



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาคุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

ผลของ 17 α -methyltestosterone ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี และภูมิคุ้มกัน ของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)

Effects of 17 α -Methyltestosterone on Expression of Growth-Related Genes, Blood and Biochemical Parameters and Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)

นามผู้วิจัย นางสาวนงลักษณ์ พุ่มอยู่

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สุรินทร์ บุญอนันตสาร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงษ์เชษฐ พิษิตกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสังวี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของ 17 α -methyltestosterone ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต
ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี และภูมิคุ้มกัน ของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)

Effects of 17 α -Methyltestosterone on Expression of Growth-Related Genes, Blood and
Biochemical Parameters and Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)

โดย

นางสาวนงลักษณ์ พุ่มอยู่

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นงลักษณ์ พุ่มอยู่ 2557: ผลของ 17 α -methyltestosterone ต่อการแสดงออกของยีน
ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี และภูมิคุ้มกัน ของปลานิล
(*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปรชชานกรรมการที่ปรึกษา:
ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ณ นคร, Ph.D. 140 หน้า

การศึกษาที่หนึ่ง ศึกษาผลของ 17 α -methyltestosterone (MT) ต่อการเจริญเติบโตและ
การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่ไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมอง ในปลานิล
(*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) เพศเมีย เพศผู้ และปลาแปลงเพศ พบว่าปลาเพศผู้และ
ปลาแปลงเพศมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันและมีการเจริญเติบโตสูงกว่าปลาเพศเมีย
($P < 0.05$) พบปัจจัยร่วมระหว่างเพศและ MT ต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain) และอัตรา
การเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) โดย MT ทำให้น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นและอัตราการ
เจริญเติบโตจำเพาะของปลาเพศเมียเพิ่มสูงขึ้น ไม่พบอิทธิพลของเพศและ MT ต่อการแสดงออก
ของยีน growth hormone releasing hormone (GHRH) และ pituitary adenylate cyclase activating
polypeptide (PACAP) ที่บริเวณไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมอง นอกจากนี้พบว่าระดับ mRNA ของ
growth hormone (GH) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างเพศปลา
อย่างไรก็ตามปลาเพศเมียมีแนวโน้มที่จะมีระดับ mRNA ของ GH สูงกว่าปลาเพศผู้และปลา
แปลงเพศ

การศึกษาที่สอง ศึกษาผลของ MT ต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือด ภูมิคุ้มกัน และ
กายวิภาคของลำไส้ ในปลานิลเพศเมีย เพศผู้ และปลาแปลงเพศ พบว่า ปลาเพศผู้มีจำนวน
เม็ดเลือดแดงและค่าฮีโมโกลบินสูงกว่าเพศเมียและปลาแปลงเพศ ($P < 0.05$) พบว่าค่าชีวเคมีใน
เลือดและภูมิคุ้มกันส่วนใหญ่มีค่าใกล้เคียงกันในปลาทุกเพศ ปลาเพศเมียมีระดับไตรกลีเซอไรด์สูง
ที่สุด และมีค่า alternative complement activity (ACH50) ต่ำที่สุด MT ทำให้อา ค่า ACH50 ในปลา
เพศเมียสูงขึ้น ($P < 0.05$) ปลาเพศเมียมีความสูงของ villi ในลำไส้ส่วนต้นต่ำที่สุด และ MT ทำให้อ
ความสูง villi ของลำไส้ส่วนต้นเพิ่มขึ้น

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Nonglak Phumyu 2014: Effects of 17α -Methyltestosterone on Expression of Growth-Related Genes, Blood and Biochemical Parameters and Immunity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Doctor of Philosophy (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Professor Uthairat Na-Nakorn, Ph.D. 140 pages.

The first study aimed to investigate the influence of 17α -methyltestosterone (MT) on growth responses and expression of hypothalamic-pituitary growth hormone related genes in female, male and sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). It was found that male and sex-reversed fish showed similar growth performances, with faster growth than in females ($P < 0.05$). In addition, there was an interaction effect between sex and MT on weight gain (WG) and specific growth rate (SGR). The MT increased the WG and SGR of the female. No significant effects of sex and MT on the expression of hypothalamic growth hormone releasing hormone (*GHRH*) and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (*PACAP*) genes. There were no statistically significant differences ($P > 0.05$) in growth hormone (*GH*) mRNA among sexes. However, females tended to have higher *GH* mRNA levels than male and sex-reversed fish did.

The second study aimed to investigate the effects of MT on hematological indices, blood biochemical parameters, immunity and intestinal morphology in female, male, and sex-reversed Nile tilapia. It was found that male fish had higher red blood cell counts and hemoglobin levels than female and sex-reversed fish did ($P < 0.05$). Most but not all blood biochemical and immune parameters of fish were similar. Female fish had the highest blood triglyceride levels. Female fish had the lowest alternative complement activity (ACH50). MT increased the ACH50 in female fish ($P < 0.05$). Female had the lowest villi height in the anterior intestine, and MT increased the height of anterior villi.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อุทัยรัตน์ วัฒนนคร ประธานกรรมการ
ที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือให้คำปรึกษาแนะนำงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตธนสาร กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ที่กรุณาช่วยเหลือ
ในการวางแผนงานวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำ และมอบทุนสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้
ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอกราบขอบพระคุณ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ
กรรมการสาขาวิชาเอก ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จ
ลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้าโครงการสัตว์น้ำ และบุคลากรฟาร์มมหาวิทยาลัย
เทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่กรุณามอบตัวอย่าง เอื้อเฟื้อสถานที่ และความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ๆ น้องๆ ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ
ชี้แนะและสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงได้

นงลักษณ์ พุ่มอยู่
กรกฎาคม 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(10)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(13)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	50
ผล	50
วิจารณ์	86
สรุปและข้อเสนอแนะ	96
สรุป	96
ข้อเสนอแนะ	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	99
ภาคผนวก	112
ภาคผนวก ก ค่า Melting Temperature และ Standard curve	113
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of variance	118
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	140

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Forward primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>GHRH-PACAP</i> และ <i>GH</i> ใน Primary PCR	21
2	Forward primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>GHRH-PACAP</i> และ <i>GH</i> ใน Nested PCR	22
3	ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน <i>β-actin</i>	27
4	Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real time RT-PCR	36
5	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อน้ำหนักตัวเริ่มต้น น้ำหนักตัวที่ 35 วัน น้ำหนักตัวที่ 35 วัน และน้ำหนักตัวที่ 105 วัน ของปลานิล	70
6	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (WG) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) ของปลานิล	71
7	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อน้ำหนักตัวเริ่มต้น น้ำหนักตัวที่ 35 วัน และน้ำหนักตัวที่ 70 วัน ของปลานิล	74
8	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (WG) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) ของปลานิล	75
9	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อความสูงของ villi และจำนวน goblet cell ในลำไส้ส่วนต้น (anterior part) และลำไส้ส่วนกลาง (middle part) และค่า hepatosomatic index ของปลานิล	77
10	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ค่าฮีโมโกลบิน ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ และความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง ของปลานิล	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte	82
12	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อระดับโปรตีน คอเลสเทอรอล ไตรกลีเซอไรด์ น้ำตาลกลูโคส ในเลือด ของปลานิล	84
13	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อค่า Alternative complement activity, Lysozyme activity และ Total immunity ของปลานิล	85
ตารางผนวกที่		
ข1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน PACAP ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	119
ข2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน GHRH ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	119
ข3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน GH ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	120
ข4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน PACAP ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	120

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน GHRH ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	120
ข6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน GH ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	121
ข7	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	121
ข8	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังเลี้ยง 35 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	121
ข9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	122
ข10	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	122
ข11	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นหลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบและฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	123

