

ผลของน้ำมันกานพลูต่อคุณภาพน้ำและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ
ความเครียดในปลากัดไทย (*Betta splendens*) ระหว่างการขนส่งระยะสั้น

Effects of Clove Oil on Water Quality and Stress-Related Gene Expression in
Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*) during Short-Term Transportation

ชนกนันทน์ สินธุพรหม,¹ รวีวรรณ พลอยพันธ์,² วิราวรรณ นุชนารณ³ และสาทิต ฉัตรชัยพันธ์^{1*}

Chanoknan Sintuprom,¹ Raveewan Ploypan,² Wirawan Nuchchanart³ and Satid Chatchaiphon^{1*}

Received 26 May 2024, Revised 29 July 2024, Accepted 1 August 2024

ABSTRACT

Transport procedures have emerged as potential stress-inducing factors. The use of clove oil is a common practice in aquaculture to mitigate stress, but it may also induce negative side effects. Particularly in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). In this study, we investigated the effects of different concentrations of clove oil on water quality and stress-related gene expression, including *HSP70*, *HSP90*, *GR*, *MR*, and *HIF-1 α* . Siamese fighting fish (body weight 1.91 ± 0.42 g; $n = 30$) from a local farm in Nakhon Pathom province were subjected to simulated transport in 80 mL of water for 24 hours, with the addition of 0, 5, and 10 mg/L of clove oil. Samples were also collected before transportation. The results demonstrated that the dissolved oxygen in the control group had the most significant decrease ($p < 0.05$), along with the expression level of *MR* ($p < 0.05$). Conversely, the addition of 5 and 10 mg/L of clove oil decreased oxygen demand and resulted in a significant decrease in pH levels and alkalinity compared to the control group ($p < 0.05$). Moreover, 5 mg/L of clove oil significantly increased the expression levels of *GR* and *HIF-1 α* ($p < 0.05$). Additionally, 10 mg/L of clove oil significantly elevated the expression levels of stress-related genes, including *HSP70*, *GR*, *MR*, and *HIF-1 α* ($p < 0.05$). This indicates that transportation can have a negative impact on water quality. Furthermore, the addition of 5 and 10 mg/L of clove oil induces stress in Siamese fighting fish and is inappropriate for short-term transport. Future studies should concentrate on the smaller concentration of clove oil between 0-5 mg/L.

Keywords: *Betta splendens*, Transportation, Clove oil, Gene expression

^{1*} ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

² ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน

จ.นครปฐม 73140

Department of Pathology, Faculty of Veterinary Science, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng saen Sub-District, Kamphaeng saen District, Nakhon Pathom 73140, Thailand.

³ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ต.กำแพงแสน อ.กำแพงแสน

จ.นครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng saen Sub-District, Kamphaeng saen District Nakhon Pathom 73140, Thailand.

* Corresponding author: Tel. 08-1933-2292, E-mail address: satid.ch@ku.th

บทคัดย่อ

การขนส่งสัตว์น้ำเป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดในปลา และการใช้น้ำมันกานพลูถือเป็นแนวทางปฏิบัติทั่วไปในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อบรรเทาความเครียด แต่ขณะเดียวกันก็อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำได้ โดยเฉพาะในกรณีของปลากัดไทย (*Betta splendens*) การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินผลของน้ำมันกานพลูต่อคุณภาพน้ำและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ได้แก่ *HSP70*, *HSP90*, *GR*, *MR* และ *HIF-1 α* โดยใช้ตัวอย่างปลากัดไทยขนาดโตเต็มวัย จากฟาร์มในจังหวัดนครปฐม (น้ำหนักเฉลี่ย 1.91 ± 0.42 กรัม, $n = 30$) บรรจุในถุงพลาสติกที่มีน้ำ 80 มล. เติมน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10 มก./ล. นำไปจำลองการขนส่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พร้อมตรวจวัดตัวอย่างก่อนการขนส่งร่วมด้วย ผลการศึกษาพบว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำกว่ากลุ่มก่อนการขนส่งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *MR* ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในทางกลับกันการเติมน้ำมันกานพลูที่ 5 และ 10 มก./ล. ส่งผลให้อัตราการใช้ออกซิเจนของปลาลดลง เช่นเดียวกับค่า pH และความเป็นด่าง ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) นอกจากนี้การเติมน้ำมันกานพลูที่ 5 มก./ล. มีผลกระทบทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน *GR* และ *HIF-1 α* อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 10 มก./ล. มีผลกระทบให้เกิดการแสดงออกของยีน *HSP70*, *GR*, *MR* และ *HIF-1 α* เพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จึงบ่งชี้ได้ว่าการขนส่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำ โดยความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 5 และ 10 มก./ล. ส่งผลให้ปลากัดไทยมีความเครียดสูงขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ระหว่างการขนส่งระยะสั้น และแนวทางการศึกษาในอนาคตควรมุ่งเน้นไปยังระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูในปริมาณน้อยระหว่างช่วง 0-5 มก./ล. ต่อไป

