รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการ ผลของฮอร์โมน17α-methyltestosterone และ letrozole ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการแปลงเพศในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. อัมพร ทองกู้เกียรติกูล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 1276

สัญญาเลขที่ 10/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของฮอร์โมน17α-methyltestosterone และ letrozole ต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการแปลงเพศในปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*)

ผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร. อัมพร ทองกู้เกียรติกูล
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 10/2561

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของ letrozole และ ฮอร์โมน 17α-methyltestosterone ต่อการเปลี่ยนแปลงโกนาดและการเปลี่ยนเพศปลาการ์ตูนส้มขาว *Amphiprion ocellaris* โดยใช้ letrozole ความเข้มข้น 50 และ 100 และ มิลลิกรัม / กิโลกรัม (อาหาร) และ α-methyl testosterone ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัม / กิโลกรัมอาหาร ผสมกับอาหารแล้วเลี้ยงปลาเป็นเวลานาน 60, 90 และ 210 *วัน* พบว่า letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม / กิโลกรัม (อาหาร) เลี้ยงปลานาน 210 วัน สามารถเปลี่ยนเพศปลาได้และไม่มีความผิดปรกติในการพัฒนาของโกนาด การให้ฮอร์โมน 17α-methyl testosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม / กิโลกรัม (อาหาร) เป็นเวลานาน 210 วันพบว่า ฮอร์โมน 17α- methyl testosterone กระตุ้นการสร้างสเปริม์จำนวนมาก แต่ภายใน gonad มี atretic cells จำนวนมาก ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าความเข้มข้นของ 17α-methyl testosterone สูงมีผลต่อการเจริญและการพัฒนาของโกนาด แต่การวิจัยครั้งนี้พบปลาที่ได้รับ letrozole หรือ17α- methyl testosterone มีน้ำหนักไม่แตกต่างจากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การให้ letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม / กิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคของสเปอร์มาโทไซต์ สเปอร์มาทิด และ สเปอร์มาโทซัว

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of letrozole (a non-steroidal aromatase inhibitor) and 17α-methyltestosterone on gondal sex differentiation and sex reversal in *Amphiprion ocellaris.* Different doses of letrozole 50 and 100 mg/kg feed were incorporated into diet and fed for periods of 60, 90 and 210 days was studied. Specifically, treatment with 100 mg/ kg feed, 210 days yielded sex-reversed fish without any abnormalities in gonadal development. Fish that received 17α-methyl testosterone 100 mg/kg feed stimulated spermatogenesis and showed area with present of atretic cells. This result showed that high concentrations of 17α-methyl testosterone had effected on growth and gonadal development. The groups fed on the letrozole and methyl testosterone did not differ from the control group in terms of body weight. Administration of a single dose of letrozole of 100mg/kg feed, 210 days did not induce alternations in ultrastructure of germ cell development in treated fish including spermatocyte, spermatid and spermatozoa.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... .....ข

บทคัดย่อภาษาไทย.....ค

บทคัดย่อยภาษาอังกฤษ..... .....ง

สารบัญ..... จ

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญภาพ.....ช

คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย.....ฌ

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....8

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....8

1.3 ขอบเขตของโครงการ.....8

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....8

บทที่ 2 วิธีการทดลอง.....9

2.1 ตัวอย่างปลาการ์ตูนส้มขาวที่ใช้ในการทดลอง.....9

2.2 การเตรียมอาหารผสมกับฮอร์โมน.....9

2.3 การวิเคราะห์โครงสร้างโกนาดของปลาการ์ตูนที่ไม่ได้รับสารและได้รับสาร.....9

2.4 การศึกษาจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับฮอร์โมน.....11

บทที่ 3 ผลการทดลอง.....12

3.1 ผลของ letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศปลาการ์ตูนส้มขาว.....14

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 ผลของ letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วันต่อการเปลี่ยนเพศล๔กปลาการ์ตูนส้มขาว.....17

3.3 ผลของ α-methyl testosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศปลาการ์ตูนส้มขาว.....20

3.4 ผลของ α-methyl testosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศปลาการ์ตูนส้มขาว.....23

3.5 การศึกษาจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ lectrozole 26

บทที่ 4 อภิปรายผล.....29

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....31

เอกสารอ้างอิง.....32

Output จากโครงการวิจัย.....43

ประวัติผู้วิจัย.....44

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลของ letrozole ต่ออัตราการรอดของปลาการ์ตูนอายุ 60 วัน.....12

4.2 ผลของ letrozole ต่ออัตราการรอดของปลาการ์ตูนอายุ 90 วัน.....12

4.3 ผลของ letrozole ต่ออัตราการรอดของปลาการ์ตูนอายุ 210 วัน.....13

4.4 ผลของ methyl testosterone ต่ออัตราการรอดของปลาการ์ตูนอายุ 60 วัน.....13

4.5 ผลของ methyl testosterone ต่ออัตราการรอดของปลาการ์ตูนอายุ 90 วัน.....14

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและการแปลงเพศปลา....4

2 วิถี neuroendocrine gonadal axis ในการควบคุมการแปลงเพศปลาในปลาที่มี 2 เพศ....5

3 โครงสร้างฮอร์โมน methyl testosterone....6

4 แผนภาพการทดลองเรื่องการให้ lectrozole 10

5 แผนภาพการทดลองเรื่องการให้ฮอร์โมน methyl testosterone....10

6 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและรับ letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน....15

7 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและรับ letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน....18

8 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและรับ methyl testosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน....21

9 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและรับ methyl testosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน....24

10 จุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ letrozole 100 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน....27

คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

OC	คือ	ovarian cavity
OG	คือ	oogonium
OC1	คือ	chromatin nucleolus oocyte
OC2	คือ	perinucleolus oocyte
MC	คือ	mitotic cell
PG	คือ	primordial germ cell
SC	คือ	spermatocyte
ST	คือ	spermatid
SZ	คือ	spermatozoa
AT	ตือ	atretic cell
Lu	คือ	lumen
HC	ตือ	heterochromatin
SY	คือ	synaptonemal complex
DC	คือ	distal tubule
MT	คือ	ไมโทคอนเดรีย
N	คือ	นิวเคลียส
F	คือ	flagellum

บทที่ 1
บทนำ

1.1 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของปลาการ์ตูนส้มขาว

ปลาการ์ตูนถูกจัดในวงศ์ปลาสลิดหิน (สุภาพร, 2543) ปัจจุบันปลาการ์ตูนที่พบทั่วโลกและได้มีการจัดจำแนกแล้วมี 28 ชนิดเป็นสกุล *Amphiprion* 27 ชนิด และสกุล *Premnas* 1 ชนิด ปลาการ์ตูนมีการจัดอันดับอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Osteicthyes

Order: Perciforms

Family: Pomacentridae

Genus: *Amphiprion*

Species: *Amphiprion ocellaris*

ชีววิทยาของปลาการ์ตูนส้มขาว

ปลาการ์ตูนส้มขาวมีชื่อสามัญ false-clown anemonefiss เป็นปลาการ์ตูนที่มีขนาดเล็ก ตัวโตเต็มวัยมีความยาวประมาณ 80 มิลลิเมตร มีรูปร่างเป็นรูปไข่ยาวเรียว แบนยาว ลำตัวมีเกล็ดหนามมีลักษณะสากมือ แต่บริเวณปากด้านบนไม่มีเกล็ด แผ่นปิดเหงือกและใต้ตามีหนามเรียงกันเป็นแถว ลำตัวมีสีส้มเข้ม มีแถบสีขาว 3 แถบพาดบริเวณส่วนหัว ลำตัว และหาง ขอบของแถบสีขาวเป็นเส้นสีดำ ขอบนอกของครีบเป็นสีขาวและขอบในเป็นสีดำ (ราตรี สุขสุวรรณ์ และ เกียรติศักดิ์ เอี่ยนเล่ง, 2551) ปลาการ์ตูนส้มขาวอาศัยอยู่ในเขตร้อน ในมหาสมุทรแปซิฟิกและมหาสมุทรอินเดีย ปลาการ์ตูนส้มขาวอาศัยตามแนวปะการัง (Allen, 1974) และอยู่ร่วมกันแบบ symbiosis กับดอกไม้ทะเล 3 ชนิดคือ *Heteractis magnifica*, *Stichadactyla gigantea* และ *Stichodactyla mertensiimertensi* (Mariscal, 1970)

วงชีวิตของปลาการ์ตูน

ปลาการ์ตูนส้มขาวมีวงชีวิตคล้ายวงชีวิตของปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆ ในธรรมชาติปลาการ์ตูนอยู่ร่วมกันเป็นฝูงประมาณ 6-8 ตัว เมื่อมีการจับคู่ปลาทั้ง 2 ตัวจะแยกจากฝูงและมีการสร้างอาณาเขต เมื่อปลาเพศผู้และเพศเมียผสมพันธุ์กันแล้ว ปลาเพศเมียพร้อมวางไข่ ปลาเพศผู้จะหาสถานที่วางไข่ซึ่งเป็นโขดหินใต้ดอกไม้ทะเลซึ่งเป็นแหล่งที่ปลาเคยอาศัยอยู่ก่อน ปลาการ์ตูนวางไข่ครั้งละ 500-1500 ฟอง ขึ้นกับสภาพความสมบูรณ์ของปลาเพศเมีย เมื่อวางไข่ทั้งพ่อและแม่ปลาจะช่วยกันดูแลไข่ ประมาณ 6-8 วันจะฟักเป็นตัว ปลาการ์ตูนระยะตัวตัวอ่อนจะลอยขึ้นผิวน้ำและล่องลอยไปตามกระแสน้ำเพื่อหาแพลงก์ตอนสัตว์กินเป็นอาหาร เมื่ออายุ 3 สัปดาห์ ปลาจะเข้าระยะ juvenile และจะลงมาอาศัยตามดอกไม้ทะเล (อุ่นจิตร, 2537)

พัฒนาการของโกนาด (gonad development) ของปลากระดูกแข็ง

ปลากระดูกแข็งมีพัฒนาการของโกนาดแบ่งเป็นรูปแบบต่างๆดังนี้

1 Gonochoristic species ซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้

1.1 Differentiated gonochoristic species (primary gonochorism) พัฒนาการของ gonad ของปลาพวกนี้เริ่มจาก indifferent gonad พัฒนาเป็นรังไข่หรืออัณฑะโดยตรง เช่นปลา *Oncorhynchus kistuch* (Piferrer and Donaldson, 1989), *Abramis brama* (Talikina, 1995), *Esox masquinongy* (Lin et al., 1997), *Syngnathus schlegeli* (Lee et al., 1996), *Dicentrarchus labrax* (Bla´zquez et al., 1998a) และ *Cyprinus carpio* (Komen et al.,1992)

1.2 Undifferentiated gonochoristic species ปลากลุ่มนี้เริ่มจาก gonad พัฒนาเป็นรังไข่ หลังจากนั้นพัฒนาเป็นอัณฑะ โดยจำนวนประชากรของปลาครึ่งหนึ่งมีอัณฑะและอีกครึ่งหนึ่งมีรังไข่ (Guerrero-Estevez & Moreno-Mendoza, 2010)

2. Protandous hermaphrodite คือ การเปลี่ยนเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมีย ซึ่งพบในปลาการ์ตูน ในระยะแรกเริ่มหลังจากที่ฟักออกจากไข่ยังไม่สามารถกำหนดได้ว่าเป็นเพศใดจนกว่าจะเป็นตัวเต็มวัยจึงปรากฏเป็นปลาเพศผู้ ซึ่งในปลารุ่นเดียวกันที่มีขนาดใหญ่ที่สุดจะต้องเปลี่ยนแปลงเป็นปลาเพศเมีย ซึ่งมีลักษณะก้าวร้าว ถ้าปลาการ์ตูนเพศเมียตายไป ปลาการ์ตูนเพศผู้ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดหรือปลาการ์ตูนเพศผู้ที่ชนะจากการต่อสู้เพื่อช่วงชิงการครอบครองฝูงจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทดแทนเพศเมียที่ขาดหายไปได้ภายใน 4 สัปดาห์ โดยจะมีการเพิ่มขนาดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่สีสันจะสวยลดลง (Fricke and Fricke, 1977; Ross, 1978). ในธรรมชาติการเปลี่ยนเพศของปลาประเภทนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนประชากรในฝูงและจำนวนของดอกไม้ทะเล

