การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 64
The 64th Kasetsart University Annual Conference

ผลของ 17 อัลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรนต่อการแปลงเพศของลูกปลากัดสายพันธุ์หางพระจันทร์ครึ่งซีก (*Betta splendens*) ด้วยวิธีการแช่

Effect of 17 Alpha-Methyltestosterone on Sex Reversal in Halfmoon Betta Fish (*Betta splendens*) Larvae by Immersion Method

อสมาภรณ์ สิริวัชราทร[1], อรพร หมื่นพล[1], สันติ พ่วงเจริญ[2], จักร อรัณยกานนท์[1,*]
Asamaporn Siriwatcharathorn[1], Oraporn Mennpol[2], Santi Poungcharean[2], Chak Aranyakanont[1,*]

[1] Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand
[2] Department of Fisheries Biology Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตปลากัดเพศผู้ล้วนโดยใช้ฮอร์โมน 17อัลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรน (17α-MT) และเพื่อระบุช่วงอายุที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนเพศ ลูกปลากัดวัยอ่อนถูกตรวจสอบพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยวิธีมิญชวิทยา ในช่วงอายุ 2-26 วันหลังฟัก (DAH) พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียเริ่มปรากฏเมื่ออายุ 14 DAH และเพศผู้ปรากฏเมื่ออายุ 17 DAH แสดงว่าก่อน 14 DAH เป็นระยะที่กระบวนการกำหนดเพศยังไม่สมบูรณ์และเหมาะสมต่อการให้ฮอร์โมน การให้ฮอร์โมนระดับ 200, 400 และ 600 µg/L ในช่วงอายุ 7-14 และ 7-21 DAH พบว่า 200 µg/L ให้ผลเป็นเพศผู้ได้ดีที่สุด(68.4%) และมีสัดส่วนเพศผู้สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และการเพิ่มระยะเวลาให้ฮอร์โมนจาก 7-14 DAH เป็น 7-21 DAH ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศ ผลการศึกษายืนยันว่าการให้ 17α-MT ก่อนอายุ 14 DAH ที่ระดับ 200 µg/L เหมาะสมในการผลิตปลากัดเพศผู้ล้วน

Introduction

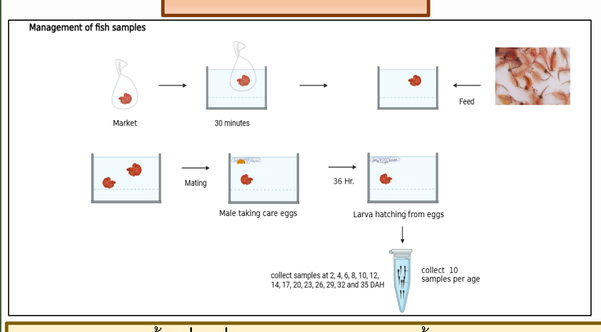
ปลากัดเป็นสัตว์น้ำประจำชาติของไทย ซึ่งดึงดูดความสนใจของผู้เลี้ยงปลาจากต่างประเทศ ในการเลี้ยงจะนิยมปลาเพศผู้ที่เพราะมีสีสันสวยงามและครีบยาวกว่าเพศเมีย ส่งผลให้ในการผลิตเกษตรกรที่เพาะพันธุ์ปลากัดต้องคัดปลาครึ่งหนึ่งที่เป็นเพศเมียออก แต่การแยกเพศในปลากัดอายุน้อยยังทำไม่ได้ เกษตรกรต้องอนุบาลลูกปลาทั้งสองเพศ ไปจนกว่าจะความแตกต่างทางลักษณะภายนอก จากนั้นจึงเลี้ยงเฉพาะเพศผู้ต่อจนกว่าจะโตได้ขนาดพร้อมส่งตลาด การศึกษาครั้งนี้จัดทำขึ้นโดยใช้ปลากัดหางพระจันทร์ครึ่งซีกเป็นต้นแบบเนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีครีบยาวสวยงามอย่างเห็นได้ชัด โดยมุ่งไปที่การใช้ฮอร์โมนกำหนดเพศของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal sex determination) มีงานวิจัยจำนวนมากใช้ฮอร์โมน 17α-เมทิลเทสโทสเตอโรนในการเปลี่ยนแปลงเพศลูกปลา