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุ์กรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	123
ข13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุ์กรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	124
ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุ์กรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	124
ข15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดตายของปลานิล หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุ์กรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	125
ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	125
ข17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัว หลังจากเลี้ยง 35 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	126

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข18	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัว หลังจากเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	126
ข19	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น หลังจากเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	127
ข20	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	127
ข21	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	128
ข22	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	128
ข23	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดตาย ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	130
ข24	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า hepatosomatic index ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	129

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข25	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาว villi ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	129
ข26	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาว villi ในลำไส้เล็กส่วนต้น ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	130
ข27	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน goblet cell ในลำไส้เล็กส่วนต้น ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	130
ข28	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน goblet cell ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	131
ข29	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	131
ข30	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าฮีโมโกลบิน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	132
ข31	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	132
ข32	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	133

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข33	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	133
ข34	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	134
ข35	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	134
ข36	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	135
ข37	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	135
ข38	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	135
ข39	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าโปรตีนในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	136
ข40	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และ สอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	136

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข41	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าคอเลสเตอรอลในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	137
ข42	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากลูโคสในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	137
ข43	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า lysozyme activity ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	138
ข44	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า alternative complement activity (ACH50) ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	138
ข45	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า total immunoglobulin ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์	139

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไกการควบคุมการหลั่ง ฮอร์โมน <i>GH</i>	8
2	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>GHRH-PACAP</i> ในปลาตุ๊กอูย ปลาหมออเมริกา ปลาหมอเทศ ปลากระรังดอกแดง และปลาม้าลาย และตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับโคลน cDNA	17
3	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>GH</i> ในปลานิล ปลาหมอเทศ ปลากระรังดอกแดง และปลา gilthead sea bream และตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับโคลน cDNA ของยีน <i>GH</i>	19
4	การย้อมสี gonad เพื่อตรวจสอบเพศ ด้วยวิธีการ squash technique	29
5	การแยกเพศปลานิลโดยดูจากลักษณะดั้งเพศภายนอก	31
6	พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน <i>PACAP</i> (pPACAP), <i>GH</i> (pGH) และ β -actin (pActin)	35
7	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน <i>GHRH-PACAP</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>GHRH-PACAP</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR	37
8	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน <i>GH</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>GH</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR	38
9	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน β -actin ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -actin ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR	39
10	Electrophoresis ของ PCR products จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สอง (second round PCR) ยีน <i>GHRH-PACAP</i> , <i>GH</i> และ β -actin บน 2% agarose gel	51
11	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน <i>GHRH-PACAP</i> ที่โคลนได้แบบที่ 1 (แบบขาว) ของปลานิล กับยีน <i>GHRH-PACAP</i> ของปลาชนิดอื่นๆ	52

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน <i>GHRH-PACAP</i> ที่โคลนได้แบบที่ 2 (แบบสั้น) ของปลานิล กับยีน <i>GHRH-PACAP</i> ของปลาชนิดอื่นๆ	54
13	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน <i>GHRH-PACAP</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>GHRH-PACAP</i>	56
14	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน <i>GH</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล กับยีน <i>GH</i> ของปลาชนิดอื่นๆ	58
15	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน <i>GH</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>GH</i>	60
16	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน <i>β-actin</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล กับยีน <i>β-actin</i> ของปลาชนิดอื่นๆ	61
17	ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน <i>β-actin</i> ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน <i>β-actin</i>	63
18	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน <i>PACAP</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	65
19	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน <i>GHRH</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	65
20	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน <i>GH</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	66
21	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน <i>GHRH</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	67
22	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน <i>PACAP</i> ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน GH ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล	68
24	ความสูงของ villi ในลำไส้ส่วนต้น (anterior part) ของปลานิล	78
ภาพผนวกที่		
ก1	ค่า Tm ของยีน <i>PACAP</i>	114
ก2	Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน <i>PACAP</i> (Efficiency = 1.909)	114
ก3	ค่า Tm ของยีน <i>GHRH</i>	115
ก4	Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน <i>GHRH</i> (Efficiency = 1.845)	115
ก5	ค่า Tm ของยีน <i>GH</i>	116
ก6	Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน <i>GH</i> (Efficiency = 1.729)	116
ก7	ค่า Tm ของยีน <i>β-actin</i>	117
ก8	Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน <i>β-actin</i> (Efficiency = 1.902)	117

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

MT	=	17 α -Methyltestosterone
GHRH	=	Growth hormone releasing hormone
PACAP	=	Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
GH	=	Growth hormone
IGF-1	=	Insulin-like growth factor-1
%WG	=	Percent of weight gain
FCR	=	Feed conversion ratio
ADG	=	Average daily gain
SGR	=	Specific growth rate
HSI	=	Hepatosomatic index
RBC	=	Red blood cell count
MCV	=	Mean corpuscular volume
MCH	=	Mean corpuscular hemoglobin
MCHC	=	Mean corpuscular hemoglobin concentration
ACH50	=	Alternative complement hemolytic activity
3'-RACE	=	3'-Rapid amplification of cDNA ends
PCR	=	Polymerase chain reaction
Real time RT-PCR	=	Real time reverse transcription-polymerase chain reaction

**ผลของ 17 α -methyltestosterone ต่อการแสดงออกของยีน
ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต ค่าทางโลหิตวิทยาและชีวเคมี และภูมิคุ้มกัน
ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)**

**Effects of 17 α -Methyltestosterone on Expression of Growth-Related Genes,
Blood and Biochemical Parameters and Immunity of Nile Tilapia
(*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758)**

คำนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของโลกและของประเทศไทย จากข้อมูลทางสถิติการประมงแห่งประเทศไทย รายงานว่าในปี 2552 ปลานิลมีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของปริมาณสัตว์น้ำทั้งหมด โดยมีปริมาณผลผลิตกว่า 210,000 ตัน ปริมาณผลผลิตส่งออกรวม 14,103 ตัน มูลค่าการส่งออกสูงถึง 1,153 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2552) โดยประเทศไทยมีผลผลิตปลานิลส่งออกเป็นลำดับที่ 4 ของโลก (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556) และการเพาะเลี้ยงปลานิลมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว และขยายพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี แต่ปลานิลมีขนาดและการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยที่ปลานิลเพศผู้สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าเพศเมีย (sex dimorphism in growth) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลานิลจึงเป็นการพัฒนาและผลิตปลาเพศผู้ล้วน (male mono tilapia production) เพื่อให้ปลามีขนาดที่ใกล้เคียงกันและเจริญเติบโตเร็ว โดยใช้ฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (MT) เพื่อเหนี่ยวนำให้ลูกพันธุ์ปลาทั้งหมดเป็นเพศผู้ล้วน (all male tilapia)

การเจริญเติบโตของปลานิลเพศผู้และเพศเมียที่แตกต่างกัน อาจมีสาเหตุมาจากการอ้อมใจของปลาเพศเมียและฮอร์โมนเพศที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เป็นต้น แต่จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าปลานิลเพศผู้และเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างกันตั้งแต่ก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นเหตุผลที่เป็นไปได้ อาจมาจากความแตกต่างของระบบควบคุมการสร้างฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (Growth hormone, GH) และอาจมาจากระบบการใช้ประโยชน์จากอาหาร และเมตาโบลิซึมที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต