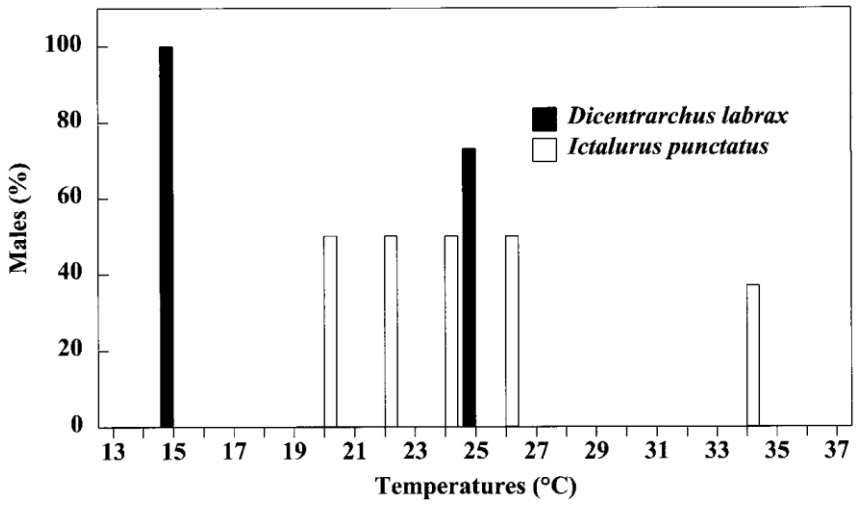
3. Protogenous hermaphrodite คือ ปลาเป็นเพศเมียแล้วเปลี่ยนเพศเป็นเพศผู้ โดยเมื่อปลามีอายุหรือขนาดเริ่มถึงวัยเจริญพันธุ์ ปลาจะเป็นเพศเมียก่อนจนกระทั่งเวลาผ่านไประยะหนึ่ง เมื่อปลามีอายุมากขึ้นหรือขนาดใหญ่ขึ้นจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้ โดยที่ระยะเวลาในการเปลี่ยนจากเพศเมียกลายเป็นนเพศผู้ในสภาพธรรมชาตินั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิดของอาหารที่ปลาได้รับ สภาพแวดล้อม หรือสังคม ของกลุ่มประชากรปลาในขณะนั้น เป็นต้น ปลาที่เป็น protogynous hermaphrodite ได้แก่ *Epinephelus fuscoguttatus* เป็นปลาในครอบครัว Serranidae เมื่อปลาเพศเมียตาย ปลาเพศผู้จะพัฒนาเป็นปลาเพศเมียแทน และปลาที่เด่นที่สุดในฝูงจะพัฒนาไปเป็นเพศผู้ (Pandian and Sheela, 1995)

การเปลี่ยนเพศปลา

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิยมใช้การควบคุมเพศปลาให้มีเพศใดเพศหนึ่ง ซึ่งมีหลายเหตุผลเช่น ต้องการจำนวนปลาที่มีเพศตามความต้องการของตลาด ยับยั้งการสืบพันธ์ที่มากเกินไปในบ่อเพาะเลี้ยง (Singh 2013; Strüssmann et al. 2005) การควบคุมเพศปลาจึงนิยมใช้เทคนิคการเปลี่ยนเพศปลา ซึ่งการเปลี่ยนเพศปลานอกจากเกิดขึ้นเองในธรรมชาติได้แล้ว แต่ปัจจุบันนี้การเปลี่ยนเพศสามารถทำได้ในปลาหลายชนิดซึ่งใช้เทคนิคที่แตกต่างกันเช่น ใช้ปัจจัยต่างๆในสิ่งแวดล้อมเช่นอุณหภูมิ pH ของน้ำและความหนาแน่น การให้สาร neuropeptides หรือฮอร์โมน แป็นต้น (Banh et al., 2005)

<u>การใช้อุณหภูมิกระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลา</u>

การใช้อุณหภูมิเพื่อเปลี่ยนเพศปลาส่วนมากทำได้สำเร็จในปลาที่แยกเพศ แต่พบว่าไม่สามารถเปลี่ยนเพศปลาให้เป็นเพศใดเพศหนึ่งได้ 100% เช่นปลา *D. labrax* ใช้อุณหภูมิ 20 °C และ 15 °C สามารถเปลี่ยนเป็นปลาเพศผู้ 73% และปลาเพศเมีย 77% ตามลำดับ (Socorro et al., 2007) การพาะเลี้ยงปลา *Hoplosternum littorale*, *P. lucida* และ *P. melanogaster* เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจำนวนปลาเพศผู้เพิ่มและจำนวนปลาเพศเมียลดลง และการใช้อุณหภูมิที่สูงมากกว่าอุณหภูมิที่ใช้เลี้ยงปลา *Patagonian* ตามปกติ สามารถกระตุ้นให้ปลาให้เป็นเพศผู้ (Karube, et al., 2007) แต่อุณหภูมิที่ต่ำ 15°C สามารถกระตุ้นปลา *D.labrax* ให้เป็นเพศผู้ (Blazquez et al., 1998) หรืออุณหภูมิที่ต่ำกว่า 27°C สามารถกระตุ้นปลา *Ictalarus punctatus* ให้เป็นเพศผู้ (Patino et al., 1996)



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและการเปลี่ยนเพศปลา

ระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) กระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลา

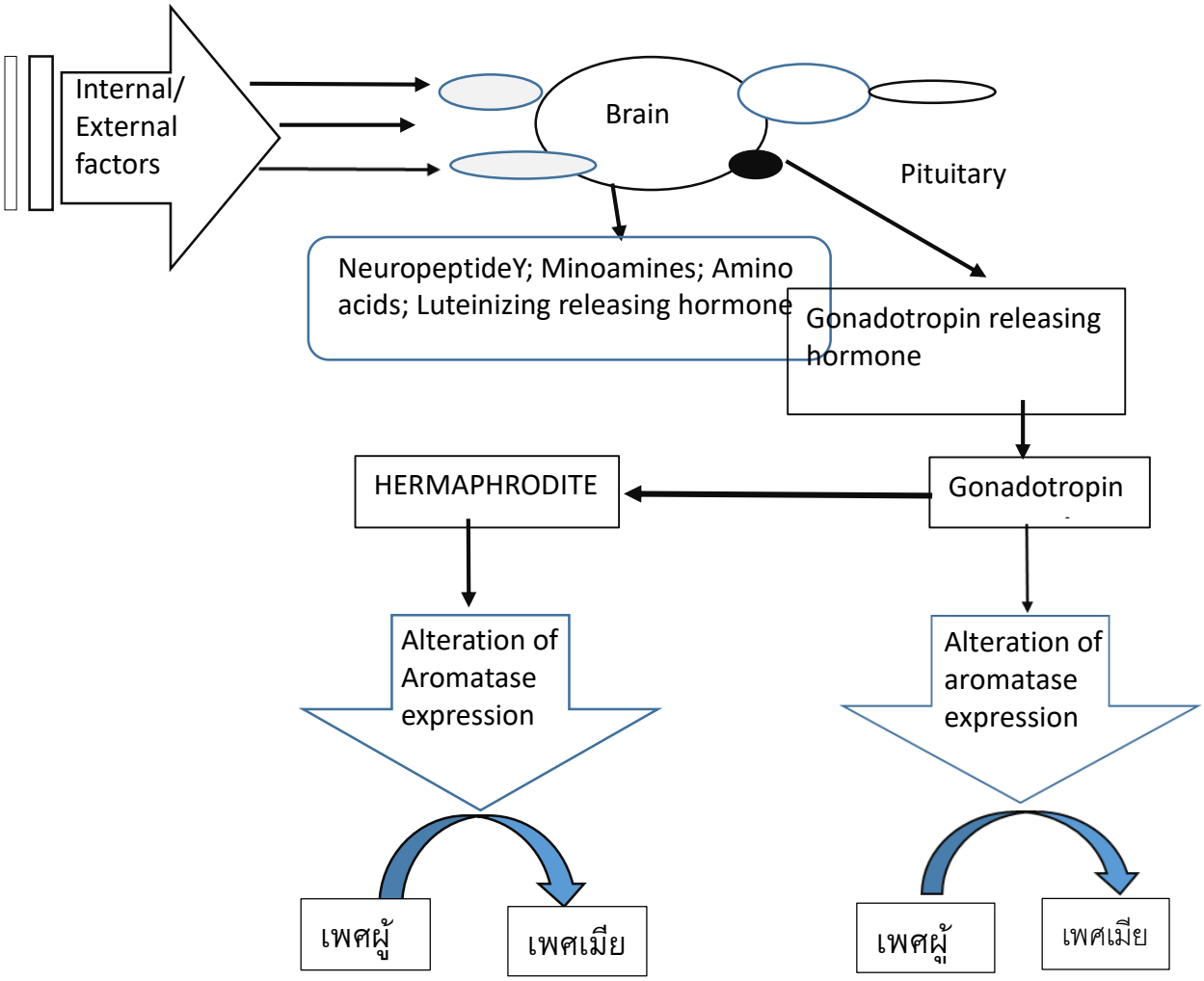
ผลของระบบประสาทในการกระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลในกลุ่มปลาที่มีเพศแยก

งานวิจัยศึกษาผลของระบบประสาทในการกระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลในกลุ่มปลาที่มีเพศแยกมีน้อยมาก โดยงานวิจัยส่วนมากศึกษา hypothalamo-pituitary system โดยเน้นศึกษาผล gonadotropin-releasing hormone (GnRH) และ gonadotropin hormones (GTHs) การใช้สารที่สกัดจากต่อมใต้สมองสามารถกระตุ้นปลาแซนมอลตัวอ่อนอายุ 4 เดือนทำให้เกิด sex differentiation เร็วขึ้น เช่นมีจำนวน primordial germ cells (PGC) มากขึ้น ขนาดโกนาดใหญ่ขึ้นและฮอร์โมน gonadotropin hormones ในเลือดเพิ่มขึ้น (Van Winkoop et al., 1994) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยพบว่า growth hormone มีผลต่อกระบวนการ sex differentiation โดย growth hormone มีผลควบคุมการสร้าง steroid hormone ใน gonad ของปลาซัลมอน

ผลของระบบประสาทในการกระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลาในกลุ่มปลาที่มี 2 เพศ

Neuroendocrine ควบคุมการแปลงเพศปลาโดยผ่านสมองส่วน hypothalamus (ภาพที่ 1)จากงานวิจัยของ Tang และคณะ (1974) ใช้ฮอร์โมน luteinizing hormone (LH) ที่สร้างจากต่อมใต้สมองส่วนหน้าของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมกระตุ้นการเปลี่ยนเพศปลาไหลนา (*Monopterus albus*) นอกจากนี้ยังพบว่าการฉีด human chorionic gonadotropin (hCG) สามารถกระตุ้นปลา *Thalassoma bifasciatum* เพศเมียเปลี่ยนเป็นปลาเพศผู้ (Koulish and Kramer 1989) และปลาชนิดนี้เมื่อฉีดด้วย GnRH analogue (GnRH-A) ร่วมกับ domperidone (dopamine receptors

antagonist) สามารถเปลี่ยนเพศปลาได้ 92% โดยเพศผู้เปลี่ยนเป็นเพศเมีย เมื่อให้สารดังกล่าวกับปลานาน 6 สัปดาห์ (Kramer et al., 199



ภาพที่ 2 วิถี neuroendocrine- gonadal axis ในการควบคุมการแปลงเพศปลาในปลาที่มี 2 เพศ