Objective

1. ศึกษาพัฒนาการสร้างและเจริญพันธุ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลากัด เพื่อค้นหาช่วงอายุที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้สำหรับการทดลอง
2. ศึกษาการใช้ฮอร์โมน 17α- MT ในช่วงอายุที่ต่างกัน ที่ความเข้มข้น 0, 200, 400 และ 600 µg/L

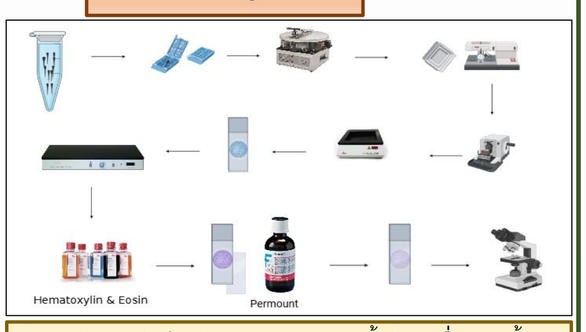
Method

1. การเพาะปลากัด



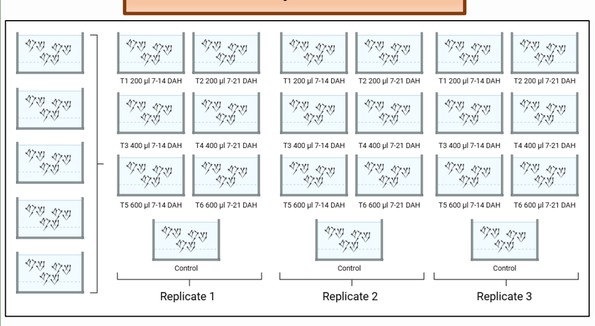
เตรียมลังโฟมใส่น้ำครึ่งหนึ่ง และใส่ใบหูกวาง จากนั้นนำพ่อพันธุ์ใส่ลงในลังโฟมทิ้งไว้ 1 วัน เมื่อปลาตัวผู้ก่อหวอดจึงนำตัวเมียใส่ลงไป เพื่อให้ผสมพันธุ์กัน จากนั้นจึงแยกตัวเมียออกหลังจากที่ผสมพันธุ์เสร็จแล้วเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวเมียกินไข่ หลังจากนั้นแยกตัวผู้ออกหลังจากที่ลูกปลามีอายุ 6 วันหลังฟักออกจากไข่ สุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลากัดวัยอ่อนที่อายุ 2-35 วันหลังฟัก จำนวน 10 ตัว ใส่ใน Eppendorf tube ที่ภายในมี 10% buffer formalin

2. การทำมิญชวิทยา



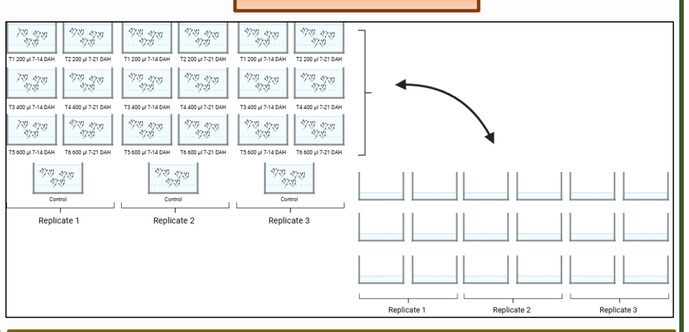
นำตัวอย่างลูกปลาไปผ่านกระบวนการขจัดน้ำด้วยเครื่องขจัดน้ำอัตโนมัติ โดยใช้สารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ และใส่ตัวอย่างลงในบล็อกพาราฟินเหลวเพื่อขึ้นบล็อกพาราฟิน จากนั้นนำบล็อกพาราฟินที่แข็งตัวแล้วไปตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร โดยใช้เครื่องตัดMicrotome และนำชิ้นเนื้อไปติดบนสไลด์เพื่อทำการย้อมสีด้วย Hematoxylin and Eosin