และกายวิภาคของลำไส้ ซึ่งกลไกการควบคุมการเจริญเติบโตในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีความซับซ้อนมาก ฮอร์โมนที่มีบทบาทต่อการเจริญเติบโตในปลา คือ Growth hormone (GH) ซึ่งถูกสร้างจากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) โดยฮอร์โมนที่มีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่ง GH ถูกสร้างจากสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ได้แก่ Growth hormone releasing hormone (GHRH) และ Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) (Parker *et al.*, 1997) แต่มีรายงานว่าการหลั่ง GH ยังสามารถถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพศได้ โดยการกระตุ้นผ่านตัวกลางคือ GHRH (Montero *et al.*, 2000) ซึ่งการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศต่อฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในปลานิลจึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ อีกทั้งการเพาะเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันเป็นการเลี้ยงปลาเพศผู้ล้วนแบบหนาแน่น (intensive) ซึ่งทำให้ปลาเกิดความเครียด ส่งผลต่อสุขภาพของปลา ทำให้ติดเชื้อโรคได้ง่าย ก่อให้เกิดความสูญเสียอันเนื่องมาจากโรคระบาด ดังนั้นจึงควรศึกษาถึงความแตกต่างของเพศต่อค่าทางชีววิทยาบางประการ เช่น ค่าโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือด และภูมิคุ้มกัน ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลานิลแปลงเพศ

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโต การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต คือ GHRH, PACAP และ GH ที่ไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมอง ของปลานิล รวมถึงค่าทางโลหิตวิทยา ค่าชีวเคมีในเลือด ภูมิคุ้มกันบางประการ และกายวิภาคของลำไส้ โดยเปรียบเทียบระหว่างปลานิลเพศผู้ ปลานิลเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศ ซึ่งข้อมูลที่ได้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงและการใช้ฮอร์โมน MT ในปลานิลและสัตว์น้ำอื่นๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของ MT ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP*, *GHRH* และ *GH* ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ
2. เพื่อศึกษาผลของ MT ต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในเลือด ค่าทางภูมิคุ้มกัน และกายวิภาคของลำไส้ ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ



การตรวจเอกสาร

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) เป็นปลาน้ำจืด มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ มีความอดทน สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ง่าย ลักษณะภายนอกและรูปร่างของปลานิลเพศผู้และเพศเมียจะมีความแตกต่างกัน โดยเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ปลาเพศผู้มักมีขนาดใหญ่กว่าปลาเพศเมีย และมีสีสันสดใสกว่า ความแตกต่างระหว่างเพศจะสังเกตเห็นได้จากลักษณะของดิ่งเพศ โดยเพศเมียดิ่งเพศจะมีลักษณะปลายมน มีช่องเปิด 2 ช่อง คือ ช่องเปิดที่ปลายดิ่งเป็นทางออกของปีศาจ ส่วนช่องเปิดตามขวางที่บริเวณกลางดิ่งเพศเป็นทางออกของไข่ ส่วนเพศผู้ดิ่งเพศมีลักษณะยาวเรียวปลายแหลม ช่องเปิดมีช่องเดียวที่ปลายดิ่ง (อุทัยรัตน์, 2538)

ปลานิลถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยจักรพรรดิอะกิฮิโตะแห่งประเทศญี่ปุ่น ครั้งยังเป็นมกุฎราชกุมาร ได้ทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว และทรงโปรดเกล้าให้ทดลองเลี้ยงในโครงการจิตรลดา เรียกสายพันธุ์ปลานิลดังกล่าวว่า ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา และพระราชทานพันธุ์ปลาดังกล่าวให้กับกรมประมง เพื่อให้ดำเนินการขยายพันธุ์ นำไปแจกจ่ายแก่ประชาชน และปล่อยลงสู่แหล่งน้ำต่างๆ ทั่วประเทศ (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, 2542)

การเพาะเลี้ยงปลานิลมีกระจายทั่วโลก ในปี พ.ศ. 2549 มีผลผลิตของปลานิลสูงถึง 1,988,726 ตัน โดยประเทศจีนเป็นผู้นำทางด้านการผลิตปลานิลในระดับโลก มีรายงานของ FAO ในปี 2006 ว่าประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลได้เป็นอันดับที่ 4 ของภูมิภาคเอเชีย โดยในปี พ.ศ. 2549 มีจำนวนผลผลิตทั้งสิ้น 153,000 ตัน การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในประเทศ กรมศุลกากรรายงานว่ามูลค่าการส่งออกปลานิลจากประเทศไทยในปี พ.ศ. 2551 เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2550 ถึงร้อยละ 55 ซึ่งมีปริมาณการส่งออกปลานิลรวมทั้งสิ้น 12,733,959 กิโลกรัม มีมูลค่า 668,803,306 บาท และการผลิตปลานิลมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นปลาที่มีราคาดี เป็นที่นิยมบริโภค สามารถเลี้ยงได้ทุกภูมิภาค อีกทั้งจำนวนประชากรทั้งในและนอกประเทศมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น การเพาะเลี้ยงปลานิลจึงมีการปรับปรุงสายพันธุ์และพัฒนาเทคนิคการเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีลักษณะ คุณภาพ และปริมาณตรงกับความต้องการของตลาด เช่น การผลิตปลานิล

แปลงเพศ ปลานิลทรูปลอยด์ และการเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีความเค็มต่ำ เป็นต้น (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2557)

1. การแปลงเพศปลานิลด้วยฮอร์โมน 17α -Methyltestosterone

เนื่องจากปลานิลเพศเมียเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วและสามารถวางไข่ได้ตลอดปี จึงโตช้ากว่า ปลานิลเพศผู้ และในช่วงที่ฟักไข่และอนุบาลลูกปลาในปากซึ่งกินเวลาประมาณ 1 เดือน แม่ปลาจะไม่กินอาหาร จึงเป็นปัญหาในระบบการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ซึ่งต้องการปลาขนาดใหญ่และสม่ำเสมอ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคหลายประการเพื่อผลิตพันธุ์ปลานิลเพศผู้ล้วน เพราะการเลี้ยงปลานิลเพศผู้ล้วนจะทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดสม่ำเสมอใกล้เคียงกัน และสามารถควบคุมระยะเวลาในการเลี้ยงได้อีกด้วย เทคนิคการแปลงเพศก็เป็นเทคนิคหนึ่งที่น่าสนใจที่ได้ผล เนื่องจากลูกปลาที่ฟักเป็นตัวใหม่ๆ ยังไม่มีการพัฒนาเป็นเพศใดเพศหนึ่งอย่างชัดเจน การเพิ่มฮอร์โมนเพศจากภายนอกในช่วงเวลาดังกล่าวจึงสามารถควบคุมให้แสดงออกเป็นเพศใดเพศหนึ่งได้ การแปลงเพศปลาสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น การผสมฮอร์โมนในอาหาร และการแช่ลูกปลาในน้ำผสมฮอร์โมน (Fitzpatrick *et al.*, 1998) ซึ่งฮอร์โมน 17α -methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนสังเคราะห์ที่นิยมใช้มากในการแปลงเพศปลาให้เป็นเพศผู้ โดยใช้ฮอร์โมนผสมในอาหารให้กินทันทีที่ฟักไข่แดงของลูกปลา ซึ่งหากกระบวนการต่างๆ ในการแปลงเพศเป็นไปอย่างสมบูรณ์ อาจได้ลูกปลาเพศผู้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Shelton *et al.*, 1981)

มีรายงานการใช้ฮอร์โมน MT เพื่อแปลงเพศปลาหลายชนิด เช่น ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) และปลาหมอเทศข้างลาย (*Tilapia aurea* Steindachner, 1864) โดย Guerrero (1975) ได้ทำการศึกษาในปลาหมอเทศข้างลาย พบว่าการแปลงเพศด้วยฮอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 18 วัน สามารถแปลงเพศปลาหมอเทศข้างลายเป็นเพศผู้ได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อตรวจสอบอวัยวะสืบพันธุ์พบว่าไม่มีการพัฒนาไปเป็นรังไข่เลย อีกทั้งปลาเพศเมียที่ถูกแปลงเพศเป็นเพศผู้แล้วยังสามารถผสมพันธุ์กับปลาเพศเมียปกติได้ด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Clemens and Inslee (1968) ในปลาหมอเทศ พบว่าฮอร์โมน MT สามารถแปลงเพศปลาเพศเมียให้กลายเป็นเพศผู้ได้ และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนปลาแปลงเพศเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ แล้วนำปลาแปลงเพศไปผสมพันธุ์กับปลาเพศเมียปกติ พบว่าลูกที่ได้ทั้งหมดเป็นเพศเมียล้วน ซึ่งผลการศึกษายังชี้ให้เห็นว่าปลาหมอเทศเพศเมียมีลักษณะของเพศเป็นแบบ homogametic sex