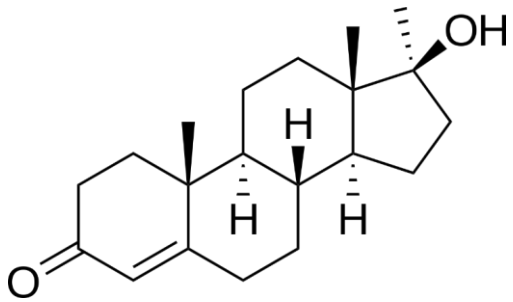
<u>การใช้ฮอร์โมนกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนเพศปลา</u>

การใช้ฮอร์โมนกระตุ้นปลาให้เกิดการเปลี่ยนเพศ ซึ่งประสบผลสำเร็จแล้วในปลามากกว่า 47 ชนิดในปลาที่มีเพศแยก และปลาที่มี 2 เพศในตัวเดียว (hermaphrodites) 34 ชนิด (Pandian & Sheela, 1995; Yamazaki, 1983) ฮอร์โมนที่ใช้มากเป็นกลุ่ม steroid hormones นอกจากนี้ยังมีการใช้สาร aromatase inhibitors เป็นต้น

1. การใช้ steroid hormones มีทั้ง steroid hormones ที่สกัดจากพืชในธรรมชาติ หรือ steroid hormones ที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งฮอร์โมนกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนปลาเพศเมียเป็นเพศผู้ หรือสามารถเปลี่ยนปลาเพศผู้เป็นเพศเมีย Yamamoto (1969) กล่าวว่าการใช้ steroid hormones เพื่อเปลี่ยนเพศปลาจะใช้ได้ผลดีควรใช้ฮอร์โมนกับปลาก่อนที่ gonad ของปลาเกิด differentiation

1.1 การใช้ steroid hormones เพื่อเปลี่ยนปลาเพศเมียเป็นปลาเพศผู้ steroid hormones ที่ใช้มีหลายชนิด ได้แก่ 17β- estradiol, estrone, estriol และ diethylstilbestrol เป็นต้น แต่งานวิจัยส่วนมากใช้17β- estradiol โดย Hunter et at. (1986) รายงานว่า 17 β-estradiol มีประสิทธิภาพดีมากในการเปลี่ยนเพศปลา coho salmon (*0. kisutch*) และปลา Chinook salmon (*0. tshawytscha*) จากเพศผู้เป็นเพศเมีย

1.2 การใช้ steroid hormones เพื่อเปลี่ยนปลาเพศผู้เป็นเพศเมีย ฮอร์โมนที่ใช้ได้แก่ 17α-methyltestosterone (MT), 11- ketotestosterone, androsterone, androstedione และ methyldehydrotestosterine (MDHT) MDHT เป็น non-aromatizable form ของ MT ซึ่ง MDHT ออกฤทธิ์ได้ดีกว่า MT 200 เท่า MDHT สามารถกระตุ้นปลา *O. tshawytscha* (Piferrer et al. 1993), Nile tilapia และ *O. niloticus* (Gale et al. 1999) เปลี่ยนปลาเพศเมียเป็นปลาเพศผู้ได้ถึง 91% ปัจจุบันนี้ฟาร์มปลานิยมใช้ฮอร์โมน MT ซึ่งเป็นฮอร์โมนสังเคราะห์เพื่อเปลี่ยนเพศปลาเพศเมียเป็นเพศผู้และสามารถเปลี่ยนเพศปลามากกว่า 25 ชนิดในวงค์ต่างๆดังนี้ วงค์ Salmonidae วงค์ Cichidae วงค์ Anabantidae วงค์ Poecilidae และวงค์ Ictaluridae โดย MT มีผลเพิ่มการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) และทำให้ระบบสืบพันธุ์เพศผู้พัฒนาดี มีผลทำให้ DMRT1 gene ซึ่งเป็นยีนควบคุมการเปลี่ยนเพศปลาจากเพศเมียเป็นเพศผู้และมีการแสดงออกมากขึ้น (Webster et al., 2017)



ภาพที่ 3 โครงสร้างฮอร์โมน methyltestosterone

นอกจากใช้ steroid hormones ปัจจุบันนี้ยังมีการใช้สาร aromatase inhibitors ได้แก่ letrozole, 1,4,6-androstatriene-3-17- dione (ATD), 3b-hydroxysteroid dehydrogenase (3bHSD) ATD สามารถเปลี่ยนเพศปลา *O.niloticus* จากเพศเมียเป็นผู้ทั้งหมด

Letrozole (LET) เป็นยา trizole ชนิดหนึ่ง (Smith, 1999; Seralini and Moslemi, 2001) ยาชนิดนี้สามารถแย่งจับกับ heme ใน cytochrome P450 aromatase จึงมีผลยับยั้งการสร้างฮอร์โมน estrogen (Wang et al., 2017) ปัจจุบันวงการแพทย์จึงนิยมใช้ยาชนิดนี้รักษามะเร็งเต้านมและมะเร็งมดลูกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Haynes et al., 2003; Howell et al., 2005) นอกจากนี้พบว่า LET ยังสามารถยับยั้งระบบต่อมไร้ท่อมีผลเปลี่ยนแปลงระบบสืบพันธุ์และพัฒนาการของปลา (Sonnenschein and Soto, 1998; Harries et al., 2000; Ana et al., 2016) โดย LET ยับยั้งการเจริญเติบโตของโอโอไซต์และลดฮอร์โมน vitellogenin ในเลือดของปลา medaka เพศเมียตัวโตเต็มวัย (Sun et al., 2007).) Shen (2015) ให้ letrozole ผสมอาหารโดยใช้ความเข้มข้นดังนี้ 20, 50 และ100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เลี้ยงลูกปลาอายุ 10 วันหลังจากฟักออกจากไข่ นาน 49 วันพบว่า letrozole สามารถเปลี่ยนเพศเมียเป็นเพศผู้ทุกความเข้มข้น (75.5%, 83.3% และ 75.0% ตามลำดับ)

<u>วิธีการใช้ฮอร์โมนเพื่อแปลงเพศปลา</u>

การใช้ฮอร์โมนเพื่อเปลี่ยนเพศปลามีหลายวิธีเช่น การให้อาหาร (Solar and Donaldson 1985) การละลายในน้ำ (Francis, 1992) การฉีดสารเข้ากล้ามเนื้อ (Shelton, 1986) เป็นต้น

1. การให้ฮอร์โมนโดยผสมกับอาหาร การให้ steroid hormones ส่วนมากใช้วิธีนี้ Nakamura (1975) สามารถใช้ MT ปริมาณ 50 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ผสมกับอาหาร โดยให้อาหารนาน 19 วัน สามารถเปลี่ยนปลา Mozambique tilapia และปลา *O. mossambicus* เป็นเพศผู้ 100% Simpson (1976) ให้ MT ปริมาณ 3 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ผสมกับอาหาร ให้อาหารนาน 90 วัน เปลี่ยนปลาซัลมอนเพศเมียเป็นเพศผู้ ได้ 100%

2. ละลายฮอร์โมนกับน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา ซึ่งให้ผลดีกว่าการให้โดยการผสมกับอาหาร ประมาณ 200-1000 เท่า โดยแช่ปลา *Oncorhynchus kisutch* ภายหลังฟักออกจากไข่ กับสารละลาย MT เป็นเวลา 2-8 ชั่วโมง นาน 1-3 สัปดาห์ สามารถเปลี่ยนปลาจากเพศเมียเป็นเพศผู้

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันการเพาะพันธุ์ฟาร์มปลาการ์ตูนส้มขาวในฟาร์มเพาะเลี้ยงประสบผลสำเร็จโดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เกิดจากการเพาะเลี้ยง แต่การพัฒนาของปลาการ์ตูนตั้งแต่ตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยต้องใช้เวลานานมากกว่า 1 ปี จึงจะได้พ่อแม่พันธุ์ที่จะผสมพันธุ์ได้ เมื่อแรกเกิดปลาการ์ตูนมีอวัยวะสืบพันธุ์ที่ยังไม่มีการพัฒนาเป็นเพศผู้ หรือเพศเมีย (undifferentiated gonad) การเปลี่ยนเป็นเพศเมีย (ovarian differentiation) ใช้เวลานาน 3 เดือน แต่การเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (testicular differentiation) ใช้เวลานานมากกว่า 7 เดือน (Miura, 2008) ซึ่งแสดงว่าการที่จะได้พ่อพันธุ์ปลาต้องใช้เวลานานกว่าแม่พันธุ์ปลา จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเทคนิคการแปลงเพศมาใช้เพื่อกระตุ้นปลาการ์ตูนให้เปลี่ยนเป็นเพศผู้เร็วขึ้นด้วยการกระตุ้น โดยใช้ฮอร์โมน 17α-methyltestosterone และสาร letrozole ซึ่งเป็นฮอร์โมนและ

สารภายนอกร่างกายปลาและถูกใช้ในการแปลงเพศปลาเพศเมียเป็นเพศผู้ได้สำเร็จในปลาหลายชนิด งานวิจัยครั้งนี้จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนาการจัดการผสมพันธุ์ปลา นอกจากนี้ผลงานการวิจัยครั้งนี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้และเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาประสิทธิภาพการปรับปรุงพ่อแม่พันธุ์สำหรับการเพาะเลี้ยงในกลุ่มปลาการ์ตูน ซึ่งจะช่วยในเรื่องการค้าทั้งภายในและภายนอกประเทศที่มีความต้องการปลาการ์ตูนเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งลดการจับปลาจากแหล่งธรรมชาติซึ่งเป็นการอนุรักษ์พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนในธรรมชาติ

1.3 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของความเข้มข้นของ letrozole ระดับต่างๆที่มีผลต่อโครงสร้างของ gonad และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการแปลงเพศ

2. ศึกษาผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน 17α-methyltestosterone (MT) ระดับต่างๆที่มีผลต่อโครงสร้างของ gonad และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการแปลงเพศ

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

- ศึกษาเปรียบเทียบจุลกายวิภาคเนื้อเยื่อของ gonad ปลาการ์ตูนส้มขาววัยอ่อนได้รับ letrozole และฮอร์โมน methyl testosterone ความเข้มข้นต่างๆ กับไม่ได้รับสาร
- ศึกษาจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนที่ได้รับ letrozole 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

15.1 ทำให้ได้พ่อพันธุ์ปลาการ์ตูนส้มขาวจำนวนมากขึ้น

15.2 ทำให้มีความเข้าใจกลไกการควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในปลาการ์ตูน

15.3 สามารถนำเทคนิคและความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการแปลงเพศปลาในปลาการ์ตูนชนิดอื่น

บทที่ 2
วิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างปลา

ปลาการ์ตูนส้มขาวที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ ซื้อจากสถาบันวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา นำมาเลี้ยงที่โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

1.1 การเตรียมอาหารที่ผสมกับฮอร์โมน

โดยละลาย 17α-methyltestosterone หรือ letrozole ปริมาณที่แตกต่างกันใน 95% ethanol แล้วผสมกับอาหารเม็ด (ethanol 4 มิลลิลิตร ต่ออาหาร 10 กรัม) แล้วทำการระเหย ethanol ที่ 40 ^{o}C เป็นเวลานาน 4 ชั่วโมง เก็บอาหารที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

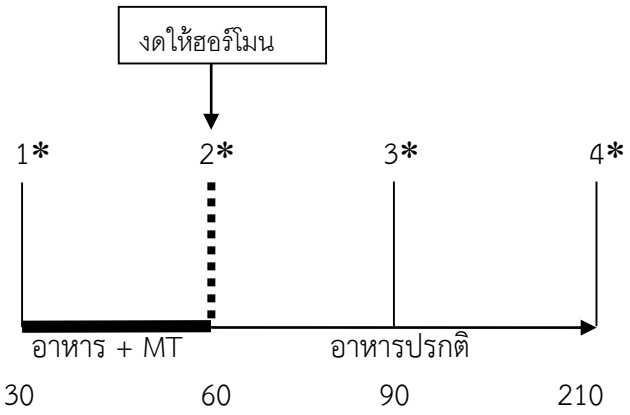
1.2 การวิเคราะห์โครงสร้าง gonads ของปลาการ์ตูนส้มขาวเมื่อได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้นต่างๆและประเมินผล

