

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

1. อุปกรณ์

- ปลากัด Betta splendens. Regan เพศเมีย อายุ 6 สัปดาห์ จำนวน 1,200 ตัว ปลาที่ใช้ทดสอบมีความยาวเฉลี่ย 1.5 - 2 เซนติเมตร
- ปลากัด Betta splendens. Regan เพศผู้ จำนวน 50 ตัว อายุ 15-6 เดือน

2. วัสดุที่ใช้เลี้ยง

- ตู้เลี้ยงปลาขนาด 18" x 30" x 18" ทำด้วยกระจกเรียบทั้ง 5 ด้าน จำนวน 24 ตู้
- ไปเปิดขนาด 10 c.c.
- อาหารปลา ได้แก่ ถู๊กน้ำ
- เครื่องบ่มออกซิเจน
- ชันน้ำพลาสติก เส้นผ่าศูนย์กลาง 8" จำนวน 24 ใบ

3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

- เทอร์โมมิเตอร์สำหรับวัดอุณหภูมิของน้ำ
- เครื่องวัด pH น้ำ (pH มิเตอร์)
- กล้องจุลทรรศน์ binocular ของ Olympus
- กล้องถ่ายรูป Olympus
- ลวริงขนาดเล็ก ปากกว้าง 3"
- เวอร์เนียคาลิปเปอร์วัดความยาว
- กรรไกรผ่าตัดขนาดเล็ก

- เข็ม เขี่ย
- ครีมนปากศีบ
- ภาตผ่าตัด
- ฟิล์มสี Kodak

4. ฮอว์โมนและสารเคมี

- ฮอว์โมนเมกิลเทสโทส เตอโรนชนิดเม็ด ขนาด 0.25 มิลลิกรัม
- ethyl alcohol 70%
- formalin 5%

วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมปลา

ปลาที่ใช้ทดลองเป็นปลากัดสีนํามาจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาชอยเสนา บางเขน เป็นปลากัดเพศเมียอายุ 6 สัปดาห์ สีแดง น้ำตาล จำนวน 1,200 ตัว ต่อมานำไปแยกเลี้ยงในตู้ปลาซึ่งเตรียมไว้แล้ว ในตู้ปลาใส่น้ำประปาซึ่งได้กักขังเอาไว้แล้วตู้ละ 50 ลิตร แต่ละตู้ใส่ปลาตู้ละ 50 ตัว จำนวน 24 ตู้

การเตรียมฮอว์โมน

ใส่ ethyl alcohol 70% จำนวน 25 cc. ลงใน flask ขนาด 250 ml และใส่เมกิลเทสโทส เตอโรนลงไป 1 เม็ด (ฮอว์โมน 1 เม็ดเท่ากับ 0.25 มิลลิกรัม) คนให้ฮอว์โมนละลายและเติมนํ้ากลั่นลงไปจนได้ปริมาตรทั้งหมด 250 cc. เป็น stock solution

การดำเนินการทดลอง

ใช้ความแตกต่างของปริมาณฮอว์โมนเป็นชุดการทดลอง (treatment) ซึ่งมีอยู่ทั้งหมด 6 ชุด แต่ละชุดแบ่งการทดลองเป็น 4 ซ้ำ (replication) ซ้ำที่ 1 - 4 ของการทดลองแต่ละชุด ใช้เป็นซ้ำของการทดลองเพื่อศึกษามลการเปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงลักษณะ ตลอดจนพฤติกรรม และอัตราการรอดตายของปลากัดและใช้สำหรับลุ่มตัวอย่างเพื่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงอวัยวะเพศภายในของปลา โดยการนำใบฝ้ายตัด และใช้สำหรับนำไปเป็นแม่พันธุ์เพื่อผสมพันธุ์กับตัวผู้ ดูลักษณะและจำนวนของลูก (F_1) ต่อไป แผนการทดลองทั้ง 6 ชุด มีดังนี้

ชุดที่ 1 ตู้ปลาหมายเลข 1 - 4 เป็นชุดเปรียบเทียบ (control)เลี้ยงปลาโดยไม่ใส่ฮอร์โมน