นวลมณี และคณะ (2547) ได้ศึกษาวิธีการแปลงเพศปลานิลด้วยฮอร์โมน MT โดยให้ลูกปลากินอาหารผสมฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 21 วัน สามารถให้ผลผลิตลูกปลาเพศผู้สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายเฉลี่ย 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการทดลองของ ไพบูลย์ และ ฉัฐพงษ์ (2547) ที่ศึกษาการแปลงเพศปลานิล โดยให้ฮอร์โมน MT ผสมปลาปนกับลูกปลานิลในระยะที่ถุงไข่แดงยุบ อัตราส่วนฮอร์โมน 60 มิลลิกรัมต่อปลาปน 1 กิโลกรัม ให้อาหารผสมฮอร์โมนวันละ 5 มื้อ ในปริมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีอัตราการแปลงเพศเป็นเพศผู้ 98-100 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการแปลงเพศปลานิลโดยใช้ฮอร์โมน MT ผสมในอาหารให้ลูกปลากินนั้นนอกจากจะสามารถแปลงเพศเป็นเพศผู้ได้สูงแล้ว ยังสามารถทำได้ง่าย และมีค่าใช้จ่ายน้อย จึงเป็นวิธีที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย โดยการแปลงเพศลูกปลาด้วยการให้กินอาหารผสมฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้น 30-60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 21-28 วัน เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไป

แต่การใช้ฮอร์โมน MT ในการแปลงเพศลูกปลานิลยังก่อให้เกิดความกังวลต่อผู้บริโภค เนื่องจากอาจมีการสะสมของปริมาณฮอร์โมนในดินบริเวณก้นบ่อ ทำให้เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และอาจเกิดการสะสมในเนื้อปลา ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งตับและเป็นหมัน แต่ฮอร์โมน MT สามารถถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์และสลายตัวได้เมื่อโดนแสงแดด (Moschet, 2009) โดยมีผู้ทำการศึกษาปริมาณฮอร์โมนตกค้างในปลาแปลงเพศพบว่าหลังจากหยุดให้ลูกปลากินอาหารผสมฮอร์โมนไปแล้ว 24 ชั่วโมง ไม่พบปริมาณของฮอร์โมนตกค้างในเนื้อปลา (ธงชัย และ คณะ, 2554) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อลูกปลากินฮอร์โมนเข้าไปแล้วฮอร์โมนจะถูกย่อยสลายโดยกระบวนการใช้พลังงานของร่างกาย และถูกกำจัดออกอย่างรวดเร็วโดยการขับถ่ายทางอุจจาระ ปัสสาวะ และทางเหงือก (Cravedi *et al.*, 1993) ดังนั้นปลานิลที่ขายอยู่ในท้องตลาดซึ่งมีระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 8 เดือน หลังจากหยุดให้ฮอร์โมน จึงไม่ควรมีฮอร์โมนตกค้างในเนื้อปลาจนเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

2. ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต

2.1 Growth hormone

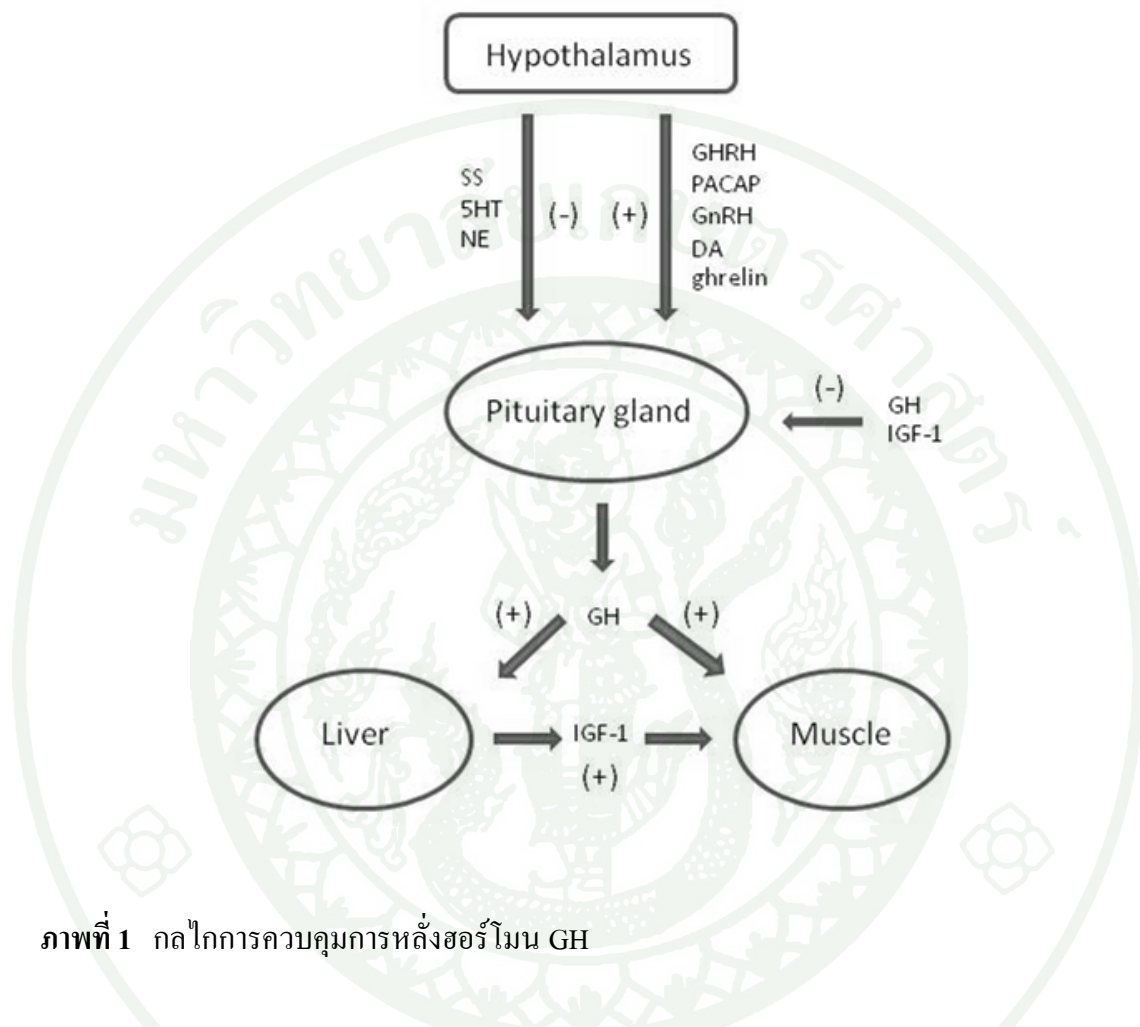
ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (Growth hormone, GH) เป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต เมตาโบลิซึม และการ

สืบพันธุ์ นอกจาก GH จะถูกสร้างจากต่อมใต้สมองแล้วยังสามารถสร้างได้จากต่อมไพเนียล (pineal gland) ต่อมน้ำนม (mammary gland) ส่วนของรก (placenta) และเซลล์ lymphocytes (Butler and Roith, 2001) นอกจากนี้ในปลายังพบว่า GH สามารถสร้างจากโกแนด (gonad) ด้วย เช่น ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Biga *et al.*, 2004) และปลา pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Sciara *et al.*, 2006) เป็นต้น

