

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเพาะพันธุ์ปลา

นำปลาตัวผู้ที่โตเต็มวัยและปลาตัวเมียที่มีไข่อยู่เต็มเทียบกันไว้เป็นคู่ ๆ โดยเลี้ยงในชวคขนาด 3.5"x6.5" ใส่น้ำปริมาตร 600 ลูกบาศก์เซนติเมตร เมื่อปลาตัวผู้ก่อหวอดและปลาทั้งคู่ว่ายน้ำมาอยู่ใกล้กันเกือบตลอดเวลา นำปลาตัวผู้ใส่ในอ่างขนาด 12"x20" ซึ่งใส่น้ำระดับสูง 4.5" มีสาหร่ายหางกระรอกอยู่เล็กน้อย แล้วนำชวคที่มีปลาตัวเมียอยู่ภายในวางลงในอ่างเพาะ สังเกตดูปลาตัวเมีย ถ้าเห็นว่าพร้อมที่จะผสมพันธุ์ (ซึ่งดูได้จากส่วนท้องที่ป่องและมีสีขาวแกมเหลือง) ก็ขอนปลาตัวเมียออกจากชวคใส่ลงในอ่างเพาะ ยกชวคออกจากอ่าง หลังจากนั้นปลาตัวผู้จะว่ายน้ำไล่ปลาตัวเมียไปรอบ ๆ อ่างนานประมาณ 5 นาที แล้วจึงเริ่มรัดกันและวางไข่ เมื่อวางไข่แล้วปลาตัวเมียหนีไปอยู่หนึ่ง ๆ ที่มุมอ่าง และปลาตัวผู้คอยไล่ไม่ให้ปลาตัวเมียเข้าใกล้บริเวณที่มีไข่ คือบริเวณหวอดที่ปลาตัวผู้สร้างไว้และนำไข่ไปเก็บ แสดงว่าการวางไข่สิ้นสุดลง ระยะเวลาตั้งแต่ปลาเริ่มรัดกันจนกระทั่งการวางไข่สิ้นสุดลงใช้เวลาประมาณ  $1\frac{1}{2}$  - 5 ชั่วโมง ขอนปลาตัวเมียออก ปล่อยให้ปลาตัวผู้ดูแลไข่และลูกปลาซึ่งจะฟักเป็นตัวภายใน 48 ชั่วโมง จนกระทั่งลูกปลาเริ่มว่ายน้ำได้เป็นอิสระ จึงแยกพ่อแม่ปลาออก

1.1 การแยกปลา

เริ่มแยกปลาเมื่อปลามีความยาวจากปลายจมูกถึงส่วนคอคของหาง (Standard length) ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ใสในชวคขนาด 3.5"x6.5" ที่มีน้ำปริมาตร 600 ลูกบาศก์เซนติเมตร ชวคละตัว ใช้กระดาษแข็งกันระหว่างชวคไม่ให้ปลามองเห็นกัน

1.2 อาหารปลา

เลี้ยงด้วยไรน้ำ (Daphnia) ในระยะแรก จนกระทั่งลูกปลาโตพอที่จะกินลูกน้ำ

ได้จึงเลี้ยงด้วยลูกน้ำ ตอนเช้าประมาณ 8.00 - 9.00 น. วันละครั้ง

### 1.3 การเปลี่ยนน้ำ

เปลี่ยนน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ใช้น้ำประปาที่ดั่งทิ้งไว้อย่างน้อย 2 วัน เพื่อให้คลอรีนระเหยไป

### 1.4 การวัดขนาดปลา

นำปลาที่ต้องการวัดขนาดมาวางบนฟองน้ำที่เปียก ใช้นเวอร์เนียร์วัดความยาวจากปลายสุดทางก้านหัวถึงส่วนคอคของหาง ซึ่งเรียกว่าความยาวมาตรฐาน (Standard length)

### 1.5 อุณหภูมิของน้ำ

ระหว่าง 23 - 29 องศาเซนติเกรด โดยเฉลี่ยประมาณ 27 องศาเซนติเกรด

### 1.6 แสงสว่าง

ได้รับแสงสว่างจากหลอดไฟซึ่งอยู่เหนือชวยปลาประมาณ 2 เมตร วันละ 10 ชั่วโมง

## 2. การทดลองเกี่ยวกับการใช้สายตา (Vision)

ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลากัดไทยโดยใช้สิ่งเร้า (Stimulus) ต่าง ๆ กันตั้งแต่ปลาที่มีความยาวมาตรฐาน 1.5 - 4 เซนติเมตร จำนวน 20 ตัว