ชุดที่ 2 ตู้ปลาหมายเลข 5 - 8 เป็นชุดของปลาทดลองโดยใส่ฮอร์โมนปริมาณ 0.5×10^{-4} ppm. ลงไปในตู้ปลาที่ใส่น้ำ 10 ลิตร

ชุดที่ 3 ตู้ปลาหมายเลข 9 - 12 เป็นชุดปลาทดลองโดยใส่ฮอร์โมนปริมาณ 1.0×10^{-4} ppm. ลงไปในตู้ปลาที่ใส่น้ำ 10 ลิตร

ชุดที่ 4 ตู้ปลาหมายเลข 13 - 16 เป็นชุดปลาทดลองโดยใส่ฮอร์โมนปริมาณ 1.5×10^{-4} ppm. ลงในตู้ปลาที่ใส่น้ำ 10 ลิตร

ชุดที่ 5 ตู้ปลาหมายเลข 17 - 20 เป็นชุดปลาทดลองโดยใส่ฮอร์โมนปริมาณ 2.0×10^{-4} ppm. ลงในตู้ปลาที่ใส่น้ำ 10 ลิตร

ชุดที่ 6 ตู้ปลาหมายเลข 21 - 24 เป็นชุดปลาทดลองโดยใส่ฮอร์โมนปริมาณ 2.5×10^{-4} ppm. ลงในตู้ปลาที่ใส่น้ำ 10 ลิตร

การดำเนินการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ช่วง คือ

ช่วงที่ 1 เป็นช่วงของการทดลองโดยใส่ฮอร์โมนในปริมาณต่าง ๆ กัน ลงในตู้ปลาที่บรรจุน้ำ 50 ลิตร ใช้เวลาทดลองตั้งแต่วันที่ 11 กุมภาพันธ์ 2525 ถึงวันที่ 25 มีนาคม 2525 รวมทั้งสิ้น 6 สัปดาห์ ในช่วงนี้ศึกษาพฤติกรรม รูปร่าง ลักษณะ การเปลี่ยนแปลงของสปีลากัด รวมทั้งอัตราการรอดตาย เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ช่วงที่ 2 เป็นช่วงของการทดลองเลี้ยงต่อจากช่วงแรก โดยในช่วงนี้ทุกชุดของการทดลองงดใส่ฮอร์โมน โดยเลี้ยงในน้ำธรรมชาติ ระยะเวลาทดลองตั้งแต่ 26 มีนาคม 2525 ถึง 30 เมษายน 2525 รวมเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาอัตราการรอดตาย และดูการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ลักษณะของปลา

ช่วงที่ 3 เป็นช่วงของการผสมพันธุ์ โดยนำปลาที่คัดเลือกมาผสมกันเป็นคู่ละคู่ คู่ละ 4 ตัว โดยเลือกตัวที่แข็งแรงที่สุด เพื่อจะศึกษาลักษณะของลูกผสม (F_1) ที่เกิดขึ้น ใช้เวลาทดลอง 4 สัปดาห์

การให้อาหารปลา

ให้อุณหภูมิในเวลาเช้าประมาณ 9.00 น. ทุกวัน วันละครั้ง

การเปลี่ยนน้ำ

เปลี่ยนน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ใช้น้ำประปาที่ตั้งทิ้งไว้ข้าม 1 อาทิตย์ เพื่อให้คลอรีนระเหยไป ในการเปลี่ยนน้ำทุกครั้ง วัดอุณหภูมิให้อุณหภูมิอยู่ระหว่าง $25 - 29^{\circ}C$ และวัด pH ของน้ำให้อยู่ระหว่าง 7.5 - 8 และเตรียมฮอร์โมนทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนน้ำ

แสงสว่าง

ได้รับแสงสว่างจากดวงอาทิตย์ และจากหลอดไฟซึ่งอยู่เหมือนอย่างเลี้ยงปลาประมาณ 2 เมตร

การบันทึกผลการทดลอง

007371

การศึกษาพฤติกรรม บันทึกและศึกษาพฤติกรรมของปลาทุกครั้งภายหลังจากเปลี่ยนน้ำ และถ่ายอุจจาระ