คำสำคัญ: ปลากัดไทย การขนส่ง น้ำมันกานพลู การแสดงออกของยีน

คำนำ

ปลากัดไทย *Betta splendens* Regan, 1910 ได้ถูกรับรองจากสถานิติบัญญัติแห่งชาติให้เป็นสัตว์น้ำประจำชาติไทยในปี พ.ศ. 2563 ซึ่งเป็นสัตว์น้ำสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยที่ได้รับความนิยมเลี้ยงทั้งจากในประเทศ และต่างประเทศ ทั้งนี้มีการส่งออกปลากัดไปกว่า 95 ประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา ฝรั่งเศส สิงคโปร์ จีน อิหร่าน เป็นต้น โดยปริมาณส่งออกปี 2556–2560 เฉลี่ยปริมาณ 20.85 ล้านตัว/ปี มูลค่าไม่ต่ำกว่า 115.45 ล้านบาท/ปี โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี มีผู้เลี้ยงรายย่อยมากกว่า 100,000 ราย (ด้านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ, 2562; สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) และ เนื่องจากปลากัดมีพฤติกรรมก้าวร้าว และจะต่อสู้กัน ในกรณีขนส่งเพื่อการจำหน่าย จึงมีความจำเป็นต้องขนส่งแบบแยกเดี่ยวในถุงพลาสติกขนาดเล็ก ที่เติมน้ำเพียงเล็กน้อย ปริมาตรน้ำประมาณ 60 มล. สำหรับปลากัดครึ่งสั้น และ 120–150 มล. สำหรับปลากัดครึ่งยาว

(Cole *et al.*, 1999) โดยมีอัตราส่วนของน้ำต่ออากาศเท่ากับ 1 ต่อ 3 หรือ 3 ต่อ 5 (Monvises *et al.*, 2009) ซึ่งรูปแบบการขนส่งดังกล่าวถือเป็นวิธีการเฉพาะในปลากัด ทั้งนี้งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งปลากัดมีอยู่อย่างจำกัด จากการตรวจสอบเอกสารพบเพียงงานวิจัยของ Thongprajukaew *et al.* (2023) ที่รายงานเกี่ยวกับปริมาณน้ำที่เหมาะสมเพื่อการขนส่งปลากัดไทยเท่านั้น ทั้งนี้ผลกระทบจากการขนส่งอาจจะส่งผลให้ปลาเกิดความเครียดฉับพลันหรือเรื้อรังเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหรือเสียชีวิตได้ (Portz *et al.*, 2006) ซึ่งกระบวนการการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่าเคมีของเลือด และการแสดงออกของยีนภายในเซลล์ (Aluru & Vijayan, 2009; Barton, 2002; Pankhurst, 2011; Pottinger, 2008; Tacchi *et al.*, 2015) งานวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบจากความเครียดจากการขนส่งมีรายงานในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาดุกอเมริกัน (Channel catfish), *Ictalurus punctatus* (Refaey & Li, 2018), ปลาหมอสี (Meagre), *Argyrosomus regius*

(Bortoletti *et al.*, 2021), ปลานิล (*Nile tilapia*), *Oreochromis niloticus* (Yousefi *et al.*, 2022) เป็นต้น ทั้งนี้การเติมน้ำมันกานพลูในน้ำระหว่างการขนส่งมีรายงานในปลาหลายชนิด เช่น ปลาไน (*Common carp*), *Cyprinus carpio* (Sharma & Husen, 2015), ปลาการ์ตูน (*Clown fish*), *Amphiprion ocellaris*, (Hekimoglu *et al.*, 2017), ปลาดุกเวลส์ (*European catfish*), *Silurus glanis*, (Gökçek *et al.*, 2017), ปลา มีเกอร์ (*Meagre*), *Argyrosomus regius* (Cárdenas *et al.*, 2016) เนื่องจากน้ำมันกานพลูมีราคาถูก หาได้ง่าย มีความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ มนุษย์ และสิ่งแวดล้อม (วัชรียา, 2556) มีผลช่วยลดความเครียด (Akar, 2011; Jerez-Cepa *et al.*, 2019) อัตราการตายของปลาตัว และมียอัตราการฟื้นตัวเร็ว (Javahery *et al.*, 2012) น้ำมันกานพลูและอนุพันธ์จึงได้กลายเป็นยาสำหรับใช้ในปลาที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (Aydin & Barbas, 2020) โดยน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. สามารถทำให้ปลากัดสลบ และฟื้นตัวกลับมาได้ภายใน 3-5 นาที (Pattanasiri *et al.*, 2017) งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมายทดสอบผลของน้ำมันกานพลูต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดในปลากัดไทยระหว่างการขนส่งระยะสั้น เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาวิธีการขนส่งปลากัดไทยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ปลากัดไทย (*B. splendens*) จำนวน 60 ตัว จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดนครปฐม ขนาดโตเต็มวัย คละเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 1.91 ± 0.42 กรัม และความยาวมาตรฐานเฉลี่ย 4.08 ± 0.39 ซม. ($n = 30$) ที่งดให้อาหาร 24 ชั่วโมง ซึ่งการวิจัยนี้ได้ดำเนินการตามข้อกำหนดการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ใบอนุญาตเลขที่ ACKU63-FIS-008 ภายใต้ความควบคุมของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การจำลองสภาวะการขนส่ง

นำตัวอย่างปลากัดบรรจุในถุงพลาสติกที่เติมน้ำปริมาตร 80 มล. (Thongprajukaew *et al.*, 2023) อัตราส่วนของน้ำต่ออากาศ เท่ากับ 1 ต่อ (Monvises *et al.*, 2009) และใช้ความร้อนปิดผนึก โดยบรรจุ