เริ่มทดลองเมื่อลูกปลามีความยาวมาตรฐานประมาณ 1.5 เซนติเมตร สิ่งเร้าที่ใช้ ได้แก่ กระจกเงา ปลากัดไทยตัวผู้ ปลากัดไทยตัวเมีย ปลากระจก (Glassfish, *Chanda* sp.) หุ่นรูปปลา และหุ่นรูปกลม

นำปลาที่จะศึกษามาวัดความยาวมาตรฐานด้วยเวอร์เนียร์ ใส่ปลานี้ลงในอ่างขนาด 8"x12" ที่มีน้ำระดับสูง 5" สำหรับสิ่งเร้าที่มีชีวิตคือ ปลากัดไทยตัวผู้ ปลากัดไทยตัวเมีย

และปลากะจก นำไปใส่ในอ่างขนาดเดียวกัน มีน้ำสูงเท่ากัน ที่วางขนานและห่างจากอ่าง  
ทดลองประมาณ 1" กระจกเงาวางพียงไวคานนอกของอ่างที่ใส่สิ่งเร้า ส่วนหุ่นรูปปลาและ  
หุ่นรูปกลม ไซ้แขวนในอ่างที่ใส่สิ่งเร้า จักให้หุ่นแกว่งไปมาช้า ๆ เอากระดากขึ้นน้ำตาลกัน  
ระหว่างอ่างทดลองกับอ่างที่ใส่สิ่งเร้าทิ้งไว้นาน 5 นาที เมื่อจะเริ่มทดลองก็ดึงกระดากที่กัน  
ออก ข้อมูลต่าง ๆ ที่บันทึกก็คัดแปลงมาจาก Figler (1972) ได้แก่

ระยะเวลาตั้งแต่ปลาหันไปทางสิ่งเร้าจนกระทั่งปลากาง Operculum ครั้งแรก  
เป็นวินาที (Latency period = L)

จำนวนครั้งที่ปลากาง Operculum (Operculum Extension = OE)

ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลาทำท่ากัดสิ่งเร้า (Bite = B) ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลาขึ้นมาสูดอากาศที่ผิวน้ำ (Air Gulping = AG) ในเวลา

10 นาที

ใช้เวลาสังเกต 10 นาทีต่อสิ่งเร้า 1 ชนิด ศึกษาในปลากัดตัวผู้ขนาดละ 10 ตัว  
และปลากัดตัวเมียขนาดละ 10 ตัว ปลาแต่ละตัวได้พักนาน 40 นาที ก่อนจะถูกนำมาทดสอบ  
กับสิ่งเร้าชนิดต่อไป ลำดับ (Sequence) ของสิ่งเร้าในการทดสอบแต่ละครั้งเป็นแบบสุ่ม  
(Random) เพื่อมิให้ปลามีโอกาสเรียนรู้ การทดสอบกระทำสัปดาห์ละครั้ง จนกระทั่งปลา  
มีความยาวมาตรฐานประมาณ 4 เซนติเมตร

### 3. การทดลองเกี่ยวกับการได้กลิ่น (Olfaction)

ศึกษาเกี่ยวกับฟีโรโมน (Pheromone)

ทดลองในปลาที่โตแล้ว (Sexually mature) ความยาวมาตรฐาน 3 - 4 เซน  
ติเมตร เปรียบเทียบว่าน้ำที่เคยมีปลากัดตัวผู้หรือปลากัดตัวเมียคอกันจะมีผลต่อการแสดงพฤติ-  
กรรมการรุกรานของปลากัดตัวผู้ตัวใหม่ต่างจากเดิมที่มันเคยเป็นเมื่ออยู่ในน้ำเปล่าหรือไม่ การ

ที่ศึกษาเฉพาะผลที่มีต่อปลากัดตัวผู้ เพราะจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า พฤติกรรมการรุกราน มีความรุนแรง เฉพาะในปลากัดตัวผู้เท่านั้น

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองคือ

3.1 เตรียมอ่างขนาด 6"x10" ใส่ น้ำประปาที่ ตั้งทิ้งไว้ อย่างน้อย 2 วัน ระดับน้ำสูง 3" วัด pH และอุณหภูมิของน้ำ ใส่ปลากัดตัวผู้ 2 ตัวลงในอ่าง ทิ้งไว้ให้ปลาต่อสู้กันนาน 15 นาที ซอนปลาใส่ในขวดตามเดิม วัด pH และอุณหภูมิของน้ำในอ่าง แล้วนำปลากัดตัวผู้ที่ วัดความยาวมาตรฐานแล้วใส่ลงในอ่างนี้ สังเกตและบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ต่อไปนี้เป็นเวลา 10 นาที