3. การแบ่งชุดการทดลอง



ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์(CRD) โดยนำลูกปลาอายุ 6 DAH ที่ได้จากการเพาะมาแบ่งชุดการทดลองเพื่อเตรียมเริ่มการทดลองเมื่อลูกปลามีอายุ 7 DAH ทั้งหมด 7 ชุด ชุดละ 50 ตัว ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

4. การใช้ฮอร์โมน



ตวงน้ำปริมาณ 2 ลิตรใส่กะละมังพลาสติกจำนวน 18 ใบ จากนั้นใส่ฮอร์โมนลงในน้ำความเข้มข้นตามที่แบ่งชุดการทดลองไว้ จากนั้นนำลูกปลาจากลังโฟมมาแช่ในกะละมังที่มีน้ำผสมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำลูกปลาออกจากน้ำผสมฮอร์โมนกลับไปไว้ที่ลังอนุบาลและพักเป็นเวลา 1 วัน ทำขั้นตอนเดิมอีกครั้งจนอายุลูกปลาครบตามที่กำหนดไว้ในแต่ละชุดการทดลอง

Result and Discussion

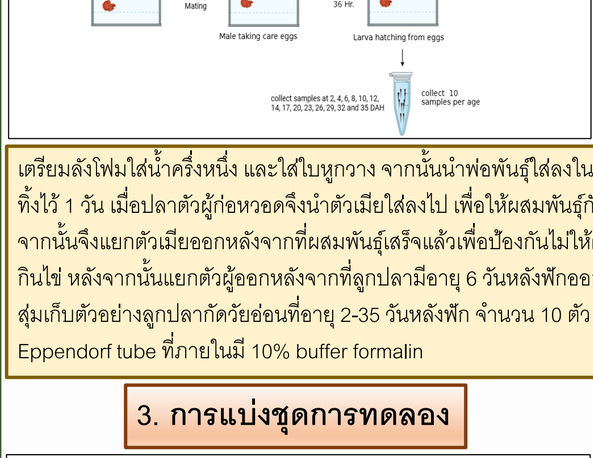


Fig. 1 Photomicrography of *Betta splendens*: Histological cross-section of a fry (A) at 2 DAH; (B) at 4 DAH; (C) at 6 DAH; (D) at 8 DAH, showing the appearance of presumed gonadal ridges (GR) in the dorsal coelomic cavity. Staining: hematoxylin and eosin (HE)

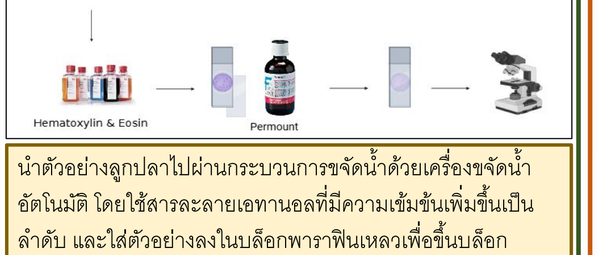


Fig. 2 Photomicrography of *Betta splendens*: Histological cross-section of a fry (A) at 10 DAH; (B) at 12 DAH showing the gonadal primordia (GP) indicated by red arrows. Staining: hematoxylin and eosin (HE)

ในการศึกษาลูกปลากัด พบว่าอายุ 2–8 DAH ตรวจพบ primordial germ cells (PGCs) และ gonadal ridges และที่อายุ 10–12 DAH พบ gonadal primordia จัดอยู่ในระยะอวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่แยกเพศ (undifferentiated gonad phase) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลูกปลาช่อนอะราไพม่า (Zelada-Mázmela *et al.*, 2021) โดยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นอัณฑะหรือรังไข่ และจะพัฒนาแยกเพศเมื่อได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนหรือปัจจัยจากอวัยวะสืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนา (Devlin & Nagahama, 2002)