ปลากัด 1 ตัว/ถุง จากนั้นใส่ลงในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็วรอบ 50 รอบ/นาที และอุณหภูมิ $24-26^{\circ}\text{C}$ (Wu *et al.*, 2021) โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาออกเป็น 4 กลุ่ม ดังต่อไปนี้ กลุ่มที่ 1 คือ ปลาก่อนการขนส่ง (negative control group) กลุ่มที่ 2 คือ ปลาที่ผ่านการขนส่งโดยไม่เติมน้ำมันกานพลู (control group) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 3 และ 4 คือปลาที่ผ่านการขนส่งโดยเติมน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มก./ล. (Pattanasiri *et al.*, 2017) ที่ผ่านการขนส่งโดยเติมน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยแต่ละกลุ่มตัวอย่างใช้ปลากัดทดลอง จำนวน 15 ตัว

การตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการ

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำบางประการของทุกกลุ่ม โดยกระทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ดังต่อไปนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่อง Ecoscan pH5/6 (Eutech, USA), อุณหภูมิและออกซิเจนละลายในน้ำ (dissolved Oxygen; DO) ด้วยเครื่อง EcoSense DO 200-4M (YSI, Germany), ความเป็นด่าง (alkalinity) ในรูป CaCO_3 ด้วยวิธี Titration method (APHA *et al.*, 1995), แอมโมเนียรวม (total ammonia nitrogen; TAN) ด้วยวิธี Koroleff's Indophenol blue method (APHA *et al.*, 1995) และไนไตรท์ (NO_2) ด้วยวิธี Colorimetric method (APHA *et al.*, 1995)

การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ด้วยเทคนิค Quantitative Real-Time PCR

เก็บตัวอย่างตับปลากัดไทยจากชุดการทดลอง (pooled samples) จำนวนกลุ่มละ 5 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ ทำการสกัด Total RNA โดยใช้รีเอเจนต์ TRIzol reagent (Thermo Scientific, USA) และสกัดตามคู่มือของบริษัท Thermo Scientific, USA จากนั้นทำความสะอาด Total RNA โดยใช้ชุด GeneJET RNA Cleanup and Concentration Micro Kit (Thermo Scientific, USA) นำมาตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง NanoDrop Eight Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) และ

คำนวณตามวิธีของ Sambrook *et al.* (1998) เมื่อได้ RNA ที่บริสุทธิ์ (A260: A280 = 1.85-2) จึงนำมาสังเคราะห์ First strand cDNA ของ mRNA ตามคู่มือ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) และนำไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย Mastercycler[®] ep realplex real-time PCR System (Eppendorf, Germany) โดยกำหนดสภาวะดังนี้ Pre-Denature 94 °C ; 2 นาที, Denature 98 °C; 10 วินาที, Annealing 55 °C; 30 วินาที, Extension 68 °C; 10 วินาที, Final

Extension 68 °C; 10 วินาที ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด 5 ยีน ได้แก่ heat shock proteins 70 (*HSP70*), heat shock proteins (*HSP90*), glucocorticoid receptors (*GR*), mineralocorticoid receptor (*MR*), hypoxia inducible factor-1 α (*HIF-1\alpha*) และใช้ยีน β -actin เป็นค่าอ้างอิง ข้อมูลไพรเมอร์ดังแสดงใน Table 1 จากนั้นทำการคำนวณเพื่อหาค่า Relative expression ratio ตามวิธีการของ Livak *et al.* (2001)

Table 1 The primer sequences for stress-related genes in Siamese fighting fish (*B. splendens*) used in quantitative real-time PCR

Target Genes		Sequence (5'-3')	Length (bp)	References / Accession no.
<i>β-actin</i>	F	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT	200	Amparyup <i>et al.</i> (2020)
	R	GAAGGAGTAGCCACGCTCTG		
<i>HSP70</i>	F	GGGAGCTGAACAAGAGCATC	190	XM_029157549.2
	R	ATGGTGGTGTTCGGTTTGAT		
<i>HSP90</i>	F	CAAGAACGACAAGGCTGTGA	193	XM_029141667.2
	R	AATTTTCGTCGGGAACAGATG		
<i>GR</i>	F	GAAGTGGCAGCGCTTTTATC	197	XM_029164787.2
	R	GGTGGAACAGGAGAGCTTTG		
<i>MR</i>	F	AGCGCAAGGAACAATGTCTT	191	XM_029149835.2
	R	AGCTGGACATGCTGTCTGTG		
<i>HIF-1α</i>	F	TGGGCTATGATCCAGAGGAC	200	XM_029138456.1
	R	AGTTTCCACCCACACAAAGC		

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าที่ตรวจวัดได้ในแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตต่าง ๆ โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ด้วยโปรแกรม IBM SPSS Statistics version 26

ผลและวิจารณ์

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำบางประการ (Table 2) พบว่าอุณหภูมิของน้ำในกลุ่มก่อนการขนส่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยทุกกลุ่มหลังการขนส่งมีอุณหภูมิของน้ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้อุณหภูมิจะส่งผลต่อระบบเมตาบอลิซึมในปลา ความเครียด และอัตราการรอด