โครงสร้าง GH ของปลา มีขนาดใกล้เคียงกันมากกว่าในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ โดยมีขนาดประมาณ 21-23 KDa (Venkatesh and Brenner, 1997) เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับของกรดอะมิโนของ GH ในปลากลุ่ม Perciformes และปลากลุ่ม Pleuronectiformes พบว่ามีความคล้ายคลึงกันมากกว่าลำดับของกรดอะมิโนของ GH ในปลากลุ่ม Salmonids และ Cyprinids (Li *et al.*, 2005) มีรายงานการโคลนยีน GH ในปลาหลายชนิดรวมทั้งปลานิล (Rentier-Delrue *et al.*, 1989) และปลาหมอเทศ (Yamaguchi *et al.*, 1991) ซึ่งปลานิลและปลาหมอเทศมีวิวัฒนาการใกล้ชิดกัน โดย GH ของปลานิลและปลาหมอเทศ ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 204 ตัว เท่ากัน แต่มีความแตกต่างกันของกรดอะมิโน 2 ตำแหน่ง ที่ตำแหน่งของ signal peptide เท่านั้น เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์พบว่ามีค่าคล้ายคลึงกันถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Li *et al.* (2005) พบว่า GH ของปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ประกอบด้วย กรดอะมิโน จำนวน 204 ตัว เช่นเดียวกัน

การหลั่ง GH ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนหลายชนิด เช่น Growth hormone releasing hormone (GHRH), Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP), Gonadotropin releasing hormone (GnRH), Dopamine (DA) และ Ghrelin ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการหลั่ง GH ส่วน Somatostatin (SS), serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) และ Norepinephrine (NE) ทำหน้าที่ยับยั้งการหลั่ง GH เป็นต้น (Peter and Chang, 1999; Canosa *et al.*, 2007) กลไกการควบคุมการทำงานของ GH มีความซับซ้อนมาก โดย GH เมื่อถูกสร้างจากต่อมใต้สมองแล้ว ยังมีกลไกในการควบคุมการหลั่ง GH เข้าสู่กระแสเลือดเพื่อทำการออกฤทธิ์ต่อไป GH สามารถควบคุมการเจริญเติบโตทั้งทางตรงและทางอ้อม กล่าวคือ GH เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดจะสามารถเข้าไปจับกับตัวรับสัญญาณที่อวัยวะเป้าหมายกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโต และอีกทางหนึ่งคือ GH เข้าไปจับกับตัวรับสัญญาณที่ตับหรือเนื้อเยื่ออื่นๆ เพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างสารที่เรียกว่า Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ซึ่ง IGF-1 จะไปออกฤทธิ์กับอวัยวะเป้าหมายต่อไป ส่วนใหญ่แล้วผลของ GH จะเกิดจากการออกฤทธิ์ของ IGF-1 และหลังจากที่มีปริมาณของ IGF-1 สูงแล้ว จะมีกลไกในการ

ควบคุมแบบย้อนกลับของ IGF-1 ไปยับยั้งการหลั่ง GH อีกทางหนึ่งด้วย (Perez-Sanchez and Bail, 1999) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 กลไกการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน GH

2.2 Growth hormone releasing hormone (GHRH) และ Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)

ฮอร์โมนหลักที่มีบทบาทกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน GH คือ growth hormone releasing hormone (GHRH) ซึ่งสร้างจากสมองส่วน hypothalamus และถูกค้นพบครั้งแรกในเซลล์เนื้อเยื่อของมนุษย์ (Guillemin *et al.*, 1982) ต่อมาได้มีการค้นพบ pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตได้เช่นกัน โดยเฉพาะในปลา มีรายงานว่า PACAP สามารถกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง GH ได้มากกว่า GHRH (Montero *et al.*, 2000) นอกจากนี้ Parker *et al.* (1997) ได้ทำการเปรียบเทียบผลของ PACAP กับ GHRH

ต่อการหลั่ง GH ในปลา coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) พบว่า GHRH และ PACAP สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง GH ได้ แต่การหลั่ง GH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ PACAP ยิ่ง PACAP มีความเข้มข้นสูง การหลั่ง GH ก็สูงขึ้นด้วย และฤทธิ์ของ PACAP ต่อการกระตุ้นการหลั่ง GH สามารถอยู่ได้นานกว่า GHRH ส่วน GHRH ทำให้มีการหลั่ง GH เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่มีปริมาณต่ำกว่า PACAP และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ GHRH ขึ้น กลับไม่พบความแตกต่างของการหลั่ง GH เลย

ยีน *GHRH* และ *PACAP* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ถูกค้นพบว่าอยู่บนโครโมโซมคนละแท่ง แต่ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่น สัตว์ปีก กบ และปลา พบว่าอยู่ในยีนเดียวกัน หรือมีพรีเคอร์เซอร์ (precursor) เดียวกัน โดยยีน *PACAP* มีรูปแบบการเรียงตัวของกรดอะมิโน 2 แบบ คือ *PACAP*₂₇ (มีกรดอะมิโน 27 ตัว) และ *PACAP*₃₈ (มีกรดอะมิโน 38 ตัว) (Matsuda *et al.*, 1998; Sherwood and Wu, 2005) มีรายงานการโคลนยีน *PACAP* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น มนุษย์ (Kimura *et al.*, 1990) หนู (Ogi *et al.*, 1990) ไก่ (McRory *et al.*, 1997) กบ (Alexandre *et al.*, 2000) ปลา coho salmon (Parker *et al.*, 1993) ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) (McRory *et al.*, 1995) ปลาฆ่าลาย (*Danio rerio*) (Fradinger and Sherwood, 2000) ปลาทอง (*Carassius auratus*) (Leung *et al.*, 1999) และปลาหมอเทศ (Chi-Wei *et al.*, 2007) เป็นต้น ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่ายังไม่มียีน *PACAP* ในปลาฉลาม เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *PACAP* ที่ได้จากสัตว์มีกระดูกสันหลังต่างๆ พบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูง โดยปลาดุกอุยกับมนุษย์มีความคล้ายคลึงกันของยีน *PACAP* ถึง 86 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน *GHRH* ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 46 ตัว (McRory *et al.*, 1997) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังต่างชนิดกันจะมีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกันน้อย โดยมีรายงานว่าในปลาดุกอุยกับมนุษย์มีการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีน *GHRH* คล้ายคลึงกันเพียง 31 เปอร์เซ็นต์ (McRory *et al.*, 1995) แม้กระทั่งในปลาซึ่งพบว่าปลาคออเมริกา (*Ictalurus punctatus*) กับปลากะรังดอกแดง (*Epinephelus coioides*) มีความคล้ายคลึงกัน 66 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น (Yong *et al.*, 2003)

2.3 Sex steroid

นอกเหนือจากฮอร์โมน GHRH แล้ว ยังมีฮอร์โมนชนิดอื่นที่มีบทบาทต่อการหลั่ง GH โดยฮอร์โมนเพศก็มีบทบาทต่อการหลั่ง GH ด้วยเช่นกัน และยังพบว่าฮอร์โมนเพศผู้และฮอร์โมนเพศเมียมีบทบาทต่อการหลั่ง GH ต่างกัน มีรายงานความสัมพันธ์ของฮอร์โมน testosterone

