717.200 | 44 | | | | |

a. R Squared = .932 (Adjusted R Squared = .917)

การเปรียบเทียบความแตกต่างของปลา *Poecilia mexicana* ในแต่ละระดับความเค็ม จากการวิเคราะห์ Two-way ANOVAพบว่าระหว่างความเค็ม 0 ppt และ 10 ppt จำนวนเซลล์คลอไรด์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P > 0.05) ส่วนความเค็มที่เหลือนั้นจำนวนเซลล์คลอไรด์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.005, 0.000) (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของปลา *Poecilia mexicana* ในแต่ละระดับความเค็มจากการวิเคราะห์ Two- way ANOVA

**Pairwise Comparisons**

Dependent Variable: cell

| (I) salinity | (J) salinity | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.[d] | 95% Confidence Interval for Difference[d] | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| .00 | 10.00 | -.900 | .521 | .092 | -1.956 | .156 |
| | 20.00 | -1.900*,[b] | .638 | .005 | -3.193 | -.607 |
| | 30.00 | -7.900* | .521 | .000 | -8.956 | -6.844 |
| | 40.00 | -7.700*,[b] | .638 | .000 | -8.993 | -6.407 |
| | 50.00 | -9.700*,[b] | .638 | .000 | -10.993 | -8.407 |

**อภิปรายผลการศึกษา**

จำนวนเซลล์คลอไรด์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระดับความเค็มที่เพิ่มขึ้นเพื่อปรับสมดุลในกระบวนการ osmoregulation ในสภาพแวดล้อมที่เป็น hypertonic เพื่อเพิ่มเซลล์ที่สามารถขับไอออนส่วนเกินออกจากร่างกายได้ (McCormick, 1995) โดยที่เซลล์คลอไรด์มีบทบาทสำหรับขับโซเดียมและคลอไรด์ไอออนช่วยปรับสมดุลไอออนให้เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม (Hao, 2004) กลไลการควบคุมคลอไรด์ไอออนและโซเดียมไอออนเกิดขึ้นภายในเซลล์คลอไรด์ ดังนั้นเมื่อความเค็มเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์คลอไรด์ในเหงือกปลา (Zadunaisky, 1996)

ในสิ่งมีชีวิตต้องอาศัยพลังงานเพื่อการดำรงชีวิต (energy allocation) ที่จะถูกใช้ไปเพื่อการเติบโตและการปรับสมดุลร่างกาย รวมทั้งเพื่อพัฒนาระบบสืบพันธุ์ โดยที่ความแต่งต่างระหว่างเพศนั้น ปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย จะมีการใช้พลังงานเพื่อการเติบโตและการปรับสมดุลร่างกายเท่ากันเมื่อยังไม่โตเต็มวัย แต่จะเริ่มแตกต่างกันเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์แล้ว โดยเพศเมียจะมีการใช้พลังงานในการสร้างระบบสืบพันธุ์มากกว่าเพศผู้ (Jonsson, 2003) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างเพศที่ส่งผลต่อจำนวนเซลล์คลอไรด์อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า ปลา *Poecilia mexicana* เป็น alien species ที่ประสบความสำเร็จในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดีคือมีการใช้พลังงานในการปรับสมดุลร่างกายและมีความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูงมากได้เป็นอย่างดีในระดับเซลล์ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ปรับตัวได้มากกว่าปลาน้ำจืดชนิดอื่นที่อาศัยอยู่ในแหล่งธรรมชาติ เพราะในปลาน้ำจืดไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์คลอไรด์ได้เมื่ออยู่ในแหล่งอาศัยที่มีความแค็มเพิ่มขึ้น (Susumu, 1977) โดยจะสังเกตได้จากผลการศึกษาทั้งในปลาเพศผู้และปลาเพศเมียพบการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์คลอไรด์เมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในลักษณะเดียวกัน

ในอีกแง่มุมของเซลล์ที่ใช้ในการ osmoregulation ion exchange เป็นเซลล์พื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่พบได้ในทุกเพศ โดยที่การศึกษาในระดับฮอร์โมนพบว่า cortisol เป็นฮอร์โมนสำคัญที่ส่งผลให้เซลล์คลอไรด์เพิ่มจำนวนขึ้น ซึ่งยังไม่มีรายงานว่าฮอร์โมนเพศสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์คลอไรด์ได้ (McCormick, 1995) แต่สำหรับฮอร์โมน cortisol นั้นจะหลั่งออกมาในขณะที่สิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะเครียด สำหรับในปลาชนิดนี้นั้นคือสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง โดยที่เมื่ออยู่ในสภาวะเครียดมากจะทำให้ฮอร์โมน cortisol หลั่งมากยิ่งขึ้นจำนวนเซลล์คลอไรด์จึงเพิ่มขึ้น (Gamperl, 1994)