1.2.1 แบ่งปลาเป็น 2 กลุ่มดังนี้

กลุ่มควบคุม เลี้ยงปลาจำนวน 20 ตัว และให้อาหารที่ไม่มีฮอร์โมนผสมวันละ 2 ครั้ง

กลุ่มทดลอง เลี้ยงปลาจนกระทั่งปลามีอายุ 30 วัน แบ่งปลาเป็น 3 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มมีปลาจำนวน 20 ตัว และแต่ละกลุ่มให้อาหารที่มีฮอร์โมน 17α-methyltestosterone ผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 50 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อาหาร) เป็นเวลานาน 30 วัน โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้ง

เมื่อปลาอายุครบ 60, 90 วัน และ 210 วัน จับปลาจำนวน 5 ตัวในแต่ละช่วงอายุที่กำหนดทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ทำการสลบปลาด้วยสาร MS222 แล้วนำปลามาชั่งน้ำหนักปลาและวัดความยาว จากนั้นตัดเนื้อเยื่อ gonad เพื่อไปศึกษาในขั้นตอนที่ 1.2.2 และ 1.2.3



* เก็บเนื้อเยื่อทำ histology และ immunocytochemistry

ภาพที่ 4 แผนภาพการทดลองเรื่องการให้ methyltesterone

1.2.2 การศึกษา Histology

นำเนื้อเยื่อ gonad แช่ในละลาย Bouin นาน 12 ชั่วโมง เปลี่ยนตัวอย่างเนื้อเยื่อใส่ 70% ethanol เปลี่ยนจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสี แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกแล้วผ่านขั้นตอนการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (microtome) ให้ได้ section หนาชิ้นละ 5-6 ไมโครเมตร นำ sections ติดบนสไลด์ แล้วผ่านขั้นตอนเอา paraffin ออก และดึงน้ำเข้า จากนั้นนำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสี hematoxylin และ สี eosin

1.2.3 การศึกษาด้วยเทคนิค immunocytochemistry (streptavidin-biotin technique) เพื่อศึกษา primordial germ cells โดยใช้ anti-stella และ sertoli cells โดยใช้ anti-sox ทำตามขั้นตอนที่ 12.2จนได้ขั้นตอนการดึงน้ำออก นำสไลด์ที่ได้บ่มใน citrate buffer นาน 15 นาทีที่ 37 ^{o}C ทำการ block endogenous peroxidase ด้วย 0.3% H_2O_2 นาน 20 นาที จากนั้น block non-specific ด้วย 4% BSA นาน 1 ชั่วโมง แล้วบ่มใน rabbit anti-Stella หรือ rabbit anti-Sox9
ล้างสไลด์ด้วย PBS 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 5 นาที แล้วเติมสารละลาย biotin conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies นาน 30 นาที และ streptavidin biotin complex ที่อุณหภูมิห้อง แล้วบ่มในสารละลาย 3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride นานจนสังเกตเห็นสี แล้วจึงนำสไลด์ไปย้อมด้วยสี hematoxylin

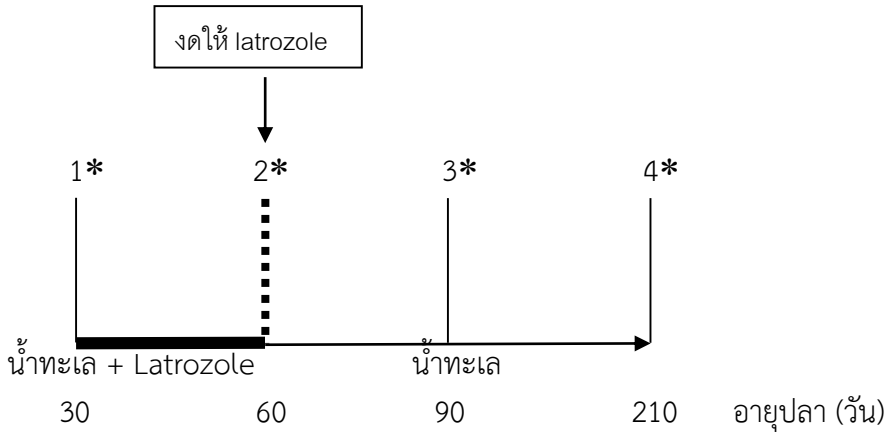
1.3 การวิเคราะห์โครงสร้าง gonads ของปลาการ์ตูนส้มขาวเมื่อได้รับ lactrozole ที่ความเข้มข้นต่างๆ และประเมินผล

1.3.1 แบ่งปลาเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มควบคุม เลี้ยงปลาจำนวน 20 ตัว ในน้ำทะเลที่ไม่มีสาร lactrozole

กลุ่มทดลอง เลี้ยงปลาจนกระทั่งปลามีอายุ 30 วัน แบ่งปลาเป็น 3 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มใช้ปลาจำนวน 20 ตัว จากนั้นจะเลี้ยงปลาในน้ำทะเลที่มีสาร lactrozole ผสม ความเข้มข้นดังนี้ 50 และ 100 และ mg/kg (น้ำหนักตัวปลา) เป็นเวลานาน 30 วัน ให้อาหารปลาวันละ 2 ครั้ง

เมื่อปลาอายุครบ 30, 60, 90 วัน และ 210 วัน จับปลาจำนวน 5 ตัวในแต่ละช่วงอายุตามที่กำหนด ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ทำการสลบปลา ชั่งน้ำหนักปลาและวัดความยาว จากนั้นตัดเนื้อเยื่อ gonad เพื่อไปศึกษาตามขั้นตอนที่ 1.2.2 และ 1.2.3



* เก็บเนื้อเยื่อทำ histology และ immunocytochemistry

ภาพที่ 5 แผนภาพการทดลองเรื่อง การให้ latrozole

1.4 การศึกษาจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับฮอร์โมน letrozole 100 mg/kg นาน 210 วัน

ตัดเนื้อเยื่อ gonad ให้มีขนาด 0.3-0.4 ลูกบาศก์เซนตริเมตร แล้วแช่เนื้อเยื่อในสารละลาย 2% glutaraldehyde และ 4 % formaldehyde ในสารละลาน 0.2 M phosphate buffer (pH7.8) ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมงแล้วล้างด้วย 0.1M PBS 3 ครั้ง จากนั้น post fixed ในสารละลาย 0.2% osmium นาน 1ชั่วโมง ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลจากความเข้มข้น 50%, 70%, 80%, 90% และ 100% ขั้นตอนละ 30 นาที ฝังเนื้อเยื่อใน spur resin ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Cárdenas et al. 2008 ตัดเนื้อเยื่อให้ได้ ultrathin sections บาง 70-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Reichert ultramicrotome ย้อม ultrathin sections ด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate นำ ultrathin sections ที่เตรียมได้ไปศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆ โดยใช้กล้องอิเล็คตรอนแบบส่องผ่าน Philips TECHNAI 20 และบันทึกภาพ

หมายเหตุ 1.4 ทำเพิ่ม ไม่มีในข้อเสนองานวิจัย

บทที่ 3
ผลการทดลอง

1. ผลของ letrozole และะอัตราการอดของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 60 วัน

ตัวชี้วัด	กลุ่มควบคุม (มิลลิกรัม)	กลุ่มทดลอง	
		Letrozole (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)	Letrozole (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)
น้ำหนักเริ่มต้น	11.51 ± 1.25	11.42 ±1.31	12.02 ± 1.38
น้ำหนักสุดท้าย	13.05 ± 1.43	12.02 ± 1.56	10 ± 0.89
อัตราการอยู่รอด (%)	95	60	50

2. ผลของ letrozole และอัตราการอดของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 90 วัน

ตัวชี้วัด	กลุ่มควบคุม (มิลลิกรัม)	กลุ่มทดลอง (มิลลิกรัม)	
		Letrozole (50 มิ มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)	Letrozole (100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม อาหาร)
น้ำหนักเริ่มต้น	11.51 ± 1.25	11.42 ±1.31	12.02 ± 1.38
น้ำหนักสุดท้าย	23.05 ± 1.61	19.02 ± 1.65	15 ± 0.76
อัตราการอยู่รอด (%)	95	25	20

3. ผลของ letrozole และอัตราการอดของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 210 วัน

ตัวชี้วัด	กลุ่มควบคุม (มิลลิกรัม)	กลุ่มทดลอง (มิลลิกรัม)	
		Letrozole (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)	Letrozole (100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)
น้ำหนักเริ่มต้น	11.51 ± 1.25	11.42 ±1.31	12.02 ± 1.38
น้ำหนักสุดท้าย	32.76 ± 1.98	20.02 ± 1.56	19 ± 1.23
อัตราการอยู่รอด (%)	90	20	15

4. ผลของ methyltestosterone และอัตราการอดของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 60 วัน

ตัวชี้วัด	กลุ่มควบคุม (มิลลิกรัม)	กลุ่มทดลอง (มิลลิกรัม)	
		methyltestosterone (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)	methyltestosterone (100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม อาหาร)
น้ำหนักเริ่มต้น	12.32 ± 1.55	13.42 ±1.34	14.02 ± 1.30
น้ำหนักสุดท้าย	13.85 ± 1.43	14.02 ± 1.96	15 ± 1.89
อัตราการอยู่รอด (%)	100%	70	50

6. ผลของ methyltestosterone และอัตราการอดของปลาการ์ตูนส้มขาวอายุ 210 วัน

ตัวชี้วัด	กลุ่มควบคุม (มิลลิกรัม)	กลุ่มทดลอง (มิลลิกรัม)	
		methyltestosterone (50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม อาหาร)	methyltestosterone (100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัม อาหาร)
น้ำหนักเริ่มต้น	12.32 ± 1.55	13.42 ±1.34	14.02 ± 1.30
น้ำหนักสุดท้าย	19.85 ± 1.48	18.02 ± 1.26	17 ± 1.54
อัตราการอยู่รอด (%)	95	40	20

หมายเหตุ อาการปวยของปลาก่อนตาย ปลาบางตัวเริ่มเคลื่อนที่ในแนวดิ่ง หรือบางตัวเคลื่อนที่ช้าลงและหลบตามมุมตู้ เมื่อปลามีอาการดังกล่าว ปลาจะตายในวันต่อมา

ผลของ letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน 90 วัน และ 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศลูกปลาการ์ตูนส้มขาว

จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว โดยให้ปลานาน 60 วันพบว่า ไม่สามารถเปลี่ยนเพศปลา ปลามีเซลล์สืบพันธ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) เซลล์มีรูปร่างกลม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับไซโทพลาสซึม ภายในนิวเคลียสเห็นเส้นโครมาตินชัด และระยะ perinucleolus stage (OC2) เซลล์ระยะนี้มีรูปร่างกลมหรือรี นิวเคลียสกลม ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสจำนวนมาก อยู่ชิดขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ภาพที่ 6B) ซึ่งมีโครงสร้างของรังไข่คล้ายกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6A) แต่เมื่อให้ letrozole ความเข้บข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว นาน 90 วัน เริ่มพบ spermatocytes (SC) (ภาพที่ 6C) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ยังคงพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และระยะ perinucleolus stage (OC2) (ภาพที่ 6D) เมื่อให้ letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ความเข้มข้นเท่าเดิมแต่ให้นาน 210 วันพบ spermatozoa จำนวนมาก เซลล์มีขนาดเล็ก นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 3F) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6E)

ภาพที่ 6 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและได้รับ letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60,90 และ 210 วัน

(A) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole พบ ovarian cavity (OV) และ oogonium (OG) แบ่งเซลล์แบบไมโตซิส