Fig. 3 Photomicrography of *Betta splendens*: Histological cross-section of a fry (A) at 14 DAH showing the oogonia (Og) indicated by red arrows. (B) at 17 DAH showing the oogonia (Og) and perinucleolus oocytes (Poc) indicated by red arrows. (C) at 20 DAH; (D) at 23 DAH showing the perinucleolus oocytes (Poc) indicated by red arrows. Staining: hematoxylin and eosin (HE)

ในช่วงอายุ 14–17 DAH เริ่มพบ oogonia และบางส่วนพัฒนาเป็น perinucleolus oocytes ขณะที่อายุ 20–23 DAH พบ perinucleolus oocytes เป็นส่วนใหญ่และมีขนาดเพิ่มขึ้นตามอายุ ส่วนเพศผู้เริ่มพบ spermatogonia ระยะเริ่มต้น ตั้งแต่อายุ 17 DAH ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขนาดตามอายุ สอดคล้องกับการศึกษาปลาบู่กิ้งก่า (Cho *et al.*, 2014) ระยะนี้จัดเป็นช่วงอวัยวะสืบพันธุ์แยกเพศแล้ว (differentiated gonad phase) มีความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาระหว่างเพศ (Ijiri *et al.*, 2008) และเพศถูกกำหนดแน่นอนไม่เปลี่ยนแปลงตลอดชีวิต (Baroiller & D'Cotta, 2016)

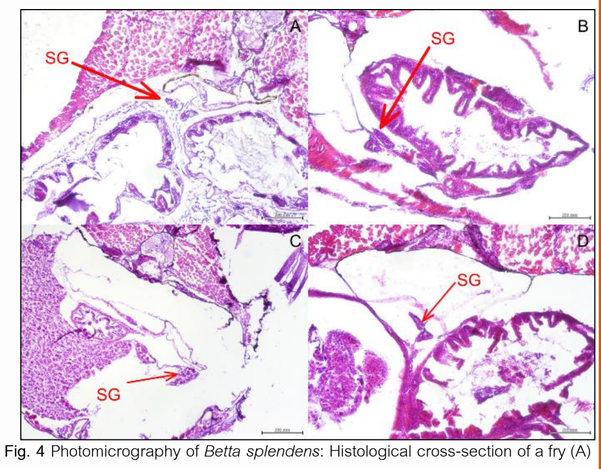


Fig. 4 Photomicrography of *Betta splendens*: Histological cross-section of a fry (A) at 17 DAH; (B) at 20 DAH; (C) at 23 DAH; (D) at 26 DAH showing the spermatogonia (SG) indicated by red arrows. Staining: hematoxylin and eosin (HE)

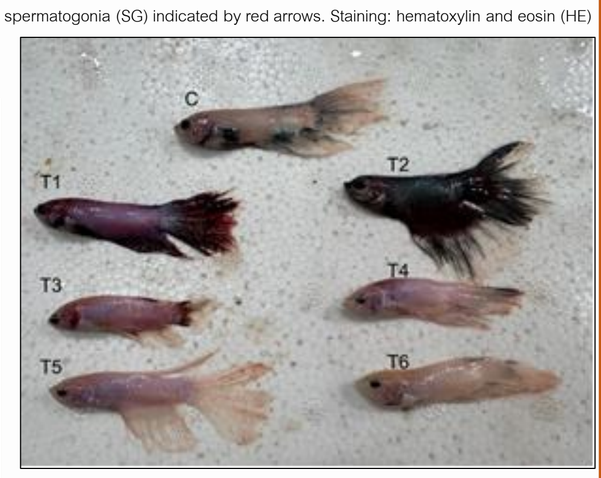


Fig. 5 Photo of male *Betta splendens* each Treatment: (C) is control. (T1) is 200 µg/L 7-14 DAH (T2) is 200 µg/L 7-21 DAH (T3) is 400 µg/L 7-14 DAH (T4) is 400 µg/L 7-21 DAH (T5) is 600 µg/L 7-14 DAH (T6) is 600 µg/L 7-21 DAH

Table 1 Sex Distribution, Survival Rate, Mean Male, and SD(Standard Deviation) Statistical Parameters in the Experiment.