ปลา *Poecilia mexicana* เป็น alien species ที่มีปัจจัยส่งผลต่อการประสบความสำเร็จในการดำรงชีวิตในแหล่งอาศัยใหม่ได้คือ มีความสามารถในการปรับตัวต่อการทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง คือ 0-50 ppt และในแหล่งที่ความเค็มสูงมาก เช่น ในนาเกลือ ในขณะที่ปลาพื้นถิ่นทั่วไปที่อาศัยในน้ำจืดและน้ำกร่อยไม่สามารถปรับตัวอาศัยอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมเช่นนี้ ยกตัวอย่างเช่น ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่สามารถทนอาศัยอยู่ในความเค็มได้ในช่วง 10-25 ppt (Shazili, 1995) และเมื่อเทียบกับปลาทะเลพื้นถิ่นที่ทนความเค็มได้สูงมาก คือ ปลากะรังเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*) ที่สามารถทนความเค็มได้สูงถึง 54.2-64.8 ppt (Cheng, 2013) ปลา *Poecilia mexicana* นั้นมีความสามารถในการปรับตัวต่อความเค็มได้ใกล้เคียงกับปลาทะเลที่ทนความเค็มได้สูง อีกทั้งปลา *Poecilia mexicana* สามารถอาศัยอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำเน่าเสียได้ จากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น ปลา *Poecilia mexicana* สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ จึงทำให้มีผู้ล่าและผู้แข่งขันตามธรรมชาติน้อยมาก รวมทั้งเป็นปลาที่ไม่เลือกกินอาหารสามารถกินซากพืชซากสัตว์ได้ และยังมีการสืบพันธุ์ที่มีลักษณะเฉพาะที่เรียกว่า Superfetation คือมีไข่ขนาดเล็กและมีปริมาณมากในรังไข่ โดยจะมีการเก็บสะสมไข่ที่ได้รับการผสมสเปิร์มไว้แล้วยังสามารถผสมต่อไปได้อีก ในรังไข่นั้นจะพบว่ามีหลายระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในเวลาเดียวกัน ( Bárcenas et al., 2019) ทำให้ปลา Poecilia mexicana สามารถแพร่กระจายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ปัจจัยที่ส่งผลต่อการประสบความสำเร็จของ alien species ที่ควรศึกษาต่อไป ได้แก่ ความแข็งแรงของตัวอ่อน, aerobic metabolism, gill permeability, blood plasma osmolality (Piola, 2008) จากความสามารถในการปรับตัวที่หลากหลายนี้อาจส่งผลกระทบต่อในระบบนิเวศธรรมชาติได้หากปลา *Poecilia mexicana* ย้ายถิ่นฐานเข้ามาอยู่ในแหล่งน้ำที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงอาจจะแย่งชิงทรัพยากรในธรรมชาติได้ ยกตัวอย่างเช่น ปลาพื้นถิ่นที่กินซากพืชซากสัตว์เช่นเดียวกับปลา *Poecilia mexicana* คือ ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*), ปลาตะเพียนหางแดง (*Barbodes schwanenfeldi*), ปลาแก้มช้ำ (*Puntius orphoides*) (กรมประมง, 2006) ซึ่งอาจทำให้ส่งผลต่อห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศธรรมชาติ

# บทที่ 5 สรุปผลศึกษาและข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการศึกษา

เซลล์คลอไรด์มีหน้าที่สำคัญสำหรับการปรับและขับไอออน เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในความเค็มสูงจากการศึกษาครั้งนี้ชี้และยืนยันให้เห็นว่าปลาชนิดนี้สามารถปรับตัวต่อความเค็มในช่วงกว้างหรือ euryhaline มีเซลล์คลอไรด์เป็นหลักในการควบคุม จึงยืนยันได้ว่าปลา *Poecilia mexicana* จัดเป็น euryhaline fish ด้วยเหตุนี้จึงสามารถพบปลา *Poecilia mexicana* ในที่หลากหลายแหล่งอาศัย เนื่องจากสามารถปรับตัวและอยู่รอดได้ดีแต่จะเป็นการสะท้อนได้ว่าปลาชนิดนี้มีความสามารถที่จะแย่งชิงแหล่งอาหารและทรัพยากรทางธรรมชาติจากสัตว์พื้นถิ่นได้และอาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศในบริเวณนั้นได้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาในขั้นต่อไปอาจจะศึกษาลงลึงไปได้มากกว่านี้ ยกตัวอย่างหัวข้อเช่น The mechanism of sodium and chloride uptake ในเหงือกปลาเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ละเอียดและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

**ภาษาไทย**

กรมประมง. 2006. ปลาน้ำจืด. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: https://www.fisheries.go.th/sfratburi/Fish.htm [15 พฤษภาคม 2563]

วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2545. ปลาสวยงาม. ปลาออกลูกเป็นตัว.กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและสถานแสดงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง.