กับระดับของ IGF-1 ในมนุษย์เพศชาย (Erfurth *et al.*, 1996; Pfeilschifter *et al.*, 1996) โดยฮอร์โมนเพศผู้สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง GH จากต่อมใต้สมองสูงขึ้น และเพิ่มการตอบสนองของ IGF-1 ที่สร้างจากตับและเนื้อเยื่อต่างๆ โดยทำให้ IGF-1 ตอบสนองต่อ GH มากขึ้น Gibney *et al.* (2005) ได้รายงานการศึกษาผลของ testosterone และ GH ต่อการแสดงออกของ IGF-1 ในมนุษย์เพศชาย ที่มีการทำงานของต่อมใต้สมองน้อยผิดปกติ โดยศึกษารังไข่ทางกล่ามเนื้อ พบว่าเมื่อร่างกายได้รับ GH อย่างเดียวร่างกายมีการสร้าง IGF-1 เพิ่มขึ้น และเมื่อให้ testosterone ร่วมกับ GH ก็มีการสร้าง IGF-1 เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่ถ้าร่างกายได้รับฮอร์โมน testosterone อย่างเดียว กลับพบว่าไม่มีการสร้าง IGF-1 เพิ่มขึ้น จากการศึกษาจึงสรุปได้ว่าฮอร์โมนเพศชายสามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการหลั่ง IGF-1 เพิ่มขึ้นได้โดยกระตุ้นผ่าน GH เป็นตัวกลาง

ส่วนฮอร์โมนเพศเมียสามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง GH เพิ่มขึ้นทางอ้อม โดยลดการยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) ของ IGF-1 มีรายงานการศึกษาในเด็กผู้หญิงโดยให้กินฮอร์โมน ethinyl-oestradiol (100 ไมโครกรัมต่อวัน) พบว่าร่างกายมีระดับของ IGF-1 ลดลง (Rooman *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Coutant *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาผลของการให้ฮอร์โมน 17 β -estradiol (2 มิลลิกรัม) ในเด็กหญิง พบว่าเด็กหญิงเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ช้า และมีการตอบสนองของ IGF-1 ต่อ GH ลดลง จึงสรุปได้ว่าเมื่อร่างกายได้รับฮอร์โมน oestrogen ในปริมาณสูงจะทำให้ร่างกายลดการตอบสนองของ IGF-1 ต่อ GH

Borski *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาผลของฮอร์โมน 17 β -estradiol และ 5 α -dihydro testosterone ต่อการหลั่ง GH และ IGF-1 ในหนูเพศเมีย พบว่าหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่จะมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และเมื่อหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ได้รับฮอร์โมน 17 β -estradiol มีอัตราการเจริญลดลง ระดับของ IGF-1 ต่ำลง แต่ยังคงมีระดับของ GH สูงอยู่ แต่ในกลุ่มหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ 5 α -dihydrotestosterone มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ระดับของ IGF-1 เพิ่มขึ้น มีปริมาณการสร้าง GH จากต่อมใต้สมองสูงขึ้น แต่เมื่อดูในกระแสเลือดกลับมีปริมาณ GH ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก 5 α -dihydrotestosterone กระตุ้นให้ IGF-1 มีการตอบสนองต่อ GH มากขึ้นนั่นเอง

ในปลาพบว่าระดับของ GH มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมนเพศมีอิทธิพลต่อการหลั่ง GH แต่ยังไม่พบว่ามีรายงานรูปแบบของการหลั่ง GH ในแต่ละเพศ อย่างไรก็ตามในปลาหมอเทศ มีรายงานว่าฮอร์โมน MT สามารถเพิ่มการผลิต GH ในต่อมใต้สมองได้ (Melamed *et al.*, 1995) สอดคล้องกับรายงานของ Riley *et al.* (2002)

ซึ่งศึกษาผลของฮอร์โมน MT ในปลาหมอคอกเช่นเดียวกัน พบว่าฮอร์โมน MT (10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) มีผลทำให้ปลาที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น และมีระดับของ GH mRNA สูงกว่าปลาหมอคอกที่ไม่ได้รับฮอร์โมน แม้ว่าระดับของ GH ในกระแสเลือดจะไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนมีระดับของ IGF-1 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมน

มีรายงานการศึกษาของ Larsen *et al.* (2004) ในปลา coho salmon หลังจากได้รับฮอร์โมนเพศผู้ testosterone และ 11-ketotestosterone แล้ว พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น และเมื่อตรวจสอบในกระแสเลือดพบว่าการหลั่ง IGF-1 เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างของปริมาณ GH ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมนเพศผู้มีบทบาทควบคุมการหลั่ง IGF-1 และฮอร์โมนเพศผู้อาจมีผลให้ระดับมีการตอบสนองต่อ GH มากขึ้นด้วย

ในปลาทอง (Trudeau *et al.*, 1992) และปลา trout (Holloway and Leatherland, 1997) ฮอร์โมน estradiol สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง GH ที่ต่อมใต้สมอง และมีการหลั่ง GH เข้าสู่กระแสโลหิตได้ โดยเฉพาะมีการศึกษาในปลาทองเพศเมีย พบว่าฮอร์โมน estradiol ไม่มีผลกระตุ้นการสร้าง GH mRNA ในต่อมใต้สมอง แต่สามารถกระตุ้นให้มีการสร้างและหลั่ง GH เพิ่มขึ้น (Zou *et al.*, 1997) และการฝังฮอร์โมน estradiol ยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ *GHRH-PACAP* mRNA ที่ต่อมใต้สมองได้อีกด้วย (Trudeau *et al.*, 1992) ส่วนฮอร์โมน testosterone มีผลต่อการเพิ่มระดับของ GH mRNA ในต่อมใต้สมองของปลาทอง และมีผลต่อการหลั่ง IGF-1 ด้วยเช่นกัน (Huggard *et al.*, 1996)

3. ผลของฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตต่อระบบเมตาโบลิซึมและระบบภูมิคุ้มกัน

ในมนุษย์มีรายงานว่าฮอร์โมน GH มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมขบวนการต่างๆ ในร่างกายที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต รวมทั้งกระบวนการเมตาโบลิซึมในร่างกาย ทั้งโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดย GH กระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนและลดปฏิกิริยาการเผาผลาญโปรตีน กระตุ้นการสลายตัวของไตรกลีเซอไรด์ (lipolysis) ภายในเซลล์ไขมันชนิดอะดิโปไซต์ (adipocyte) และช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ (Moller and Jorgensen, 2009)

Mauras *et al.* (2003) รายงานการศึกษาผลของฮอร์โมน testosterone และ GH ต่อระบบเมตาโบลิซึมของโปรตีน ไขมัน และกลูโคส ในเด็กชายที่มีความบกพร่องของการสร้าง GH พบว่า testosterone สามารถกระตุ้นให้ร่างกายเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ leucine ลดลง และเมื่อมีการให้ testosterone ร่วมกับ GH ก็ยิ่งเสริมฤทธิ์ให้เพิ่มมากขึ้น และยังช่วยทำให้ร่างกายมีระดับของกรดไขมันอิสระและกลูโคสเพิ่มขึ้นด้วย สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ferrando *et al.* (1998) ซึ่งกล่าวถึงผลของ testosterone ว่ากระตุ้นให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น

การศึกษาเกี่ยวกับผลของ GH ต่อระบบเมตาโบลิซึมในปลายังมีไม่มาก แต่ก็ให้ผลเช่นเดียวกับในมนุษย์ Sheridan (1986) ได้ศึกษาผลของ GH ต่อขบวนการสลายไขมันในตับ (lipolysis) โดยตรวจสอบกิจกรรมของเอ็นไซม์ triacetyl glycerol lipase พบว่า GH ทำให้มีกิจกรรมของเอ็นไซม์ triacetyl glycerol lipase สูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่า GH มีผลในการกระตุ้นให้เกิดการสลายไขมัน และในปลานิลยังพบว่าส่งผลต่อการลดการสังเคราะห์ไกลโคเจนในตับ (Leung *et al.*, 1991) ในปลา rainbow trout พบว่า GH สามารถเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนในกล้ามเนื้อและบางเนื้อเยื่อ เช่น ตับและกระเพาะอาหาร ด้วย (Foster *et al.*, 1991)