Treatment (n=150)	Rep	Male	Female	Total (Fish)	Survival Rate (%)	Mean Male (%)	SD
Control	3	59	66	125	83.3%	47.2%	5.3
T1 200 µg/L 7-14 DAH	3	78	36	114	76.0%	68.4%	4.7
T2 200 µg/L 7-21 DAH	3	70	40	110	73.3%	63.6%	8.7
T3 400 µg/L 7-14 DAH	3	68	49	117	78.0%	58.1%	3.42
T4 400 µg/L 7-21 DAH	3	55	46	101	67.3%	54.5%	2.0
T5 600 µg/L 7-14 DAH	3	50	56	106	70.7%	47.2%	12.5
T6 600 µg/L 7-21 DAH	3	42	48	90	60.0%	46.7%	5.4

การศึกษาของ Kirankumar and Pandian (2002) พบว่าที่ความเข้มข้น 900 µg/L นาน 3 ชั่วโมง ทำให้ปลา 98% เป็นเพศผู้ แต่ส่งผลข้างเคียงโดยปลาที่ได้รับฮอร์โมนมีความยาวเพียง 50% ของปลาชุดควบคุม ต่างจากผลการทดลองนี้ที่ใช้ 17α-MT ที่ความเข้มข้น 200, 400 และ 600 µg/L นาน 8 ชั่วโมงต่อครั้งที่อายุ 7-14 และ 7-21 DAH พบว่าความยาวของปลาชุดที่ได้รับฮอร์โมนไม่แตกต่างจากปลาที่ได้รับฮอร์โมนมากนัก(Fig. 5) และที่ความเข้มข้น 200 µg/L ให้ผลเป็นเพศผู้อยู่ที่ 68.4% โดยอัตราส่วนเพศผู้ของแต่ละชุดการทดลองแสดงใน Table 1

Table 2 One-way ANOVA of Arc-sine($\sqrt{p}$) Transformed Male Proportion.

Source of Variation	df	SS	MS	F	*p*
Between groups	6	0.14615	0.02436	4.94	< 0.01
Within groups	14	0.06910	0.00494		
Total	20	0.21525	-		

Table 3 Tukey HSD Pairwise Comparisons of Arc-sine($\sqrt{p}$) Transformed Values *(Only significant comparisons are shown)*

Pairwise Comparison	Mean Difference	95% CI	*p*-value
T1 – C	+0.2171	(−0.0143, +0.4485)	0.041*
T2 – C	+0.1685	(−0.0629, +0.3999)	0.118
T3 – C	+0.1088	(−0.1226, +0.3402)	0.412
T5 – T1	−0.2267	(−0.4581, +0.0047)	0.052
T6 – T1	−0.2195	(−0.4509, +0.0119)	0.061

*($p < 0.05$)

ข้อมูลสัดส่วนเพศผู้ถูกแปลงด้วย Arc-sine($\sqrt{p}$) และวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA พบความแตกต่างระหว่าง 7 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($F_{6,14} = 4.94$, $p < 0.01$; Table 2) แสดงว่ามีอย่างน้อย 1 กลุ่มแตกต่างจากกลุ่มอื่น การทดสอบ Tukey HSD (21 คู่; Table 3) พบว่า T1 แตกต่างจาก Control อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วน T1 vs T5 ($p \approx 0.052$) และ T1 vs T6 ($p \approx 0.061$) มีแนวโน้มใกล้นัยสำคัญ คู่อื่นไม่แตกต่าง ($p > 0.05$)

Table 4 Results of GLM (Binomial logit) for Dose and Time (reference = Control 0 µg/L, Time = 21 DAH)