**ภาษาอังกฤษ**

Bárcenas,G., Guadalupe,M. and Uribe,M.C. 2019. Superfetation in the viviparous fish *Heterandria formosa* (Poeciliidae). Journal of Morphology 280(5): 756-770.

Cheng, S.Y., Chih,S.C. and Jiann,C.C. 2013. Salinity and temperature tolerance of brown-marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus*. Fish physiology and biochemistry 39(2): 277-286.

Foskett,J.K. and Guylaine,M.H. 1981. Hormonal control of chloride secretion by teleost opercular membrane. Annals of the New York Academy of Sciences 372(1): 643-643.

Gamperl,A.K., Vijayan,M.M., and Boutilier, R.G.1994. Experimental control of stress hormone levels in fishes: techniques and applications. Reviews in Fish Biology and Fisheries 4(2): 215-255.

Hao,L.C., Huang,C.L., Yang,C.H., Lee,T.H. and Hwang,P.P. 2004. Time-course changes in the expression of Na, K-ATPase and the morphometry of mitochondrion-rich cells in gills of euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during freshwater acclimation. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology 301(1): 85-96.

Henrikson,R.C. and Gedeon,M. 1967. The fine structure of teleost epidermis: Introduction and filament-containing cells. Journal of ultrastructure research 21(3-4): 194-212.

Jonsson,N. and Jonsson,B.1997. Energy allocation in polymorphic brown trout. Functional Ecology 11(3): 310-317.

Jonsson,N. and Jonsson,B.2003. Energy density and content of Atlantic salmon: variation among developmental stages and types of spawners. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 60 : 506-516.

McCormick, S.D. 1995. 11 hormonal control of gill Na+, K+-ATPase and chloride cell function. Fish physiology (14): 285-315.

Munshi and Datta,J.S. 1964. Chloride Cells' in the Gills of Fresh-Water Teleosts. Journal of Cell Science 3(69): 79-89.

Piola,R.F. and Johnston,E.L. 2008. Pollution reduces native diversity and increases invader dominance in marine hard-substrate communities.Diversity and Distributions 14(2): 329-342.

Presnell,J.K., Schreibman,M.P. and Humason,G.L. 1997. Humason's animal tissue techniques. Baltimore: Johns Hopkins University Press

Shazili,N.A.M. 1995. Effects of salinity and pre-exposure on acute cadmium toxicity to seabass, *Lates calcarifer*. Bulletin of environmental contamination and toxicology 54(1): 22-28.

Susumu,K. 1997. Mitochondria-rich (chloride) cells in the gill epithelia from four species of stenohaline fresh water teleosts. Cell and tissue research 180(1): 87-98.

Wilson, Jolaine M., Bunte R. M. and Carty A. J. 2009. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science 48(6): 785-789.

Zadunaisky, José,A. 1996. Chloride cells and osmoregulation. Kidney international 49(6): 1563-1567.

# ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก พื้นที่ออกภาคสนาม**

ก รูปแผนที่ ตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ

https://www.google.com/maps/search/%E0%B8%9A%E0%B8%B2%E0%B8%87%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%81%E0%B8%94/@13.6019701,100.5447739,14z

ข ภาพสถานที่จริงของลำคลองสุขสวัสดิ์ 84 ตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ จังหวัดสมุทรปราการ วันที่ 28 ตุลาคม 2562