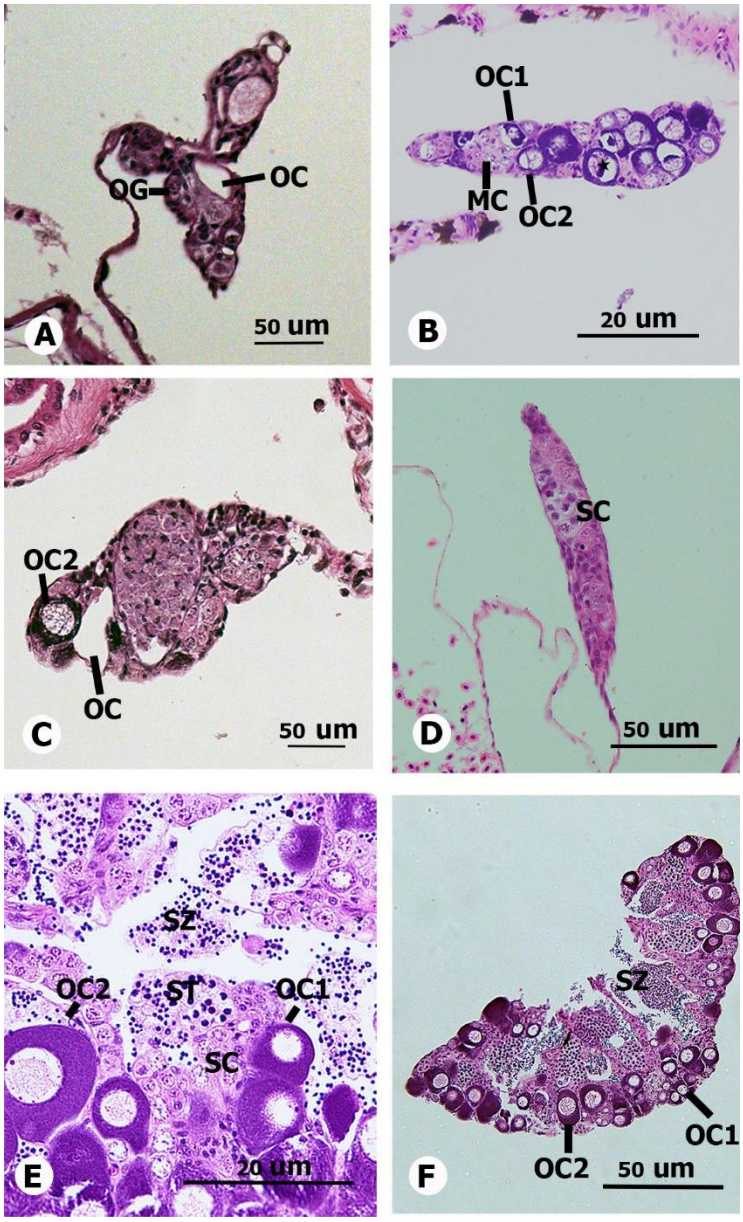
(B) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 30 วัน พบเซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส (mitotic cell) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และระยะ perinucleolus (OC2) แต่ไม่พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

(C) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole พบ ovarian cavity (OV) และโอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) แต่ไม่พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

(D) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน เริ่มพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะ spermatocyte (SC)

(E) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole แสดงลักษณะ 2 เพศ (bisexual) มีโอโอไซต์ที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่เช่น chromatin nucleolus oocyte (OC1) และโอโอไซต์ perinucleolus (OC2) แต่พบส่วนของ testicular tissue ที่พัฒนาเต็มที่ มีเซลล์ spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ)

(F) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน พบ spermatozoa (SZ) จำนวนมาก แต่ยังพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และระยะ perinucleolus (OC2)


OG
OC
50 um
A
OC1
MC
OC2
20 um
B
OC2
OC
50 um
C
SC
50 um
D
SZ
OC2
ST
QC1
SC
20 um
E
SZ
OC1
OC2
50 um
F

ผลของ letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน 90 วัน และ 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศลูกปลาการ์ตูนส้มขาว

จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่า letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) โดยให้ปลานาน 60 วันพบว่า ไม่สามารถเปลี่ยนเพศปลา ปลามีเซลล์สืบพันธ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) (ภาพที่ 7B) ซึ่งมีโครงสร้างของรังไข่คล้ายกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 7A) แต่เมื่อให้ letrozole ความเข้บข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 90 วัน เริ่มพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆดังนี้ spermatocytes (SC) spermatids (SD) และ spermatozoa (SZ) (ภาพที่ 7C) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ยังคงพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) (ภาพที่ 7D) เมื่อให้ methyl testosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) เท่าเดิมแต่ให้นาน 210 วันพบ spermatozoa ในช่องว่าง (lumen) แต่พบ atretic oocytes มีการสลายของเยื่อห้มนิวเคลียสและมีรวมกลุ่มของโครโมโซมในนิวเคลียส และมีรงควัตถุสีเหลือง (yellow pigment) เกิดขึ้นในโกนาด (gonad) (ภาพที่ 7F) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งพบเซลล์สืบพันธ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ไม่พบ atretic oocytes และรงควัตถุสีเหลือง (ภาพที่ 7E)

ภาพที่ 7 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและได้รับ letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60, 90 และ 210 วัน

(A) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole พบ ovarian tissue ที่โตไม่เต็มที่ จึงพบเฉพาะ chromatin nucleolus oocyte (OC1)

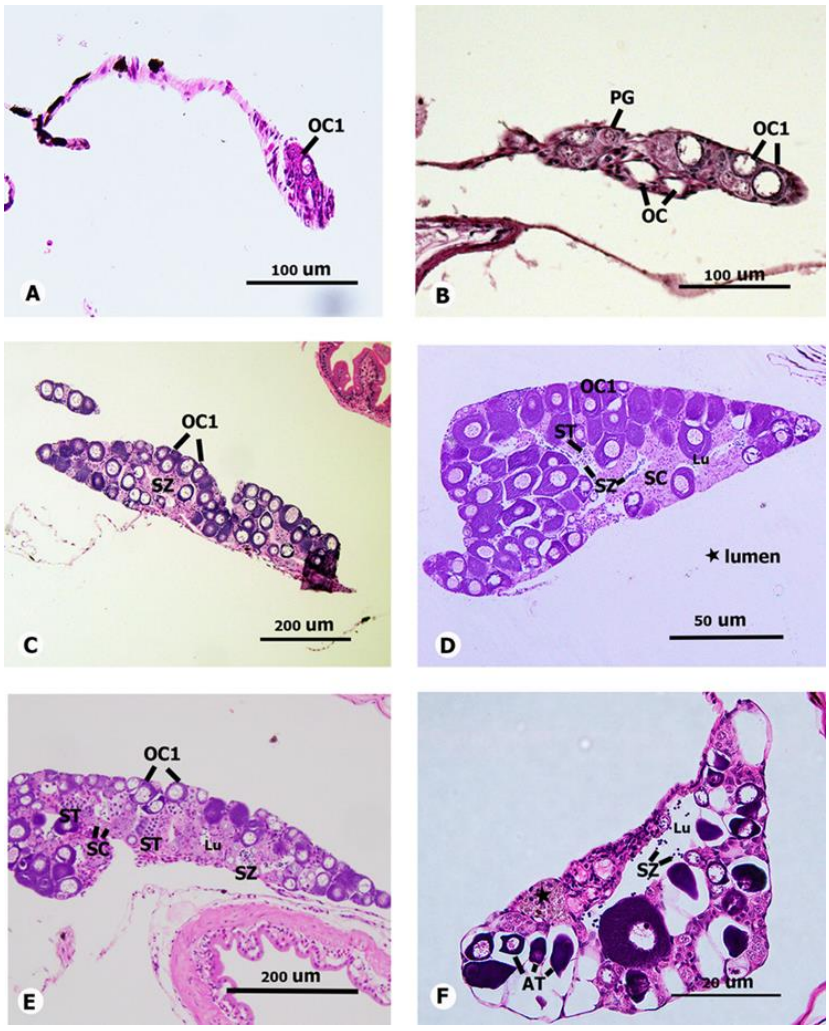
(B) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน พบ primordial germ cell (PG) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ ovarian cavity (OC)

(C) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole พบโอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ spermatozoa (SZ)

(D) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 90 วัน พบ testicular tissue โตเต็มที่ พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆเช่น spermatocyte (SC), spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ) พบ
มากใน lumen (Lu) แต่เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียพบเฉพาะ chromatin nucleolus oocyte (OC1)

(E) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน letrozole แสดงลักษณะ 2 เพศ (bisexual) มีโอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) บริเวณด้านนอกของรังไข่แต่พบส่วนของ testicular tissue ที่พัฒนาเต็มที่ ภายในแต่ละ cyst พบเซลล์ spermatocyte (SC), spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ)

(F) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน letrozole ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน พบ spermatozoa (SZ) ใน lumen (Lu) และพบ atretic oocyte จำนวนมาก


OC1
100 um
A
PG
OC1
OC
100 um
B
OC1
SZ
200 um
C
OC1
ST
SZ
SC
Lu
★ lumen
50 um
D
OC1
ST
SC
ST
Lu
SZ
200 um
E
Lu
SZ
AT
20 um
F

ผลของฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวให้นาน 60 วัน 210 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศลูกปลาปลาการ์ตูนส้มขาว

ผู้วิจัยกระตุ้นการเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนด้วยการผสมฮอร์โมน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) พบว่าวันที่ 60 หลังจากให้ฮอร์โมนพบว่ารังไข่มีการพัฒนาแต่ไม่สามารถแยก testicular tissue และ ovarian tissue (ภาพที่ 8A) แต่ gonad ของปลาที่ได้รับฮอร์โมน พบเซลล์สืบพันธ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ atretic oocyte ติดสีฮีมาทอกไซลีนเข้ม ยังพบรงควัตถุสีเหลืองภายในรังไข่ (ภาพที่ 8B) ปลาที่ได้รับฮอร์โมน 210 วัน พบ ovarian tissue และ testicular tissue โดย ovarian tissue มีเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะต่างๆ เช่น oogonium (OG), chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ atretic cells (AT) ส่วนบริเวณ testicular tissue พบ spermatozoa (SZ) และ spermatids (ST) (ภาพที่ 8D) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมพบเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ oogonium (OG) และระยะ perinucleolus (OC2) (ภาพที่ 8C)

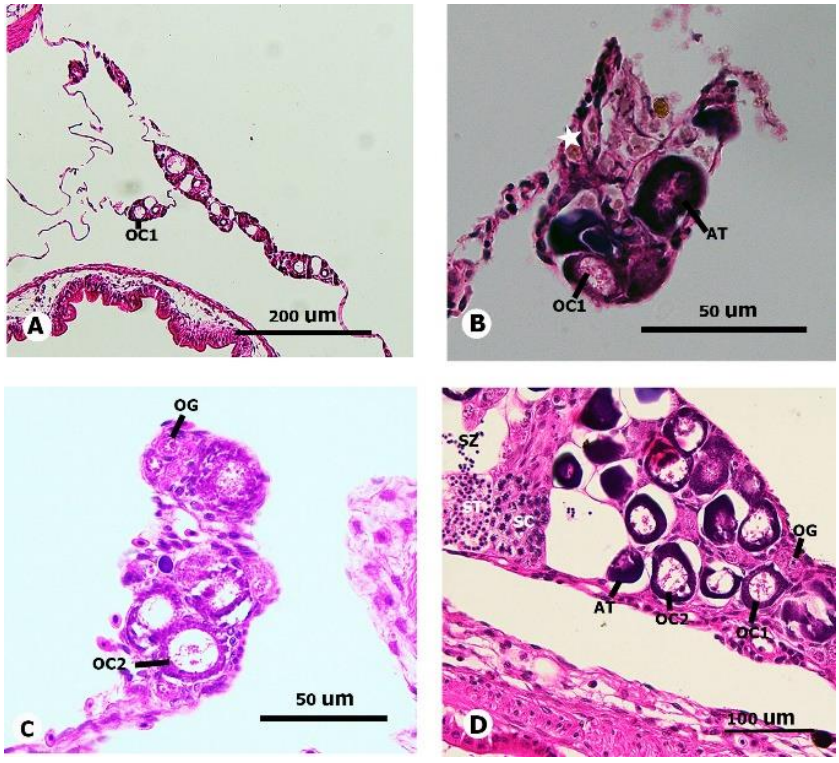
ภาพที่ 8 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและได้รับฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 และ 210 วัน