Variable (reference)	B	SE	Wald χ^2	df	*p*	OR (exp(B))	95% CI OR
(Intercept)	-0.134	0.2113	0.399	1	0.527	0.87	0.58–1.32
Dose = 200 vs 0	0.693	0.2897	5.725	1	0.017	2.00	1.13–3.53
Dose = 400 vs 0	0.312	0.2908	1.153	1	0.283	1.37	0.77–2.42
Dose = 600 vs 0	0.084	0.2788	0.091	1	0.763	1.09	0.63–1.88
Time = 14 vs 21	0.020	0.2872	0.005	1	0.944	1.02	0.58–1.79
Dose200 × Time14	0.193	0.4030	0.230	1	0.631	1.21	0.55–2.67
Dose400 × Time14	0.149	0.3974	0.141	1	0.707	1.16	0.53–2.53

การวิเคราะห์ด้วย Generalized Linear Model (Binomial, Logit; Table 4) ชี้ว่า ความเข้มข้นฮอร์โมนมีผลต่อความน่าจะเป็นการเป็นเพศผู้ โดย 200 µg/L มีผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (B = 0.693, Wald $\chi^2 = 5.725$, $p = 0.017$; OR = 2.00, 95% CI: 1.13–3.53) เพิ่มโอกาสเป็นเพศผู้ประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ขณะที่ 400 และ 600 µg/L ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ระยะเวลาให้ฮอร์โมน (7–14 vs 7–21 DAH) ไม่มีผล (B = 0.020, $p = 0.944$) และไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกับระยะเวลา ($p > 0.05$)

Conclusion

จากการศึกษาพบว่าช่วงอายุก่อน 14 วันหลังฟักเป็นช่วงที่กระบวนการกำหนดเพศยังไม่สมบูรณ์ จึงเหมาะสมต่อการนำมาศึกษาการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเปลี่ยนเพศ และระดับฮอร์โมนที่ส่งผลให้ลูกปลาเปลี่ยนเป็นเพศผู้มากที่สุดคือ ฮอร์โมนที่ระดับความเข้มข้น 200 µg/L ($p < 0.05$) โดยการเพิ่มระยะเวลาให้ฮอร์โมนจาก 7-14 DAH เป็น 7-21 DAH ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศ เนื่องจากเมื่อลูกปลามีอายุตั้งแต่ 14 วันหลักฟักเป็นต้นไปคือช่วงที่กระบวนการกำหนดเพศสมบูรณ์แล้ว ลูกปลาจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพศแล้วแม้จะยังได้รับฮอร์โมนอยู่ มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดปรากฏการณ์ Paradoxical effects เนื่องจากในความเข้มข้นที่มากขึ้นแต่อัตราส่วนเพศผู้กลับลดลง แต่เมื่อเทียบอัตราส่วนเพศผู้ที่ระดับความเข้มข้น 400 และ 600 µg/L กับชุดควบคุมแล้วไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ หากอยากได้คำตอบที่แน่ชัดอาจต้องทำการลดระยะเวลาการแช่ฮอร์โมนลง เพื่อดูผลลัพธ์ว่าอัตราส่วนเพศผู้ยังคงลดลงเมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนสูงขึ้นอยู่หรือไม่

Reference

Baroiller, J. F., & D'Cotta, H. (2016). The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sex Dev, 10*(5-6): 242-266.
Cho, H. C., Hwang, I. J., & Baek, H. J. (2014). Histological Analysis of Early Gonadal Development and Sex Differentiation in Chameleon Goby, *Tridentiger trigonocephalus*. *Dev Reprod, 18*(1): 51-56.
Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture, 208*(3-4): 191-364.
Ijiri, S., Kaneko, H., Kobayashi, T., Wang, D. S., Sakai, F., Paul-Prasanth, B., . . . Nagahama, Y. (2008). Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Biol Reprod, 78*(2): 333-341.
Kirankumar, S., & Pandian, T. J. (2002). Effect on Growth and Reproduction of Hormone Immersed and Masculinized Fighting Fish *Betta splendens*. *Journal of Experimental Zoology, 293*(6): 606-616.
Zelada-Mázmela, R. F., Gutiérrez, G. A., & Zelada-Mázmela, E. (2021). Histological description of the early gonadal development of *Arapaima gigas*, paiche. *Journal of the World Aquaculture Society, 53*(3): 754-764.

Email : Asamaporn.lilmoo@gmail.com