ในปลาพบว่าระดับของ GH มีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มสูงขึ้นหรือมีการเลี้ยงกันอย่างหนาแน่น ทำให้เกิดความเครียด ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ได้มีการศึกษาผลของ GH โดยนำสมองของปลาคาร์พมาสกัดแล้วให้กับปลา characin (*Astyanax mexicanus*) พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ในตับและม้ามได้ (Rasquin, 1951) ในปลาหมอเทศ (Leedom *et al.*, 2002) และปลา rainbow trout (Biga *et al.*, 2005) พบว่า GH ไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตเท่าที่นั่นแต่ยังมีผลต่อการผลิตแอนติบอดีด้วย และ GH ยังส่งผลกระทบต่ออนุภาคต่างๆ ของ leucocyte อีกด้วย ซึ่งชี้ให้เห็นถึงผลของ GH ต่อกิจกรรม phagocytotic (Sakai *et al.*, 1996) นอกจากนี้เมื่อมีการฉีด GH ให้กับปลา trout สามารถเพิ่มกิจกรรมของ lysozyme ในพลาสมา และคงระดับของ Immunoglobulin (Ig) ในระบบหมุนเวียนโลหิตด้วยเมื่อปลาเกิดความเครียด (Yada *et al.*, 2001)

ฮอร์โมนเพศสามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการหลั่ง GH เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วย มีการศึกษาในปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata*) พบว่าฮอร์โมน testosterone สามารถกระตุ้นให้ปลามีการสร้างโปรตีนคอมพลีเมนต์ (complement) เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อระดับของ IgM ส่วนฮอร์โมน estradiol มีรายงานว่าฮอร์โมน estradiol มีผลต่อการสร้าง

complement ในวันแรกเท่านั้น หลังจากนั้นก็จะลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน estradiol มีผลยับยั้งกิจกรรมของ complement และยับยั้งการสังเคราะห์ IgM (Cuesta *et al.*, 2007) แต่การศึกษาในปลานิลกลับพบว่าฮอร์โมน testosterone และ estradiol ไม่มีผลต่อการเกิดกิจกรรม phagocytosis (Law *et al.*, 2001) ดังนั้นผลของฮอร์โมนเพศต่อระบบภูมิคุ้มกันจึงยังต้องมีการศึกษาและทำความเข้าใจต่อไป

จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตมีผลต่อระบบเมตาโบลิซึมและระบบภูมิคุ้มกันของปลา การแปลงเพศปลานิลหรือการได้รับฮอร์โมน MT อาจทำให้ปลามีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น มีการหลั่ง GH เพิ่มมากขึ้น และอาจส่งผลกระทบต่อระบบเมตาโบลิซึมและระบบภูมิคุ้มกันอีกทอดหนึ่งด้วย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงเป็นการทำความเข้าใจถึงบทบาทของเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ต่อระบบสรีรวิทยาต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ในการอธิบายกระบวนการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในปลานิลและสัตว์น้ำอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

1. การทดลองที่หนึ่ง เพื่อศึกษาผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้ อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP GHRH* และ *GH* ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลง เพศ

2. การทดลองที่สอง เพื่อศึกษาผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและ ชีวเคมีในเลือด ค่าทางภูมิคุ้มกัน และกายวิภาคของลำไส้ ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลง เพศ

1. การทดลองที่หนึ่ง ศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP GHRH* และ *GH* ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และ ปลาแปลงเพศ

1.1 การโคลนยีน *GHRH-PACAP GH* ด้วยวิธี 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends และการโคลนยีน *β -actin* ด้วยวิธี Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

1.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างสมองส่วน diencephalon และต่อมใต้สมองจากปลานิล ขนาด ประมาณ 500 กรัม จำนวน 2 ตัว วางบนน้ำแข็งแห้งทันที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสกัด total RNA

1.1.2 การสกัด total RNA

นำหลอดที่บรรจุสมองปลานิลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ออกมาแช่ ลงในน้ำแข็ง เติมนสาร trizol (Invitrogen) 1 มิลลิลิตร บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมน chloroform 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที แล้วนำไป

ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติมสาร isopropanol ลงไป 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วใช้ vacuum pump ดูดสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนด้านล่าง ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงต่อไปอีกที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้งให้หมด จากนั้นตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ละลายตะกอนด้วย DEPC water ปริมาตร 225 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายหลอดลงในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย 10X DNase buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ DNase I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย phenol และ chloroform อย่างละ 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายสารละลายด้านบนลงในหลอดใหม่ เติมสารละลาย 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้ vacuum pump ดูดสารละลายทิ้ง เหลือแต่ตะกอนด้านล่าง ทำการล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงต่อไปอีกที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้งให้หมด ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ละลายตะกอนด้วย DEPC water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร จะได้ total RNA ตามต้องการ จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ total RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แบ่ง total RNA ออกเป็นหลอดละ 10 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA

1.1.3 การสังเคราะห์ the first strand cDNA จาก total RNA

ทำการสังเคราะห์ the first strand cDNA ใช้ชุด kit สำเร็จรูป first-strand cDNA synthesis kit (Amersham bioscience) ตามวิธีของบริษัท โดยนำ (5 µg/µl) total RNA ปริมาตร 7 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้ายหลอดลงในน้ำแข็งทันที

ทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย bulk first-strand cDNA reaction mixes จำนวน 5 ไมโครลิตร สารละลาย DTT 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ dT-UPM (0.5 µg/3 µl) (5'-AAGCAGTGGTATC AACGCAGAGTACTTNN-3') ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที และเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

1.1.4 การโคลน complementary DNA ของยีน *GHRH PACAP* และ *GH* ด้วยวิธี 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends

เทคนิค 3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE) ประกอบด้วย การทำ PCR 2 ขั้นตอน ได้แก่ การทำ PCR ในขั้นตอน Primary PCR และ Nested PCR

ก. การออกแบบไพรเมอร์

รวบรวมข้อมูลลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน *GHRH PACAP* และ *GH* จากสัตว์มีกระดูกสันหลังต่างๆ ในฐานข้อมูล National center for biotechnology information, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) แล้วใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการค้นหาส่วนที่มีความคล้ายคลึงกันสูง (conserved region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) จากนั้นทำการออกแบบ degenerated primers เพื่อทำการศึกษาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี 3'-RACE