(A) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน methyltestosterone พบ ovarian tissue โตไม่เต็มที่ พบเฉพาะ chromatin nucleolus oocyte (OC1)

(B) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ atretic oocyte (AT)

(C) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โม methyltestosterone พบ oogonium (OG) และ ระยะ perinucleolus (OC2)

(D) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน พบ bisexual gonad มี testicular tissue พัฒนาเต็มที่ พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆเช่น spermatocyte (SC), spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ) พบมากใน lumen (Lu) แต่ยังพบ ovarian tissue มีเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย oogonium (OG), chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ perinucleolus oocyte (OC2) นอกจากนี้พบ atretic cell (AT)


OC1
200 um
A
AT
OC1
50 um
B
OG
OC2
50 um
C
SZ
ST
SC
OG
AT
OC2
OC1
100 um
D

ผลของฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน 90 วัน ต่อการเปลี่ยนเพศลูกปลาการ์ตูนส้มขาว

ผู้วิจัยกระตุ้นการเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนด้วยการผสมฮอร์โมน 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) กับอาหารพบว่ากลุ่มควบคุมปลาอายุ 60 วันพบว่ารังไข่เริ่มมีการพัฒนา พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) (ภาพที่ 9A) แต่ปลาที่ได้รับฮอร์โมน methyltestosterone พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียสูญเสียรูปร่างและเยื่อหุ้มนิวเคลียสสลาย (AT) (ภาพที่ 9B) gonad ของปลากลุ่มทดลองได้รับ α- methyl testerone ความเข้มข้นเท่าเดิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) แต่ให้นาน 210 วัน พบว่า พบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และระยะ perinucleolus stage (OC2) และพบ atretic cells (AT) จำนวนมาก และพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จำนวนมากใน lumen (ภาพที่ 9D)) แตกต่างจาก gonad ของปลากลุ่มควบคุมแสดงเฉพาะลักษณะเพศเมีย มีเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ perinucleolus (OC2) (ภาพที่ 9C)

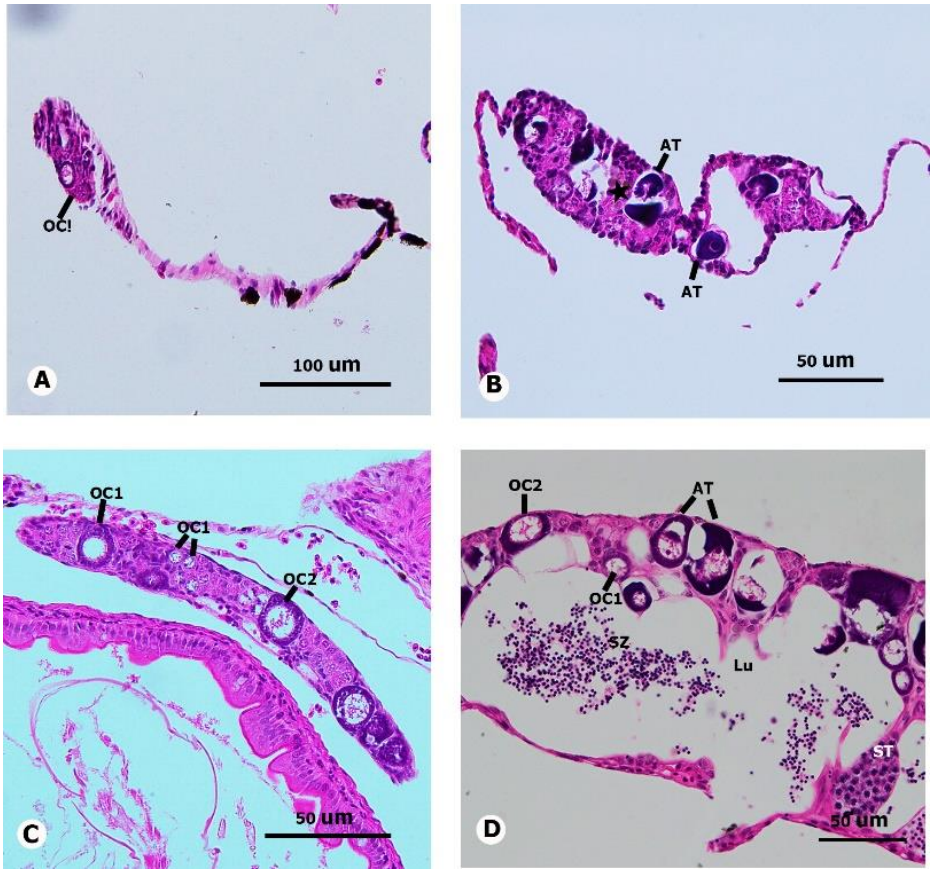
ภาพที่ 9 gonad ของปลาการ์ตูนเมื่อไม่ได้รับและได้รับฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 และ 210 วัน

(A) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน methyltestosterone พบ ovarian tissue โตไม่เต็มที่ พบเฉพาะ chromatin nucleolus oocyte (OC1)

(B) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน methyltestosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 60 วัน พบ atretic oocyte (AT) จำนวนมาก

(C) gonad ของลูกปลา กลุ่มควบคุมไม่ได้รับฮอร์โมน methyltestosterone พบเฉพาะ ovarian tissue มีเซลล์ระยะต่างๆดังนี้ ระยะ chromatin nucleolus (OC1)ระยะ perinucleolus (OC2)

(D) gonad ของลูกปลา กลุ่มทดลองได้รับฮอร์โมน methyltestosteron ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน พบ bisexual gonad มี testicular tissue พัฒนาเต็มที่ พบ spermatozoa (SZ) หนาแน่นใน lumen (Lu) แต่ยังพบเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย chromatin nucleolus oocyte (OC1) และ perinucleolus oocyte (OC2) นอกจากนี้พบ atretic cell (AT) จำนวนมาก


OC!
100 um
A
AT
AT
50 um
B
OC1
OC1
OC2
50 um
C
OC2
AT
OC1
SZ
Lu
ST
50 um
D

การศึกษาจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ letrozole 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน

testicular tissue มีเซลล์สืบพันธ์ระยะต่างๆ เช่น เซลล์ระยะ primary spermatocyte เซลล์มีรูปร่างรี นิวเคลียส (N) มีรูปร่างรีและมี heterochromatin (HC) จับเป็นก้อนใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียส ภายในไซโทพลาสซึมพบไมโทคอนเดรีย (MT) (ภาพที่ 10A,B) เซลล์ระยะ spermatid เซลล์มีรูปร่างรี นิวเคลียสรูปร่างรีและภายในนิวเคลียส (N) มีการกระจายของโครมาตินอย่างสม่ำเสมอ ติดสีเข้ม ไม่มี acrosome พบ centrioles 2 อัน คือ proximal centriole (PC) และ distal centriole (DC) โดยพบ distal centriole ตรงกลางของนิวเคลียสใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส สร้างเป็น flagellum (F) พบไมโทคอนเดรียด้านหลังของนิวเคลียส มีไซโทพลาสซึมจำนวนมาก (ภาพที่ 10C) spermatozoa มีส่วนหัว และ mid piece ขนาดเล็ก proximal centriole ตั้งฉากกับ distal centriole ไมโทคอนเดรีย 4 อัน ล้อมรอบ flagellum มี flagellum ยาว (ภาพที่ 10D) ซึ่งมีการจัดเรียงตัวของmicrotubule เป็น 9+2

ภาพที่ 10 จุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ letrozole 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อาหาร) นาน 210 วัน

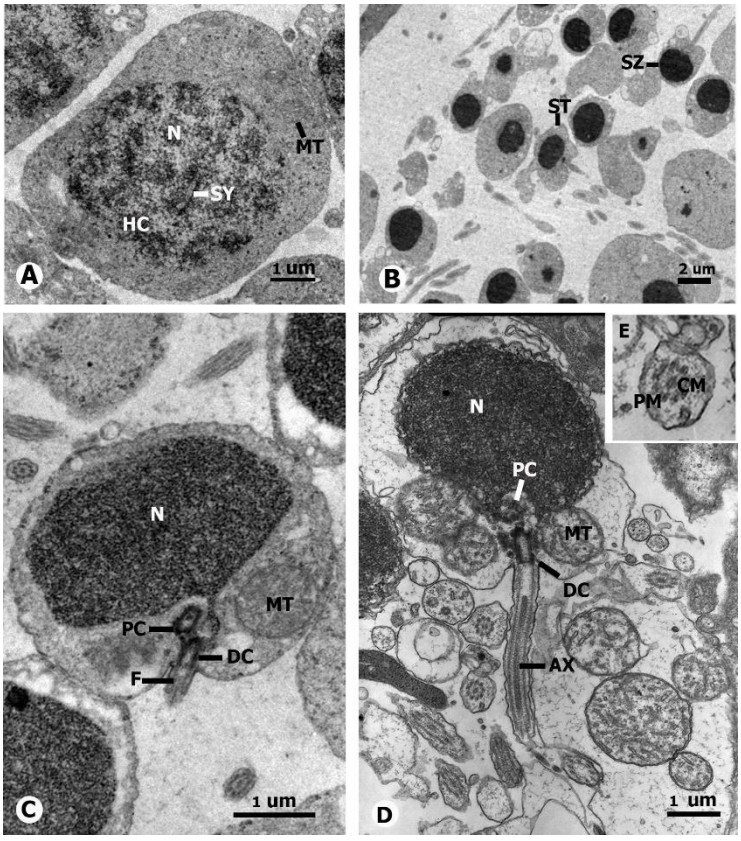
(A) เซลล์ระยะ primary spermatocyte มีนิวเคลียส (N) ขนาดใหญ่ พบ heterochromatin (HC) และ synaptonemal complex (SY) ภายในนิวเคลียส ภายในไซโทพลาสซึมมีไมโทคอนเดรีย (MT) จำนวนมาก

(B) ภาพกำลังขยายต่ำของ spermatozoa (SP) และ spermatids (ST)

(C) เซลล์ระยะ spermatid บริเวณ midpiece ใต้นิวเคลียส (N) พบ proximal tubule 1 แท่ง และ distal centriolar (DC) มี flagellum (F) สั้น มีไมโทคอนเดรีย (MT) ด้านหลังนิวเคลียส

(D) เซลล์ระยะ spermatozoa มีนิวเคลียสรูปไข่ (N) มีนิวเคลียสติดสีเข้ม ไม่มี acrosome proximal tubule 1 แท่ง distal centriolar (DC) 1 แท่งและไมโทคอนเดรีย (MT) บริเวณ midpiece

(E) หางของ sperm มี flagellum axoneme 1 เส้น มี microtubules เรียงตัว 9+2 (microtubule 2 ท่อ จำนวน 9 ชุดอยู่รอบนอก (PM) และ microtubules จำนวน 1 คู่ตรงกลาง (CM)


A
N
MT
SY
HC
1 um
B
SZ
ST
2 um
C
N
MT
PC
DC
F
1 um
D
N
PC
MT
DC
AX
1 um
E
PM
CM

บทที่ 4

อภิปรายผลการทดลอง

letrozole สามารถกระตุ้นการพัฒนาของอัณฑะในสัตว์หลายชนิดเช่น จิ้งเหลน (*Podarcis sicula*) (Cardone et al., 2002) เต่า (Emys orbicularis) (Belatd, et al., 2001) โดยมีผลทำให้จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆและสเปริม์เพิ่มขึ้น ปัจจุบันนี้จึงเริ่มมีงานวิจัยใช้ letrozole เพื่อเปลี่ยนปลาเพศเมียให้เป็นปลาเพศผู้ในปลาหลายชนิด ดังเช่น ให้ letrozole ความเข้มข้น 100-200 mg/kg ผสมกับอาหาร นาน 30 วันกับปลา *O. mossambicus* พบว่าสามารถเปลี่ยนเพศเมียเป็นเพศผู้ 100% ซึ่งให้ผลคล้ายกับผลในปลาชนิดอื่นเช่นปลา *Pelteobagrus fulvidraco* ปลา *Lepomis macrochiru*, ปลา *Epinephelus akaara* และปลา *Oryzias latipes* (Basavaraja et al., 2012; Gao et al., 2010; Li et al., 2005; Sun et al., 2007) ปลา Lepomis macrochirus (Gao et al. 2010 และปลา *O*. niloticus (Kwon et el. 2000) และปลา Epinephilus akkaara (Li, Liu and Lin, 2005) เป็นต้น