(Barton, 2002) การขนส่งในสัตว์จึงมักจะขนส่งด้วย อุณหภูมิ ต่ำ (Harmon, 2009; Omeji *et al.*, 2017) ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญ กล่าวคือ ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการเผาผลาญเพื่อให้ได้พลังงาน เป็นซับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์หลายชนิด จึงมีความสำคัญต่อกระบวนการหายใจและการดำรงอยู่ของเซลล์ โดยออกซิเจนที่ละลายในน้ำจะแพร่เข้าทางเส้นเลือดฝอยบริเวณเหงือกของปลา ซึ่งพบว่าการขนส่งปริมาณออกซิเจนละลายน้ำมีค่าสูงที่สุดรองลงมาคือกลุ่มที่เติมน้ำมันกานพลู 5 และ 10 มก./ล. ทั้งนี้ไม่เติมน้ำมันกานพลูมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำที่สุดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งเห็นได้ชัดว่าการเติมน้ำมันกานพลูมีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของปลา เนื่องจากน้ำมันมีผลลดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้เกิดความสงบ ลดการทำงานของระบบเผาผลาญ ส่งผลให้อัตราการหายใจรวมถึงอัตราการแลกเปลี่ยนออกซิเจนลดลง (Javahery *et al.*, 2012)

ค่า pH พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มก่อนการขนส่งมีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ผ่านการขนส่งโดยไม่เติมน้ำมันกานพลู และต่ำที่สุดในกลุ่มที่เติมน้ำมันกานพลู 5 และ 10 มก./ล. ทั้งนี้ pH มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ หากค่า pH ต่ำหรือสูงเกินไปจะมีผลต่อกลไกในร่างกาย ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ ความต้านทานโรค อีกทั้ง

ยังมีผลต่อรูปของความเป็นต่างและการเกิดปฏิกิริยาเคมีในน้ำอีกด้วย (Boyd, 2019) โดยการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของ pH ส่วนใหญ่เกิดจากการผลิตและการใช้คาร์บอนไดออกไซด์ของสิ่งมีชีวิต และความเป็นต่างซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในรอบวัน อย่างไรก็ตามปลาสามารถดำรงชีวิตอยู่ในค่า pH ได้ตั้งแต่ช่วงระหว่าง 5-9 (Rnic, 1975) เมื่อพิจารณาค่าความเป็นต่างพบว่า กลุ่มที่ไม่เติมน้ำมันกานพลูและเติมน้ำมันกานพลู 5 มก./ล. มีค่าสูงกว่ากลุ่มก่อนการขนส่ง และกลุ่มที่เติมน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าความเป็นต่างมีความสัมพันธ์กับ pH โดยความเป็นต่างในน้ำ จะประกอบด้วย 3 รูป คือ ไบคาร์บอเนต (HCO_3^-) คาร์บอเนต (CO_3^{2-}) และไฮดรอกไซด์ (OH^-) เมื่อเกิดสภาวะที่ pH ในน้ำสูงขึ้นหรือลดลง ความเป็นต่างในรูปของอออนเหล่านี้จะเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนโดยแตกตัวให้คุณสมบัติลดหรือเพิ่มไฮโดรเจนอออน และเป็นแหล่งคาร์บอนสำรองในน้ำ จึงมีความสามารถด้านการเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำ (buffering capacity) ซึ่งน้ำที่มีความเป็นต่างต่ำจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้ง่าย อย่างไรก็ตามพบว่าค่าความเป็นต่างของทุกกลุ่มการทดลองยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับปลาน้ำจืดโดยควรมีค่ามากกว่า 50 มก./ล. ในรูปของแคลเซียมคาร์บอเนต (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2552)

Table 2 Water quality parameters were monitored after transportation, and the levels at various clove oil concentrations were determined, with fish sampled before transport used as the negative control group. Data is expressed as the mean $\pm$ S.D. (n = 3).

Parameters	Negative control	Control (No clove oil)	5 mg/L of clove oil	10 mg/L of clove oil
Temperature (C°)	26.9 $\pm$ 0.00 ^a	24.43 $\pm$ 0.06 ^b	24.4 $\pm$ 0.12 ^b	24.5 $\pm$ 0.00 ^b
pH	6.78 $\pm$ 0.00 ^a	6.53 $\pm$ 0.03 ^b	6.46 $\pm$ 0.04 ^c	6.47 $\pm$ 0.02 ^c
Alkalinity (mg/L as CaCO ₃)	104 $\pm$ 0.00 ^b	113.33 $\pm$ 3.06 ^a	109.33 $\pm$ 4.16 ^{ab}	104.67 $\pm$ 4.16 ^b
DO (mg/L)	4.96 $\pm$ 0.00 ^a	3.22 $\pm$ 0.06 ^c	3.55 $\pm$ 0.01 ^b	3.52 $\pm$ 0.03 ^b
TAN (mg/L)	0.17 $\pm$ 0.00 ^b	2.69 $\pm$ 0.29 ^a	3.12 $\pm$ 0.62 ^a	3.28 $\pm$ 0.84 ^a
Nitrite (mg/L)	0.00 $\pm$ 0.0000	0.00 $\pm$ 0.0080	0.00 $\pm$ 0.0041	0.00 $\pm$ 0.0048

Note: In the same row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$), as determined by the DMRT. DO = Dissolved Oxygen, TAN = Total Ammonia Nitrogen.