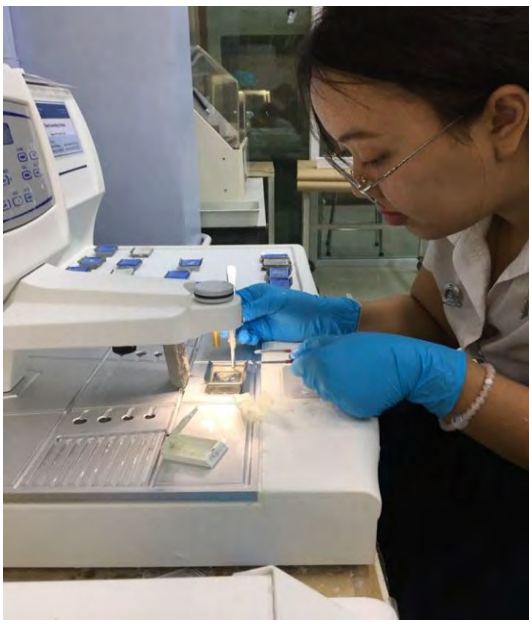
**ภาคผนวก ข รูปวิธีการศึกษา Histology**

1) นำปลาจากตู้ที่เพาะเลี้ยงมาการุณยฆาตด้วยน้ำแข็ง

2) ตัดชิ้นส่วนเหงือกออกมา

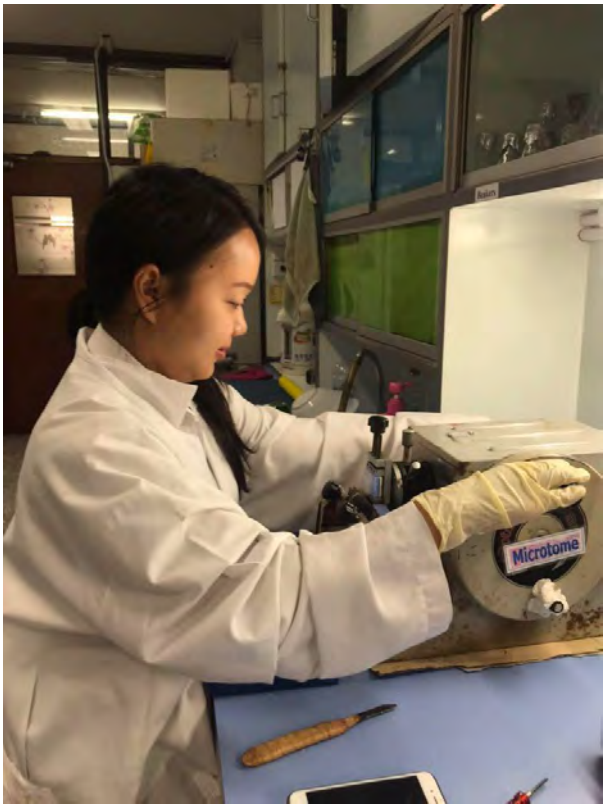
3) นำชิ้นช่วนเหงือกมาแยกใส่ตะกร้า

4) นำตัวอย่างมาแช่แอลกอฮอล์



4) นำตัวอย่างมาฝังใน Wax

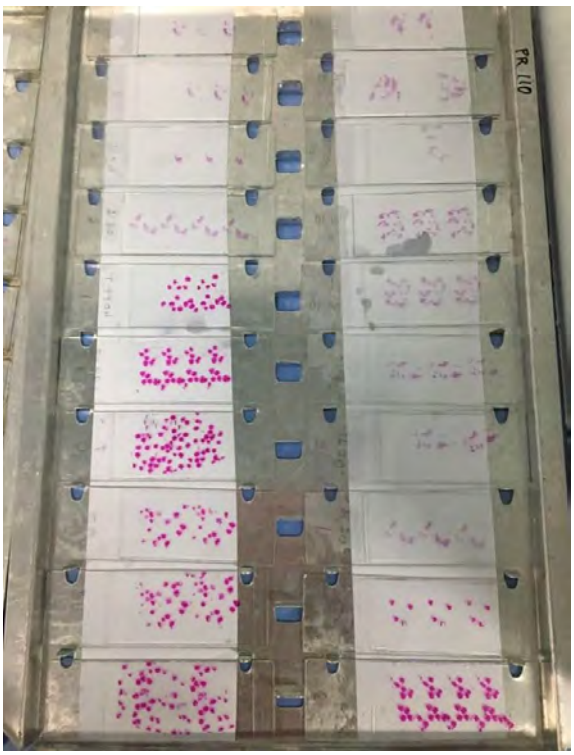
5) ตัวอย่างบล็อก




6) นำชิ้นมาตัดให้บางขนาด 4 ไมครอน
ด้วยเครื่องตัด Microtome

7) ตัวอย่างหลังการตัดแล้วนำไปวางบนแผ่นสไลด์

8) นำตัวอย่างมาย้อมสีด้วย Harris's haematoxylin and eosin (H&E) และปิดกระจกสไลด์



9) ตัวอย่างสไลด์หลังย้อมสี