ปลาการ์ตูนส้มขาวที่ได้รับ letrozole มีจำนวนสเปริม์มากขึ้น แสดงว่า letrozole สามารถกระตุ้นการเกิด differentiation และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ แต่ยับยั้งการพัฒนาของรังไข่และเพิ่ม atretic oocytes ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Signth et al., 2014 และ Singh et al., 2015 ซึ่ง letrozole มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการเกิด gonad differentiation และพัฒนาการของรังไข่ เช่นยีน Cyp19A ซึ่งแสดงออกในรังไข่และยีน Cyp19B ที่แสดงออกในสมอง (Villeneuve et al., 2006; Lyssimachou et al., 2006) การแสดงออกของยีนทั้ง 2 ชนิดลดลงขึ้นกับความเข้มข้นของ letrozoe ซึ่งเอนไซม์ Cyp19 aromatase มีผลลดอัตราการสังเคราะห์ฮอร์โมนอีสโทรเจน (Singh, A. K. 2013; Singh and Prakash, 2014) การทดลองครั้งนี้พบว่าจำนวนปลาตายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการให้ letrozole นานมากขึ้น อาจเป็นเพราะ letrozole มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของปลาเช่น เมทาบอลิซึมของโปรตีนและไขมัน ค่า gonado–somatic index (GSI) (Li et al., 2006; Sathyanarayana Rao et al. 1984; Lone and Matty (1980)) นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองและอาจทำให้ปลาตายนอกจากความเข้มข้นของ letrozole แล้วอาจจะเกิดจากปลาตัวอ่อนได้รับอาหารไม่เหมาะสมและไม่เพียงพอ (Person et al., 1993; Finn and Kapoor, 2007; Sales and Janssens, 2003)

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาตามฟาร์ม นิยมใช้ฮอร์โมน methyl testosterone เปลี่ยนเพศปลาให้ได้เฉพาะปลาตัวผู้ ซึ่งสามารถทำสำเร็จในปลาหลายชนิดเช่น *O. niloticus* (El-Greisy and El-Gamal, 2012) ปลา *Pelteobagrus fulvidraco* (Shen et al., 2015) และปลา *O. mykiss* (Kuzminski and Dobosz, 2010) เป็นต้น methyl testosterone สามารถกระตุ้นให้ปลาการ์ตูนส้มขาวโตเต็มวัยให้สเปริม์มากขึ้นได้ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับในปลา *O. niloticus* ที่ได้รับอาหารที่ผสม methyl testosterone ความเข้มข้น 60 mg/ kg นาน 1 ปี (El-Greisy and El-Gamal, 2012) การใช้ฮอร์โมน methyl

testosterone เปลี่ยนเพศปลาจะประสพผลสำเร็จขึ้นกับความเข้มข้นของฮอร์โมนหรือระยะเวลาในการให้ฮอร์โมนหรือการละลายฮอรโมนในสารละลาย (Pandian and Varadaraj,1990) ฮอร์โมน methy testosterone นอกจากทำให้เกิดการ differentiation ของ gonad ปลาแล้ว ยังมีผลต่อการตาย การทดลองครั้งนี้พบว่าเมื่อให้อาหารที่ผสมฮอร์โมน methyl testerone ที่มีความเข้มข้นมาก มีผลทำให้ปลาตายเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Tan-Fermin (1994) พบว่า น้ำหนักปลาและค่า gonadosomatic index (GSI) ลดลง เมื่อปลา *Epinephelus suillus* วัยอ่อนได้รับ methyl testosterone (Biswas et al., 2014) นอกจากนี้ความเข้มข้นของฮอร์โมน methyl testosterone มาก ยังมีผลต่อการเติบโตของปลา *Astyanax bimaculatus* ด้วย(Rivero-Wendt et al., 2013)

การศึกษาผลของ letrozole และ methyl testosterone ต่อการแสดงออกของโปรตีน anti-DMRT ได้ผลไม่ชัดเจนอาจเนื่องจากแอนติบอดีที่ใช้ครั้งนี้เป็นแอนติบอดีที่ผลิตในคน ไม่สามารถหาแอนติบอดีที่ผลิตในปลาได้

ผลของ letrozole ต่อโครงสร้างละเอียดของ testicular tissue และ spermatozoa ของปลาการ์ตูนส้มขาว เมื่อได้รับสาร letrozole 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมนาน 210 วัน พบว่า letrozole ความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีผลต่อโครงสร้างโดยละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆของปลาการ์ตูน ทั้ง primary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ระยะดังกล่าวมีโครงสร้างโดยละเอียดเหมือนที่พบใน gonad ของปลาการ์ตูน *A. frenatus* ซึ่งเป็นปลาจากธรรมชาติ (Nakamura et al, 1994) และ gonad ของปลา *A. ocellaris* ที่เพาะเลี้ยงโดยไม่ได้รับสารต่างๆ (Thongkukiatkul and Bhupradid, in process)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

5,1 การศึกษาผล letrozole การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยการอาหารผสม letrozole พบว่า ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อาหาร) ให้นาน 210 วัน มีผลกระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีค่าทางสถิติ

5.2 Letrozole ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม (อาหาร) ให้นาน 210 วัน ไม่มีผลต่อโครงสร้างโดยละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะ

5.3 ฮอร์โมน methyl testosterone ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนัก (อาหาร) นาน 100 วัน สามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ แต่มีผลทำให้กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียลดลง

ข้อเนอแนะ

5.4 ควรจะหาความเข้มข้นของ letrozole และฮอร์โมน methyl testosterone ที่เหมาะสม สามารถเปลี่ยนเพศปลาการ์ตูนเป็นเพศผู้ได้ 100% และทำให้ปลามีอัตราการรอดสูงสุด

5.5 ศึกษาผลของ letrozole และฮอร์โมน methyl testosterone ที่มีต่อ gonadal transcriptomes ในปลาการ์ตูนส้มขาว

เอกสารอ้างอิง

สุภาพร สุกสีเหลือง, 2534. *มีนวิทยา* พิมพ์ครั้งที่1 กรุงเทพฯ พิมพ์ดีไ

ราตรี สุขสุวรรณ์ และ เกียรติศักดิ์ เอี่ยนเล่ง, 2551. พฤติกรรมการปรับตัวของปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris,* Cuvier, 1830). เอกสารวิชาการฉบับที่ ๑๙ สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. หน้า 1-12.

อุ่นจิตร ปาติยเสวี. 2537. ศึกาพฤติกรรมการวางไข่และการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาว (False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris*) ใน: รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2537, กรมประมง, กรุงเทพ. หน้า 393-412.

Allen, G.R., 1974. The Anemonefish: Their classifications and biology. 2nd Edn., TRH Publication Inc., New Jersey, pp: 352.

Ana, L.Z., Sandra, M.M., Sofia, G.S., Rocha, E., Antonio A.F.F. and M.C. Ana, 2015. Zebrafish sex differentiation and gonad development after exposure to 17α-ethinylestradiol, fadrozole and their binary mixture: A stereological study. Aquat. Toxicol., 166: 83-95.

Basavaraja, N., Chandrashekhara, B.H. and M.A. Rather, 2012. Production of an all-male population of guppy, *Poecilia reticulate* (Schneider). Curr. Sci., 11:1151-1152.

Belaid, B, Richard- Mercier, N., Pieau, C. and D., Mirelli, 2001. Sex reversal and aromatase in the European Pond Turtle: treatment with Letrozole after the thermosensitive period for sex determination. J. of Exp. Zool., 290:490-497.

Biswas, A., Behera, S., Das, P., Meena, D, K. and B.K.Behera, B, K, 2014. Effect of methyl testosterone (17α-MT) on the phenotype, bioindices and gonads of adult male dwarf Gourami (*Colisa lalia*). Emir. J. Food Agric., 26: 459-464.

Bla´zquez M., Zanuy, S., Carillo, M. and F. Piferrer, 1998. Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 beta and 17 alpha-ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. Fish Physiol. Biochem., 18: 37 – 47.

Blazquez M., Zanuy S., Carillo M. and F. Piferrer, 1998. Effects of rearing temperature on sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). J. Exp. Zool.,281: 207–216.

Brusle-sicaradn, S.and D.R., Both, 1990. Protandric hermaphrodite peculiarities in *Amphiprion frenatus* Brevoort (Teleostei, Pomacentridae). J. Fish Bid. 36: 383-390.

Budd, A.M., Banh, Q.Q., Domingos, J.A. and D.R.Jerry, 2015. Sex control in fish: approaches, challenges and opportunities for aquaculture. J. Mar. Sci. Eng., 3: 329-355.

Cardone, A., Comitato, R., Bellini, L. and F. Angelini, 2002. Effects of the aromatase inhibitor fadrozole on plasma sex steroid secretion, spermatogenesis and epididymis morphology in the lizard, *Podarcis sicula*. Mol. Reprod. Dev., 63: 63–70.

Cárdenas, R., Chávez, M., González, J.L., Aley, P., Espinosa, J., and L.F. Jiménez-García, 2008. Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniforme: Atherinopsidae). Revista de biologia tropical, 56: 1371-1380.

Das, N.G., Al Mamun, F., Barua, P., Siddique, A.A., Chowdhury. and M.S.N. Chowdhur, 2010. survivality of mono-sex tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry using 17-methyltestosterone in a commercial hatchery of Chittagong, Bangladesh. J. Aquacult. Feed Sci. Nutr., 2: 16 -24.

El-Greisy , Z.A. and A.E. El-Gamal, 2002. Monosex production of tilapia, *Oreochromis niloticus* using different doses of 17a-methyltestosterone with respect to the degree of sex stability after one year of treatment. Egypt. J. Aquat. Res., 38: 59-66.

Eiras-Stofella, D. R., Gremski, W. and S.M. Kuligowski. 1993. The ultrastructure of the mullet *Mugil curema* Valenciennes (Teleostei, Mugilidae) spermatozoa. Rev. Brasil. Zool., 10: 618–619.

Estevez,G and Mendoza, M. 2010. Sexual determination and differentiation in teleost fish. Rev Fish Biol Fisheries. 20:101-121.

Finn, R.N. and B.G. Kapoor, 2007. Fish Larval Physiology, Science Publishers, New Hampshire.

Fricke, H and S. Fricke, 1977. Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. Nature, 266: 830-832.

Francis, R.C., 1992. Sexual lability in teleost developmental factor. Quart. Rev. Biol., 67:1-18.

Gale, W.L., M.S. Fitzpatrick, M. Lucero, W.M. Contreras-Sanchez, and C.B. Schreck, 1999. Masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus)* by immersion in androgens. Aquaculture., 178: 349-357.

Gao, Z.X., Wang, H.P., Wallat, G., Yao, H., Rapp, D., O'bryant, P., MacDonald and W.M. Wang, 2010. Effects of a nonsteroidal aromatase inhibitor on gonadal differentiation of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. Aquacult. Res., 41: 1282.

Harries, J.E., Runnalls, T., Hill, E., Harris, C.A., Maddix, S., Sumpter, J.P. and C.R.Tyler, 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (*Pimephales promelas*). Environ. Sci. Technol., 34: 3003-3011.

Haynes, B.P., Dowsett, M., Miller, W.R., Dixon, J.M. and A.S.Bhatnagar, 2003. The pharmacology of letrozole. J. Steroid Biochem., 87: 35-45.