ทั้งนี้ค่าแอมโมเนียรวมมีค่าสูงในทุกชุดที่ผ่านการขนส่ง โดยชุดก่อนการขนส่งมีค่าต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยค่าแอมโมเนียเป็นตัวบ่งชี้ถึงของเสียที่เกิดขึ้นในระบบจากการขับถ่ายของสัตว์น้ำ โดยรูปแบบของแอมโมเนียอิสระหรือ $\text{NH}_3\text{-N}$ สามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษในสัตว์น้ำได้ ค่าที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของปลาตามเกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการคุ้มครองสัตว์น้ำจึงกำหนดค่าของแอมโมเนียอิสระไม่ควรเกิน 0.02 มก./ล โดยระดับความเป็นพิษของแอมโมเนียอิสระจะขึ้นอยู่กับ pH อุณหภูมิ และความเค็มของน้ำ ซึ่งค่าแอมโมเนียอิสระนั้นไม่สามารถตรวจวัดได้โดยตรงแต่สามารถคำนวณได้ ตามวิธีการของ นิคม (2554) โดยเทียบสัดส่วนโมลของแอมโมเนียอิสระที่ระดับ pH ร่วมกับอุณหภูมิ และความเข้มข้นของแอมโมเนียรวมที่ตรวจวัดได้ (TAN) ซึ่งเมื่อคำนวณแล้วระดับของแอมโมเนียอิสระระหว่างการทดลองนี้มีค่าอยู่ที่ 0.0064 มก./ล ถือว่ายังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำตามเกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการคุ้มครองสัตว์น้ำจืด (ไมตรี, 2531) และสามารถยอมรับได้ (Bhatnagar & Devi, 2013) ทั้งนี้ตรวจไม่พบค่าไนไตรท์ในทุกกลุ่มการทดลองเนื่องจากกระบวนการขนส่งปลากัดนั้นใช้น้ำสะอาดปราศจากแบคทีเรียในกลุ่มไนไตรไฟอิง (nitrifying

bacteria) ตัวอย่างเช่น *Nitrosomonas* sp. และ *Nitrobacter* sp. ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) หรือกระบวนการย่อยสลายแอมโมเนียในระบบ โดยจะทำหน้าที่ออกซิไดซ์ (oxidize) แอมโมเนียเป็นไนไตรท์ และออกซิไดซ์ไนไตรท์ไปเป็นไนเตรท ตามลำดับ (Bhatnagar & Devi, 2013) เมื่อไม่มีกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นในระบบ จึงมีโอกาสนี้จะไม่พบการสะสมของไนไตรท์ในน้ำ หรือพบในปริมาณน้อยมากในกระบวนการขนส่งระยะสั้น

อย่างไรก็ตามธรรมชาติของปลากัดไทยมีพฤติกรรมมักจะลอยตัวอยู่หนึ่ง ๆ ในที่อยู่อาศัยซึ่งเป็นแหล่งน้ำขนาดเล็ก โดยมีอวัยวะพิเศษช่วยหายใจ (labyrinth organ) ลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่มีรอยหยักคล้ายกับเขาวงกต และมีเส้นเลือดฝอยมาเลี้ยงจำนวนมาก เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการตรึงออกซิเจน และสามารถสูบอากาศจากบนผิวน้ำได้โดยตรงเป็นระยะ ๆ (Alton *et al.*, 2013) ทำให้ปลากัดไทยมีความสามารถในการปรับตัวและมีความทนทานต่อคุณภาพที่ไม่เหมาะสมได้ ซึ่งสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ 0-2 มก./ล. ในขณะที่ปลาชนิดอื่นอาจตายได้ (Monvises *et al.*, 2009)

การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด (Table 3) พบว่ายีน *HSP70* มีการแสดงออกสูงในชุดที่เติมน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. เมื่อ

เปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยยีน *HSP70* บ่งชี้ถึงการตอบสนอง ความเครียดระดับเซลล์ (Barton, 2002) โดยร่างกาย จะมีการตอบสนองต่อปัจจัยความเครียดเมื่อเกิด ความเสียหายภายในเซลล์ ด้วยการสังเคราะห์ HSPs เพิ่มขึ้นเพื่อคงสภาพของโปรตีน (protein folding) และกำจัดโปรตีนที่เสียสภาพไป (Iwama *et al.*, 1998) ซึ่งการแสดงออกของยีน *HSP70* ที่สูงในชุดที่เติมน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. สะท้อนถึงปริมาณน้ำมัน กานพลูที่มากเกินไปจนเกิดผลกระทบต่ปลา (Akar, 2011; Javaheery *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2019) ส่วนยีน *HSP90* มีการแสดงออกสูงในชุดก่อนการ ขนส่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยยีน *HSP90* มีความสำคัญใน การควบคุม การตอบสนองกับโปรตีนส่งสัญญาณ ซึ่งมีหน้าที่ในการคงสภาพของโปรตีน เมื่อเซลล์เกิด สภาพเครียด (Iwama *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 2014) การแสดงออกของยีน *HSP90* ที่สูงในชุดก่อนการ ขนส่งแสดงถึงการปรับตัวของกระบวนการตอบสนอง ความเครียดระดับเซลล์ โดยในช่วงแรกหลังจากถูก กระตุ้นโดยปัจจัยความเครียดจะส่งผลให้เกิดการ ตอบสนองและมีการสังเคราะห์โปรตีนอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปสัตว์น้ำสามารถปรับตัวเข้ากับ สภาพดังกล่าวได้ การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน ภายในเซลล์เริ่มคงที่ ทำให้กลไกผลิต HSPs ออกมา น้อยลง ส่งผลให้ *HSP90* ถูกผลิตออกมาน้อยลงด้วย