การวัดขนาดความยาวของปลาและครีบหลัง การวัดขนาดความยาวของปลา เริ่มตั้งแต่ก่อนนำปลามาทำการทดลอง โดยวัดความยาวเฉลี่ยได้ประมาณ 1.5 - 2 เซนติเมตร และหลังจากการให้ออร์โมนแล้ว 6 สัปดาห์ นำปลามาวัดขนาดความยาว โดยวัดความยาวตั้งแต่ปลายจงอยปากไปจนจดปลายกระดูกหาง และวัดความยาวครีบหลังไปหน่วยเป็นมิลลิเมตร ในการวัดความยาวปลาและครีบหลังผู้วัดอย่างขึ้นมาซ้ำ (replication) ละ 20 ตัว นำมาแช่ไนฟอรมาลินก่อน เพื่อให้ปลาตาย และบันทึกผลไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป



อัตราการรอดตาย ในการเปลี่ยนน้ำแต่ละครั้ง ได้มีการบันทึกอัตราการรอดตายของปลาในแต่ละตู้ไว้ด้วย

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะ หลังจากให้ออร์โมนแล้ว 6 สัปดาห์ กลุ่มปลา มาช้าละ 10 ตัว นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอก เช่น สีของลำตัว ความยาวของครีบหลัง ครีบท้อง ครีบกัน และครีบหาง และบันทึกผลพร้อมทั้งถ่ายรูปไว้ หลังจากนั้น นำปลงที่ทดลองทั้งหมดไปผ่าตัด เพื่อตรวจดูการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ และตรวจดูอวัยวะภายใน โดยใช้กรรไกรผ่าทางซีกซ้าย เริ่มจากช่องทวาร เลาะไปตามกระดูกซี่โครงไปจนจรด Operculum แล้วแกะออก นำรังไข่ไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายรูป และเปรียบเทียบชุดควบคุม

การผสมพันธุ์ปลา คัดปลากัด ตัวเมียจากทุกชุด ชุดละ ๔ ตัว ผสมกับปลากัดตัวผู้ซึ่งได้ซื้อมา เลี้ยงไว้ในขวดเหล้าแบนตั้งไว้ใกล้กันเป็นคู่ ๆ ทิ้งไว้เป็นเวลา ๑ สัปดาห์

เตรียมภาชนะคือ ขันพลาสติกจำนวน ๒๔ ใบ ใส่น้ำประปาที่ตกตะกอนแล้วลงในขัน อุณหภูมิของน้ำประมาณ 25 - 29° C pH ของน้ำประมาณ 7.5 - 8.0 และข้อนปลา ทั้งตัวผู้และตัวเมียที่ได้ตั้งเทียบไว้แต่ละคู่ ใส่น้ำในขันแต่ละใบ ปลาตัวเมียที่พร้อมจะผสมพันธุ์จะมี genital pore ขนาดใหญ่สีขาวแกมเหลือง เมื่อใส่ลงไปในระยะแรกตัวผู้จะไล่ตัวเมียไปรอบ ๆ เมื่อเริ่มผสมพันธุ์ ปลาตัวเมียจะลอยขนานกับผิวน้ำได้หวอดที่ตัวผู้สร้างไว้ ตัวผู้จะอรัดตัวเมียตรงบริเวณระดับ genital pore แล้วปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกับไข่ พ่อปลาจะว่ายน้ำไปอมไข่ที่ผสมแล้วและกำจึงจมลงสู่ก้นอ่าง นำไปพันไว้ในฟองหวอด เมื่อแม่ปลาหนีไปอยู่ที่มุมขัน เป็นอันสิ้นสุดการผสมพันธุ์ต้องตักเอาแม่ปลาออก ถ้าปล่อยไว้อาจถูกพ่อปลากัดตาย ส่วนพ่อปลาจะคอยดูแลไข่ที่ได้รับการผสมจนกระทั่งลูกปลาว่ายน้ำได้แข็งแรง และบันทึกผลของการทดลอง