Hostache, G., Pascal M. and C.Tessier, 1995. Influence de la tempe´rature d'incubation sur le rapport maˆle:femelle chez l'atipa, *Hoplosternum littorale* Hancock (1828). Can. J. Zool., 73: 1239–1246.

Howell, A., Cuzick, J., Baum, M., Buzdar, A., Dowsett, M., Forbes, J.F., Hoctin-Boes, G., Houghton, J., Locker, G.Y. and J.S.Tobias, 2005. Results of the ATAC (arimidex, tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. Lancet, 365: 60-62.

Hunter, G.A., Solar, I.I., Baker, I.J., and E.M.Donaldson, 1986. Feminization of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* and chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* by immersion of alevins in a solution of estradiol-17 β. Aquaculture, 53: 295–302.

Nakamura, M., Mariko, T., and Y. Nagahama, 1994. Ultrastructure and *in vitro* steroidogenesis of the gonads in the protandrous anemonefish *Amphiprion frenatus*. Jpn. J. Ichthyol. 41:47-56.

Karube, M., Farnandino, J.I., Strobl-Mazzulla, P., Strilssmann, C.A. Yoshizaki, G., Somoza, G.M., and R. Patino, 2007. Characterization and expression profile of the ovarian cytochrome P450 aromatase (cyp191A1) gene during thermolabile sex determine in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. J. Exp. Zoolo. Part A, 307: 625-636.

Komen, J., Yamashita, M. and Y. Nagahama, 1992. Testicular development induced by a Recessive mutation during gonadal differentiation of female common carp *Cyprinus carpio* L. Dev. Growth Differ., 34: 535 – 544.

Koulish, S. and C. R. Kramer, 1989. hCG induces sex reversal in *Thalassoma bifasciatum*, a protogynous fish. J. Cell. Biol., 107: 483a.

Kramer C.R., Caddell M.T. and L. Bubenheimer-Livolsi, 1993. sGnRH-A [(D-Arg^{6}. Pro^{9}. NEt)] LHRH in combination with domperidone induces gonad reversal in protaogynous fish, the bluchead wrasse, *Thalassoma bifasciatum*. J. Fish. Biol., 42: 185-195.

Kuzminski, H, and S. Dobosz, 2010. Effect of sex reversal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) using 17-methyltestosterone and 11-hydroxyandrostenedione. Arch. Pol. Fish., 18: 45-49.

Kwon J.Y., McAndrew B.J. and D.J. Penman, 2002. Treatment with an aromatase inhibitor suppresses high temperature feminization of genetic male (YY) Nile tilapia. J.Fish Biol., 60: 625-636.

Lee Y.D., Rho S., Chang Y.J. and H.J. Baek, 1996. Sex differentiation of the rockfish, *Sebastes schlegeli*. J. Korean Fish. Soc., 29: 44 – 50.

Li, G.L., Liu, X.C. and H.R. Lin, 2005. Aromatase inhibitor letrozole induces sex inversion in the protogynous red spotted grouper (*Epinephelus akaara*). Acta. Physiol. Sin., 57: 473-479.

Li, G. L., Liu, X. C., Zhang, Y., and H.R. Lin, 2006. Gonadal development, aromatase activity and P450 aromatase gene expression during sex inversion of protogynous red-spotted grouper *Epinephelus akaara* (Temminck and Schlegel) after implantation of the aromatase inhibitor, fadrozole. Aquacult. Res., 37: 484–491.

Lin F., Dabrowski K. and L.P.M. Timmermans, 1997. Early gonadal development and sexual differentiation in muskellunge (*Esox masquinongy*). Can. J. Zool. 75: 1262 – 1269.

Lone K.P. and A.J. Matty, 1980. The effect of feeding methyl testosterone on the growth and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Gen. Comp. Endo., 40: 409-424

Mariscal, R.N., 1970. The nature of the symbiosis between Indo-Pacific anemone fishes and sea anemones. Mar Biol., 6: 58–65.

Nakamura, M.,1975. Dosage-dependent changes in the effect of oral administration of methyltestosterone on gonadal sex differentiation in *Tilapia mossambica*. Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ., 26:99-108.

Pandian,T.J. and S.G. Sheela, 1995. Hormonal induction of sex reversal in fish. Aquaculture, 138: 1-22.

Patino R., Davis K. B., Schoore J. E., Uguz C., Strussmann C. A., and N.C. Parker, 1996. Sex channel catfish gonads: normal development and effects of temperature. J. Exp. Zool., 276: 209–218

Piferrer, F. and E.M. Donaldson, 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture, 77: 2 – 3.

Kwon J.Y., Haghpanah H., Kogson-Hurtado L.M., McAndrew B.J. and D.J.Penman, 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. J. Exp.Zool., 287: 46-53.

Marjani, M., Jamili, S., Mostafavi, P.G., Ramin, M. and A. Mashinchian, 2009. Influence of 17-alpha methyl testosterone on masculinization and growth in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). J. Fish. Aquat. Sci., 4: 71 -74.

Muniasamya, S., Allen Benzigera, P.S., Ananth Kumarb, Y. and M.A. Haniffaa Bilal, 2015. Effect of 17α- methyl testosterone incorporated diets on growth of spotted snakehead, *Channa punctatus* and white carp, *Cirrhinus mrigala*. Saudi J. Biol. Sci., 26: 541-546.

Nagaraj, 1989. Status of hormonal sex manipulation in the exotic carp, *Cyprinus carpio* (Linn.) in India. Pp. 117-120. In: M. J. Modayil, (ed.). Exotic Aquatic Species in India. Asian Fisheries Society Indian branch, Mangalore, India.

Pandian, T.J, and K.Varadaraj, 1990. Techniques to produce 100% male tilapia. Naga, the ICLARM Quarterly, 13: 3-5.

Person, L.R.J., Alexandre, J.C., Thebaud, L.and C. Mugnier, 1993.Marine fish larvae feeding: formulated diets or live prey. J. World. Aquacult. Soc., 24: 211-224.

Piferrer, F., I.I. Baker, and E.M. Donaldson, 1993. Effects of natural, synthetic, aromatizable and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Gen. Comp. Endocrinol., 91: 59-65.

Rivero-Wendt, C.L.G., A.L., Miranda-Vilela, M.F.N. Ferreira, M.F.N., A.M. Borges and C.K. Grisolia, 2013. Cytogenetic toxicity and gonadal effects of 17α-methyltestosterone in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) and *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Genet Mol Res., 12: 3862-3870.

Ro¨mer U. and W. Beisenherz, 1996. Environmental determination of sex in *Apistogramma* (Cichlidae) and two other freshwater fishes (Teleostei). J. Fish Biol., 48: 714–725

Ross, R.M., 1978. Reproductive Behavior of the anemonefish *Amphiprion melanopus* of Guam.Copeia, 1: 103-107.

Smith, I.E., 1999. Aromatase inhibitors: a dose-response effect? Endocr. Relat. Cancer., 6: 245-249.

Schultz R. J.,1993. Genetic regulation of temperature-mediated sex ratios in the livebearing fish *Poeciliopsis lucida*. Copeia, 7: 1148–1151.

Sales, J. and G.P.J. Janssen, 2003. Nutrient requirements of ornamental fish. Aquat. Liv. Resour., 16: 533-540.

Seralini, G.E. and S.Moslemi, 2001. Aromatase inhibitors: past, present and future. Mol. Cell. Endocrinol., 178: 117-131.

Shelton W.L., 1986. Broodstock development for monosex production of grass carp. Aquaculture, 57: 311-319.

Shen Z.G., Fan Q.X. Yang W. Zhang Y.L. and H.P. Wang, 2015. Effects of 17α-methyltestosterone and aromatase Inhibitor Letrozole on sex reversal, gonadal structure, and growth in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Biol Bull., 228: 108-117.

Singh, A. K., 2013. Introduction of modern endocrine techniques for the production of monosex populations of fishes. Gen. Comp. Endocrinol.,181:146–155.

Singh, A.K., Srivastava, P.P., R Verma, R., SC Srivastava, S.C., Kumar, D. and A. Ansari, 2014. Effect of dietary administration of letrozole and tamoxifen on gonadal development, sex differentiation and biochemical changes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) Reprod Fert Develop., 27: 449-457.

Singth, A.T. and P. Srivastava, 2014. A CYP1,9 Based Sex Determination and Monosex production in Aquaculture Species *Oreochromis niloticus* L. and a *Cyprinid Cyprinus carpio* L. J. Fish. Aquac., 6 :2-6.

Tan-Fermin, J. D., Garcia, L. M. B., and A.R. Castillo Jr, 1994. Induction of sex inversion in juvenile grouper, *Epinephelus suillus*, (Valenciennes) by injections of 17α-methyltestosterone. Bull. Environ. Contam Toxicol., 40: 413-420.

Thongkukiatkul,A. and S. Bhupradid Ultrastructure of spermatogenesis of Anemone Clownfish, Amphiprion ocellaris (Cuvier, 1830). Afr. J. Biotechnol. In process.

Smith, I.E., 1999. Aromatase inhibitors: a dose-response effect? Endocr. Relat. Cancer., 6: 245-249.

Socorro, S., R.S. Martins, L. Deloffre, L., C.C. Mylonas, and A.V. Cari, 2007. A cDNA for European sea bass (*Dicentrachus labrax*) 11β- hydroxylase: Gene expression during the thermosensitive period and gonadogenesis. Gen.Comp.Endocrinol. 150:164-173.

Solar, I.I. and E.M. Donaldson, 1985. Studies on genetic and hormonal sex control in domesticated rainbow trout. I. The effect of heat shock treatment for induction of triploidy in cultured rainbow trout (Salmo gairdneri Richardson). Can.Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. No., 1379: 1-15.

Sonnenschein, C. and A.M. Soto, 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. J. Steroid Biochem. mol. Biol., 65: 143- 150.

Strüssmann, C. A., T. Saito, M. Usui, H. Yamada, and F. Takashima, 1997, Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two Atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatcheri*. J. Exp. Zool., 278:167–177.

Sun, L.W., Zha, J.M., Spear, P.A. and Z.J.Wang, 2007. Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (*Oryzias latipes*) eggs, larvae and breeding adults. Comp. Biochem. Physiol. C., 145: 533-541.

Talikina, M.G., 1995. Sex differentiation and gonad development during the first years of life in the bream *Abramis brama* from the Rybinsk water reservoir. Vopr. Ikhtiol. 35: 114 – 119.

Tang F., Chan S. T. H. and B. Lofts,1974. Effect of mammalian luteinizing hormone on the natural sex reversal of the rice-field eel, *Monopterus albus* (Zuiew). Gen. Comp. Endocrinol., 24: 242–248

Wang, F.,Jia, Y-F., Wang, P., Du Qi-Y. and Z.J. Chang, 2017. Effects of Letrozole on Gonad Differentiation of Carp (*Cyprinus carpio*). Pak J Zool., 49: 1969-1981.

Webster, K. A., Schach, U., Ordaz, A., Steinfeld, J. S., Draper, B. W. and K.R. Siegfried, 2017. Dmrt1 is necessary for male sexual development in zebrafish. Dev Biol., 422: 33-46.

Van Winkoop, A., Timmermans L. P. M. and H. J. T Goos, 1994. Stimulation of gonadal and germ cell development in larval and juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) by homologous pituitary extract. Fish Physiol. Biochem., 13: 161–171.

Yamamoto, T.-O., 1969. Sex differentiation. In Fish Physiology; Hoar, W.S., Randall, D.J., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, Volume 3, pp. 117–175.

Yamazaki, F., 1983. Sex control and manipulation in fish. Aquaculture. 33: 329-354.

Output จากโครงการวิจัย

เผยแพร่ผลงานวิชาการ 2 ฉบับ

Thongkukiatkul, A. and M, Kruatrachue. (2019). Ultrastructure of oocyte development in anemone clownfish, *Amphiprion ocellaris* (Cuvier, 1830). Burapha Science Journal. 24: 851-866.

Thongkukiatkul, A. and Bhupradid, S. Ultrastructure of spermatogenesis of the *Amphiprion ocellatis*. Taiwania, in process.