ยีน *GR* และ *HIF-1 α* มีการแสดงออกใน ทิศทางเดียวกันคือ ชุดก่อนการขนส่งมีการแสดงออก ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยยีน *GR* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับพลังงาน การสะสมไกลโคเจนในตับโดยทำงาน ร่วมกันกับฮอร์โมนคอร์ติซอล (Cortisol) ในสภาวะ

เครียด (Greenwood *et al.*, 2003) และยีน *HIF-1 α* เป็นตัวควบคุมหลักของการตอบสนองของเซลล์ที่ เกี่ยวข้องกับออกซิเจน เพื่อรักษาสภาวะสมดุลของ ออกซิเจนในร่างกาย (Jia *et al.*, 2021) การเพิ่มขึ้น ของยีน *GR* และ *HIF-1 α* ในทุกชุดการทดลองที่ผ่าน การขนส่งแสดงถึงการตอบสนองของระบบเผาผลาญ เพื่อปรับตัวเตรียมพร้อมเข้าสู่สภาวะฉุกเฉิน (Stolte *et al.*, 2008) รวมทั้งการรักษาสภาวะสมดุลของการ ออกซิเจนในร่างกายให้สามารถปรับตัวในสภาวะที่ เกิดการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนลดลง ซึ่งเป็นหนึ่ง ในกระบวนการตอบสนองความเครียดให้สัตว์น้ำ สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Honryo *et al.*, 2017)

ยีน *MR* มีการแสดงออกสูงในชุดที่ไม่เติมน้ำมันกานพลู และเติมน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. โดย ชุดก่อนการขนส่ง และเติมน้ำมันกานพลู 5 มก./ล. มี การแสดงออกต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ยีน *MR* เกี่ยวข้องกับการควบคุม สมดุลของแร่ธาตุหลัก การขับน้ำ และการควบคุมการ กักเก็บโซเดียมในไต โดยทำงานร่วมกันกับฮอร์โมน คอร์ติซอล (Cortisol) ในสภาวะเครียด (Greenwood *et al.*, 2003) การแสดงออกของยีน *MR* ที่สูงในชุดที่ ไม่เติมน้ำมันกานพลูและเติมน้ำมันกานพลู 10 มก./ล. แสดงถึงสภาวะที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากน้ำมันกานพลู มีคุณสมบัติละลายได้ดีในน้ำมัน (lipophilic) หากเติม ลงในปริมาณที่มากเกินไป อาจส่งผลให้เกิดรบกวน การขนส่งออกซิเจนที่บริเวณเยื่อบุผิวเหงือก (gill epithelium) (Javaheery *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2019) ทำให้ร่างกายต้องใช้พลังงานมากขึ้น และอาจ ส่งผลต่อเนื้อให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนหรือภาวะ เลือดเป็นกรด เนื่องจากการลดลงของออกซิเจน และ การเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ในเลือด ซึ่งเป็น สาเหตุของความเครียดได้

Table 3 The relative expression ratios of stress-related gene expression levels after transportation at various clove oil concentrations were determined, with fish sampled before transport used as the negative control group. Data are expressed as the mean $\pm$ S.D. (n = 3).

Target genes	Negative control	Control (No clove oil)	5 mg/L of clove oil	10 mg/L of clove oil
<i>HSP70</i>	1.04 $\pm$ 0.32 ^b	1.90 $\pm$ 0.42 ^b	0.92 $\pm$ 0.54 ^b	3.51 $\pm$ 0.77 ^a
<i>HSP90</i>	1.01 $\pm$ 0.21 ^a	0.13 $\pm$ 0.06 ^b	0.05 $\pm$ 0.02 ^b	0.25 $\pm$ 0.20 ^b
<i>GR</i>	1.02 $\pm$ 0.26 ^b	2.97 $\pm$ 0.64 ^a	3.04 $\pm$ 0.59 ^a	3.67 $\pm$ 0.99 ^a
<i>MR</i>	1.05 $\pm$ 0.42 ^b	2.51 $\pm$ 0.10 ^a	0.91 $\pm$ 0.18 ^b	3.80 $\pm$ 1.40 ^a
<i>HIF-1α</i>	1.44 $\pm$ 1.13 ^b	12.62 $\pm$ 2.61 ^a	12.23 $\pm$ 5.45 ^a	20.13 $\pm$ 6.97 ^a

Note: In the same row, values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$), as determined by the DMRT.

สรุป

1. การขนส่งปลากัดไทยระยะสั้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพน้ำ ได้แก่ การเพิ่มขึ้นของค่าแอมโมเนียรวม ค่า pH และปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยการเติมน้ำมันกานพลูที่ 5 และ 10 มก./ล. มีความสามารถในการช่วยลดอัตราการใช้ออกซิเจนของปลาระหว่างการขนส่งได้มากกว่ากลุ่มที่ผ่านการขนส่งไม่เติมน้ำมันกานพลูอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

2. การศึกษาผลของน้ำมันกานพลูต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดในปลากัดไทยระหว่างการขนส่งระยะสั้น พบว่าการขนส่งปลากัดเป็นสาเหตุของความเครียดในระดับสูง ทั้งนี้การเติมน้ำมันกานพลูที่ 5 และ 10 มก./ล. ไม่มีความสามารถในการช่วยบรรเทาความเครียด และในทางกลับกันจะส่งผลให้เกิดความเครียดที่สูงขึ้นได้โดยประเมินจากค่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ได้แก่ *HSP70*, *GR*, *MR* และ *HIF-1 α* ที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) หลังจากผ่านการขนส่งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แนวทางการศึกษาต่อไป

การเติมน้ำมันกานพลูมีแนวโน้มสามารถช่วยควบคุมคุณภาพน้ำระหว่างการขนส่งให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมได้ แต่ระดับความเข้มข้นที่ 5 และ 10 มก./ล.