ระยะเวลาตั้งแต่ใส่ปลาลงในอ่างทดลองจนกระทั่งปลากางครีบครั้งแรกเป็นวินาที (Latency period = L)

จำนวนครั้งที่ปลากางครีบ (Fin Erection = FE) ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลากาง Operculum (Operculum Extension = OE)

ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลาขึ้นมาสูดอากาศที่ผิวน้ำ (Air Gulping = AG) ในเวลา 10 นาที

การที่ถือเอาการกางครีบเป็นจุดเริ่มต้นของพฤติกรรมการรุกรานในการทดลองนี้ ก็ เพราะ จากการสังเกตพบว่า การกาง Operculum เกิดขึ้นน้อยมาก และการกางครีบ เป็นเครื่องชี้ถึงความรุนแรงของพฤติกรรมการรุกรานรองลงมาจาก การกาง Operculum

สำหรับ Control ใช้วิธีการเดียวกัน แต่ใช้น้ำเปล่าที่ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แทน น้ำที่เคยมีปลากัดต่อสู้กัน จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลอง 10 ตัว

3.2 ใช้วิธีการเช่นเดียวกับในหัวข้อ 3.1 ทุกประการ แต่ใส่ปลาตัวเมีย 2 ตัวรวมกันใน อ่างทดลองแทนการใส่ปลากัดตัวผู้ 2 ตัว จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลอง 10 ตัว

#### 4. ฮอร์โมน

ศึกษาผลของฮอร์โมนแอนโดรเจนและแอนติแอนโดรเจน (Antiandrogen) (ในการทดลองนี้ใช้เทสโทสเทอโรนโพรพิโอเนตและไซโปรเทอโรนอาซิเตตตามลำดับ) ที่มีต่อพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลากัดไทย

วิธีการคัดแปลงมาจาก อวย เกตุสิงห์ และผู้ร่วมงาน (2511) และอวย เกตุสิงห์ และนันทพร นิลวิเศษ (2511)

นำปลากัดตัวผู้และตัวเมียที่โตเต็มวัย ความยาว 3 - 4 เซนติเมตร มาอย่างละ 30 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ทำการทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลากัดตัวผู้และตัวเมีย ก่อนและหลังการฉีดควายน้ำมันมะกอก

นำปลากัดตัวผู้และตัวเมียอย่างละ 10 ตัว มาทดสอบพฤติกรรมกรรมการรุกรานโดยใช้กระจกเงาเป็นสิ่งเร้า (การที่ใช้กระจกเงาเป็นสิ่งเร้าเพราะจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่ากระจกเงาเป็นสิ่งเร้าที่ทำให้ปลากัดตอบสนองได้ในปริมาณมากที่สุด) โดยนำปลาแต่ละตัวใส่ในอ่างทดลองขนาด 8"x12" ที่มีน้ำระดับสูง 5" ทิ้งไว้ 5 นาทีเอากระจกเงาวางพิงชิดคานนอกของอ่างทดลอง บันทึกข้อมูลเช่นเดียวกับที่กระทำในการทดลองเกี่ยวกับการใช้สายคาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้น 1 วัน นำปลากลุ่มเดิมมาทำให้สงบโดยใส่ในน้ำเย็น อุณหภูมิประมาณ 12 องศาเซนติเกรด ฉีดน้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ 0.02 ml. เข้าทางกลามเนื้อคานหลังใกล้ครีบหลัง เอาปลาใส่ในชวคตามเค็ม ทิ้งไว้ประมาณ 30 ชั่วโมง นำปลามาทดสอบพฤติกรรมกรรมการรุกรานโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับการทดสอบก่อนฉีด

กลุ่มที่ 2 ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลากัดตัวผู้และตัวเมีย ก่อนและหลังการฉีดควายเทสโทสเทอโรนโพรพิโอเนต (Testosterone propionate)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ฉีดควายสารละลายเทสโทสเทอโรนโพรพิโอเนต

ละลายในน้ำมันมะกอก ขนาดความเข้มข้น 125 mg/1ml. ปริมาณ 0.02 ml. (0.25 mg.) เท่ากันทุกตัว จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลอง ปลาตัวผู้ 10 ตัว ปลาตัวเมีย 10 ตัว

กลุ่มที่ 3 ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลากัดตัวผู้และตัวเมีย ก่อนและหลังการฉีดด้วยไซโปรเทอโรนอะซิเตต (Cyproterone acetate)

ใช้วิธีการเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 แต่ฉีดด้วยสารละลายไซโปรเทอโรนอะซิเตต ละลายในน้ำมันมะกอกขนาดความเข้มข้น 150 mg/1ml. ปริมาณ 0.02 ml. (0.3 mg.) เท่ากันทุกตัว จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลอง ปลาตัวผู้ 10 ตัว ปลาตัวเมีย 10 ตัว

5. ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานระหว่างปลากัดไทยเพศเดียวกันและต่างเพศ เมื่อปลามีขนาดต่าง ๆ กัน

เริ่มศึกษาเมื่อปลาโตพอที่จะแยกเพศได้ คือมีความยาวมาตรฐานประมาณ 2 เซนติเมตร 2 สัปดาห์ต่อครั้ง จนกระทั่งปลามีความยาวประมาณ 4 เซนติเมตร ปลาแต่ละตัวถูกนำไปรวมกับคูต่อสู้ตัวเดิมตลอดการทดลอง ขนาดของคูต่อสู้ใกล้เคียงกับขนาดของปลาที่จะศึกษา

นำปลากัดตัวผู้จำนวน 40 ตัว ตัวเมีย 40 ตัว มาวัดความยาวมาตรฐาน แบ่งปลาเหล่านี้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ

1. ปลาตัวผู้ 20 ตัว จัดเป็น 10 คู่ โดยแต่ละคูมีขนาดไล่เลี่ยกัน
2. ปลาตัวเมีย 20 ตัว จัดเป็น 10 คู่ โดยแต่ละคูมีขนาดไล่เลี่ยกัน
3. ปลาตัวผู้ 20 ตัว ปลาตัวเมีย 20 ตัว จัดเป็น 20 คู่ แต่ละคู่ประกอบด้วยปลาตัวผู้ 1 ตัว และปลาตัวเมีย 1 ตัว

ศึกษาพฤติกรรมกรรมการรุกรานของปลาแต่ละคู่ในอ่างขนาด 8"x12" ที่มีน้ำระดับสูง 5" สังเกตและบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ทอไปนี้เป็นเวลา 10 นาที

ระยะเวลาตั้งแต่ใส่ปลาลงไปในอ่าง จนกระทั่งปลากาง Operculum ครั้งแรก เป็นวินาที (Latency period = L)

จำนวนครั้งที่ปลากาง Operculum (Operculum Extension = OE) ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลากัดคุดคูดูด (Bite = B) ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่มีการบิขากรรไกร (Jaw Lock = JL) ในเวลา 10 นาที

จำนวนครั้งที่ปลาขึ้นมาสูดอากาศที่ผิวหนัง (Air Gulping = AG) ในเวลา 10 นาที

#### 6. ศึกษาแบบแผน (Pattern) พฤติกรรมการรุกรานระหว่างปลากัดตัวผู้

ศึกษาเฉพาะในปลากัดตัวผู้ ทั้งนี้เพราะจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่า พฤติกรรมการรุกรานมีความรุนแรงเฉพาะในปลากัดตัวผู้เท่านั้น

นำปลากัดตัวผู้โตเต็มวัย ความยาวมาตรฐาน 3 - 4 เซนติเมตร ใส่ในอ่างขนาด 8"x12" ที่มีน้ำระดับสูง 5" เป็นคู่ ๆ โดยจัดให้ปลาแต่ละคู่มีขนาดใกล้เคียงกัน สังเกตและบันทึกแบบแผนพฤติกรรมในการต่อสู้ของปลาอย่างละเอียด ตั้งแต่เริ่มใส่ปลาลงในอ่างจนกระทั่งการต่อสู้สิ้นสุดลง เมื่อการต่อสู้สิ้นสุดลง แยกปลาใส่ในขวดตามเดิม

จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลอง 40 ตัว

#### 7. ศึกษา Histology

สุ่มปลาขนาดต่าง ๆ กันตั้งแต่ความยาวมาตรฐาน 0.7 เซนติเมตร ถึง 2.3 เซนติเมตร ขนาดละ 3 ตัว, Fix ด้วย Bouin fixative ตัวที่มีความยาวมากกว่า 1 เซนติเมตรนำไป Decalcify แล้วทำ Paraffin section ตัด Serial section หนา 8  $\mu$  ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin ศึกษาลักษณะตา จมูก และอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาแต่ละขนาดใต้กล้องจุลทรรศน์

สำหรับปลาที่ใช้ในการทดลองเกี่ยวกับฮอร์โมน หลังจากทำการทดสอบแล้วนำมาผ่าตัดเอาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาแต่ละกลุ่มไปศึกษาทาง Histology เปรียบเทียบกัน โดย fix ด้วย Bouin fixative ทำ Paraffin section ตัด section หนา

๘ μ ย้อมควยดี Haematoxylin และ Eosin แลวนำไปศึกษาได้กลองจุลทรรศน์