กลับส่งผลให้เกิดความเครียดสูงขึ้น เนื่องจากระดับความเข้มข้นดังกล่าวอาจจะสูงเกินไป แนวทางการศึกษาต่อไปคือ ศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูในปริมาณน้อยระหว่างช่วง 0-5 มก./ล.

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (This research is funded by Kasetsart University through the Graduate School Fellowship Program) และทุนโครงการวิจัยวิจัยมุ่งเป้าวิทยาเขตกำแพงแสน ปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ KPS-RDI 2021-015

เอกสารอ้างอิง

- ด้านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ. (2562). รายงานประจำปี 2562. เมื่อ 15 ตุลาคม 2564, จาก <https://www.fisheries.go.th/local/index.php/main/site2/fishquarantine-suvama-bhumi>
- นิคม ละอองศิริวงศ์. (2554). แอมโมเนียกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. วารสารการประมง, 64(5), 441-445.
- วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. (2556). ประสิทธิภาพของสัตว์น้ำ. (น. 655). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- ไมตรี ดวงสวัสดิ์. (2531). เกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการ
คุ้มครองสัตว์น้ำจืด. การประชุมทางวิชาการ
ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26
(น. 101-107). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ.
(2552). การปฏิบัติทางการเพาะเลี้ยงสัตว์
น้ำที่ดีสำหรับฟาร์มปลาน้ำจืด มกษ. 7417.
(น. 97). กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและ
สหกรณ์.
- สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2562). ไฟเขียว "ปลา
กัดไทย" เป็นสัตว์น้ำประจำชาติ ชี้มีความโดดเด่น
มีเอกลักษณ์. เมื่อ 15 ตุลาคม 2564,
จาก <https://www.thairath.co.th/news/politic/1488612>
- Akar, A. (2011). Effects of clove oil on the response
of blue tilapia (*Oreochromis aureus*) by
transportation stress. *Journal of the
Arabian Aquaculture Society*, 6(1), 77-86.
- Alton, L. A., Portugal, S. J., and White, C. R. (2013).
Balancing the competing requirements of
air-breathing and display behaviour during
male-male interactions in Siamese
fighting fish *Betta splendens*. *Comparative
Biochemistry and Physiology Part A:
Molecular & Integrative Physiology*, 164(2),
363-367. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.11.012.
- Aluru, N., and Vijayan, M. M. (2009). Stress
transcriptomics in fish: a role for genomic
cortisol signaling. *General and
Comparative Endocrinology*, 164(2-3),
142-150. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.020.
- APHA, AWWA, and WEF. (1995). *Standard
Methods for the Examination of Water and
Wastewater* (19 Ed). (p. 541). New York:
American Public Health Association Inc.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N.,
Chumtong, P., Yocawibun, P., and
Imjongjirak, C. (2020). Transcriptome
analysis identifies immune-related genes
and antimicrobial peptides in Siamese
fighting fish (*Betta splendens*). *Fish &
Shellfish Immunology*, 99, 403-413. doi:
10.1016/j.fsi.2020.02.030.
- Aydin, B., and Barbas, L. A. L. (2020). Sedative
and anesthetic properties of essential oils
and their active compounds in fish: A
review. *Aquaculture*, 520, 734999. doi:
10.1016/j.aquaculture.2020.734999.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: a diversity of
responses with particular reference to
changes in circulating corticosteroids.
Integrative and Comparative Biology,
42(3), 517-525. doi: 10.1093/icb/42.3.517.
- Bhatnagar, A., and Devi, P. (2013). Water quality
guidelines for the management of pond
fish culture. *International Journal of
Environmental Science*, 3, 1980-2009.
- Bortoletti, M., Maccatrozzo, L., Radaelli, G.,
Caberlotto, S., and Bertotto, D. (2021).
Muscle cortisol levels, expression of
glucocorticoid receptor and oxidative
stress markers in the teleost fish
Argyrosomus regius exposed to transport
stress. *Animals (Basel)*, 11(4), 1160.
doi: 10.3390/ani11041160.

- Boyd, C. E. (2019). *Water quality: an introduction*. (p. 440). Switzerland: Springer Cham.
- Cárdenas, C., Toni, C., Martos-Sitcha, J. A., Cárdenas, S., de las Heras, V., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Vázquez, R., and Mancera, J. M. (2016). Effects of clove oil, essential oil of *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *Applied Ichthyology*, 32(4), 693-700. doi: 10.1111/jai.13048.
- Cole, B., Tamaru, C. S., Bailey, R., Brown, C., and Ako, H. (1999). *Shipping practices in the ornamental fish industry*. (p. 25). Hawaii: Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication.
- Gökçek, C., Öğretmen, F., and Kanyılmaz, M. (2017). Efficacy of clove oil, 2-phenoxyethanol and benzocaine on European catfish, *Silurus glanis* linnaeus 1758. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17, 129-133.
- Greenwood, A. K., Butler, P. C., White, R. B., DeMarco, U., Pearce, D., and Fernald, R. D. (2003). Multiple corticosteroid receptors in a teleost fish: distinct sequences, expression patterns, and transcriptional activities. *Endocrinology*, 144(10), 4226-4236. doi: 10.1210/en.2003-0566.
- Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 58-66. doi: 10.1111/j.1753-5131.2008.01003.x.
- Hekimoglu, M. A., Suzer, C., Saka, Ş., and Firat, M. K. (2017). Sedative effect of clove oil and 2-phenoxyethanol on marine clownfish (*Amphiprion ocellaris*) and freshwater swordfish (*Xiphophorus helleri*). *Pakistan Journal of Zoology*, 2209-2216. doi:10.177582/journal.pjz/2017.49.6.2209.2216.
- Honryo, T., Oakada, T., Kawahara, M., Kurata, M., Agawa, Y., Sawada, Y., Miyashita, S., Takii, K., and Ishibashi, Y. (2017). Estimated time for recovery from transportation stress and starvation in juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Aquaculture*, 484, 175-183. doi: 10.1016/j.aquaculture.2017.11.023.
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., and Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1), 35-56. doi: 10.1023/A:1008812500650.
- Javahery, S., Nekoubin, H., and Moradlu, A. H. (2012). Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(6), 1545-1552. doi: 10.1007/s10695-012-9682-5.
- Jerez-Cepa, I., Fernández-Castro, M., Del Santo O'Neill, T. J., Martos-Sitcha, J. A., Martínez-Rodríguez, G., Mancera, J. M., and Ruiz-Jarabo, I. (2019). Transport and recovery of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) sedated with clove oil and MS-222: effects on stress axis regulation and intermediary metabolism. *Frontiers in Physiology*, 10, 612. doi: 10.3389/fphys.2019.00612.

- Jia, Y., Wang, J., Gao, Y., and Huang, B. (2021). Hypoxia tolerance, hematological, and biochemical response in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture*, 535, 736380. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.736380.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T) Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanarothai, N., and Panijpan, B. (2009). The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia*, 35, 8-16. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2009.35.008.
- Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Ren, Y., Song, Z., and Ding, H. (2014). Two HSPs gene from juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*): cloning, characterization and expression pattern to crowding and hypoxia stress. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(6), 1801-1816. doi: 10.1007/s10695-014-9969-9.
- Omeji, S. Apochi., J. O., and Egwumah K. A. (2017). Stress concept in transportation of live fishes. *Journal of Research in Forestry, Wildlife & Environment*, 9(2), 57-64.
- Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 265-275. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.07.017.
- Pattanasiri, T., Taparhudee, W., and Suppakul, P. (2017). Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aquaculture International*, 25(1), 163-175. doi: 10.1007/s10499-016-0020-2.
- Portz, D., Woodley, C., and Cech, J. (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16, 125-170. doi.org/10.1007/s 11160-006-9012-z.
- Pottinger, T. (2008). The Stress Response in Fish-Mechanisms, Effects and Measurement. (pp. 32-48). New Jersey: Blackwell Publishing. doi: 10.1002/9780470697610.ch3.
- Refaey, M. M., and Li, D. (2018). Transport stress changes blood biochemistry, antioxidant defense system, and hepatic HSPs mRNA expressions of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Frontiers in Physiology*, 9, 1628. doi: 10.3389/fphys.2018.01628.
- Rnic, A. (1975). Effects of pH on the rate of aggressive display for mirror image reinforcement in siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Aggressive Behavior*, 1(3), 213-215. doi: 10.1002/1098-2337(1975)1:3<213::AID-AB2480010303>3.0.CO;2-M.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1998). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (p. 34). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sharma, S., and Husen, A. (2015). Anaesthetics efficacy of MS-222, Benzoak[®] vet, AQUIS[®] and clove oil on common carp (*Cyprinus carpio*) fry. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 5(3), 104-114.
- Souza, C. F., Baldissera, M. D., Baldisserotto, B., Heinzmann, B. M., Martos-Sitcha, J. A., and Mancera, J. M. (2019). Essential oils as stress-reducing agents for fish aquaculture: A Review. *Frontiers in Physiology*, 10, 785. doi: 10.3389/fphys.2019.00785.
- Stolte, E. H., Nabuurs, S. B., Bury, N. R., Sturm, A., Flik, G., Savelkoul, H. F., Lidy Verburg-van Kemenade, B. M., and Flik, G. (2008). Corticosteroid receptors involved in stress regulation in common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Endocrinology*, 198(2), 403-417. doi: 10.1677/JOE-08-0100.
- Tacchi, L., Lowrey, L., Musharrafieh, R., Crossey, K., Larragoite, E. T., and Salinas, I. (2015). Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 435, 120-127. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.09.027.
- Thongprajukaew, K., Takaeh, S., Esor, N., Saekhow, S., Malawa, S., Nuntapong, N., Hahor, W., and Choodum, A. (2023). Optimal water volume for transportation of male Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Aquaculture Reports*, 28, 101430. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101430.
- Wu, S. M., Chen, J.-R., Chang, C.-y., Tseng, Y.-J., and Pan, B. S. (2021). Potential benefit of I-Tiao-Gung (*Glycine tomentella*) extract to enhance ornamental fish welfare during live transport. *Aquaculture*, 534, 736304. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736304.
- Yousefi, M., Hoseini, S. M., Weber, R. A., da Silva, E., Rajabiesterabadi, H., Arghideh, M., and Delavar, F. H. (2022). Alleviation of transportation-induced stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, using brackish water. *Aquaculture Reports*, 27, 101378. doi: 10.1016/j.aqrep.2022.101378.