ตำแหน่งและลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาลำดับการเรียงตัวของ complementary DNA (cDNA) ยีน *GHRH PACAP* และ *GH* แสดงในภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

```

catfish -----
channel -----
tilapia GCACACACGCAAACACGCACTGCCACAGCCGCGCCGGATCACAACCTACAGCACAGCCT
orange-spotted -----
zebrafish -----

P F1: CTCA
catfish -----ATGGCCAAATCTAGTAGAGCTACTTTGGCTCTGCTCA
channel -----ATGGCCAAATCTAGTAGAGCTACTTTGGCTCTGCTCA
tilapia CCTCTCTGCTTTCCTGCTATAGCATGGCCAGTTCGAGTAAAGCGACTTTAATCTTGCTCA
orange-spotted -----ATGGCCAGTTCGAGTAAAGCCACTTTAATCTTGCTCG
zebrafish -----GCCGCAGAATGATTACGAGCAGCAAAACGACTCTTGCTTTCCTCA
***. * : ** * . * * * * . * * * .

TCTACGGGATCTTWTAT P F2: CCCCC
catfish TCTACGGGATCTTAAATGCGCTACAGC---CAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA
channel TCTACGGGATCTTAAATGCGCTACAGC---CAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA
tilapia TCTACGGGATCTTAAATGCGCTACAGC---CAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA
orange-spotted TCTACGGGATCTTAAATGCGCTACAGC---CAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA
zebrafish TCTATGGGCTCCTAGTTCATGCAATG---TGTGTTGCGCTCTG-----AGTTACCCGA
**** * . * * * : * * * . * * * * . * * * * . * * * * *

AGATGAGACTTGAAA
catfish ATATGAGGCTAGACAACGACGCTGTTTCGGGGACGAGGGAAACTCGTTAAGTGAAGTGTCTCCT
channel ACATGAGGCTAGAAAACGACGCTGTTTCGGGGACGAGGGAAACTCGTTAAGTGAAGTGTCTCCT
tilapia AGATGAGACTTGAAAACGACGCTGTTTCGGGGACGAGGGAAACTCGTTAAGTGAAGTGTCTCCT
orange-spotted AGATGAGACTTGAAAACGACGCTGTTTCGGGGACGAGGGAAACTCGTTAAGTGAAGTGTCTCCT
zebrafish AAATCAGAATGGGACTGACAGGATTTGATGAGGAGGGAAACTCATTAAACGGATGTAACAT
* * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * * . * * * * .

ACGAGCCGGACACGATGAGCGCGCGCAGTCTCCAGCCCTCCCTGAAGACGCATACACAC
catfish ATGAGCCGGACACGATGAGCGCGCGCAGTCTCCAGCCCTCCCTGAAGACGCATACACAC
channel ATGAGCCGGACACGATGAGCGCGCGCAGTCTCCAGCCCTCCCTGAAGACGCATACACAC
tilapia TTGATAGTGATCAGATTGCTATACGAAGCCCGCCATCCTTAAACGACGACGCATACACCC
orange-spotted TTGATAGTGATCAGATTGCTATACGAAGCCCGCCATCCTTAAACGACGACGCATACACCC
zebrafish TTGACAGTGACCAGATCACTATACGAAGCTCTCCTACAGTCACTGAAGACGCATACACGTT
: * * . * * . * * * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TGTACTATCCGCCCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGCCT
catfish TGTATTATCCTCCCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGCCT
channel TGTATTATCCTCCCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGCCT
tilapia TATACTACCCACAGGAGAAGAGACCAGAAAGGCATGCTGAGGAAGAATTAGATAGAGCCT
orange-spotted TCTACTACCCACAGGAGAAGAGACCAGAAAGGCATGCTGAGGAAGAATTAGATAGAGCCT
zebrafish TATTTAGTCTCCATCAAAAAGACTGGAAGGCACGCTGACGGGATGTTTAAATAAGCCT
* * : . * * * . . . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

TGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTC
catfish TGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTC
channel TGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTC
tilapia TGAGGGAGATCCTGGGTCACTTAAACAGCGAGACATTATCTGCATTCTCTGATGACAATTC
orange-spotted TGAGGGAGATCCTGGGTCACTTAAACAGCGAGACATTATCTGCATTCTCTGATGACAATTC
zebrafish ACAGGAAAGCGCTCGGCCAGTTATCCGCGAGGAAGTACCTGCATACACTGATGGCAAAAC
: * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GCGTAGGTGAGGAAGAAGAGGATGAAGAGGACTCGGAGCCACTGTGGAAGCGCCACTCGG
catfish GTGTAGGTGAGGAAGAAGAGGACGAGGAAGACTCGGAGCCACTGTGGAAGCGCCACTCGG
channel GTGCAGGTGACGACAACAGCATGGAGGAAGAATCAGAGCCCTTATCCAAAAGACACTCAG
tilapia GTGCAGGTGAGGAAGAAGAGGATGAAGAGGACTCGGAGCCACTGTGGAAGCGCCACTCGG
orange-spotted GTGCAGGTGAGGAAGAAGAGGATGAAGAGGACTCGGAGCCCTTATCCAAAAGACATTTCAG
zebrafish GTGTTGAGGAGGGAGCACAACAGAAGATGACAATGAACCACTCTCAAAAAGTCACTCGG
* * : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GHRH-PACAP* ในปลาคูอุย ปลากดอเมริกา ปลานมเทศ ปลากะรังดอกแดง และปลาหมี่ลาย และตำแหน่งของไพรเมอร์ สำหรับโคลน cDNA


```

niloticus      ATGAACTCAGTCGTCTCCTCGTGTGCGGTTGTGTGTTGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATC
mossambicus   ATGAACTCAGTCGTCTCCTCCAGCTGTGCGGTTGTGTGTTGGGCGTCTCCTCTCAGCAGATC
orange-spotted ATGGACCGAGTCGTCTCCTCGTGTGTCAGTAGTGTCTCTGGGTGTTTCCTCTCAGCCAATC
gilthead      ATGGACAGAGTGGTGCTCATGTGTGCGGTGATGTCTCTGGGCGTCTCTTCTCAGCCGATC
*** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

G F1: GCCAGCGTTGTCTCCAT
ACAGACAGCCAGCGTTGTCTCCATGTCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTC
mossambicus   ACAGACAGCCAGCGTTGTCTCCATGTCAGTCAACAGAGTCACGCACCTGCACCTGCTC
orange-spotted ACAGACAGCCAGCGTCTGTCTCCATCGCCGTCAGCAGAGTTCAACATCTCCACCTGCTT
gilthead      ACAGACAGCCAGCGTCTGTCTCCATCGCTGTGTCAGCAGAGTTCAACACCTCCACCTGCTG
*****

G F2: CAGAGACTTCTCGGACT
GCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACGGAGGAGCAACGTCAGCTC
mossambicus   GCCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACGGAGGAGCAACGTCAGCTC
orange-spotted GCTCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGAGAGCACTCTGCAGACGGAGGAGCAGCAGCTC
gilthead      GCTCAGAGACTCTTCTCGGACTTTGAGAGCTCTCTGCAGACGGAGGAGCAGCAGCTC
** *****

AACAAAATCTTCTGCAGGACTTCTGCAACTCTGATTACATCATCAGCCGATCGACAAA
niloticus     AACAAAATCTTCTGCAGGACTTCTGCAACTCTGATTACATCATCAGCCGATCGACAAA
mossambicus   AACAAAATCTTCTGCAGGACTTCTGCAACTCTGATTACATCATCAGCCGATCGACAAA
orange-spotted AACAGATCTTCTGCAGGACTTCTGTAACTCTGATTACATCATCAGCCCATCGACAAG
gilthead      AACAAAATCTTCTGCAGGATTTCTGTAACTCTGATTACATCATCAGCCCATCGACAAG
*****

CACGAGACGCAGCGCAGCTCGGTCCTGAAGCTGCTGTCGATCTCCTATGGACTGGTTGAG
niloticus     CACGAGACTCAGCGCAGCTCGGTCCTGAAGCTGCTGTCGATCTCTTACGGACTGGTTGAG
mossambicus   CACGAGACTCAGCGCAGCTCGGTCCTGAAGCTGCTGTCGATCTCCTATCGGTTGGTGGAG
orange-spotted CACGAGACGCAGCGCAGCTCAGTGTGAAGCTGCTGTCGATCTCCTATCGGTTGGTGGAG
gilthead      CACGAGACGCAGCGCAGCTCAGTGTGAAGCTGCTGTCGATCTCTTATCGATTGGTGGAG
*****

TCCTGGGAGTTTCCAGTCGCTCTCTGTCTGGAGTTCTCTCTGAGGAACAGATTTCA
niloticus     TCCTGGGAGTTTCCAGTCGCTCTCTGTCTGGAGTTCTCTCTGAGGAACAGATTTCA
mossambicus   TCCTGGGAGTTTCCAGTCGCTCTCTGTCTGGAGTTCTCTCTGAGGAACAGATTTCA
orange-spotted TCCTGGGAGTTTCCAGTCGCTCTCTGTCTGGAGTTCTCTCTGAGGAACAGATTTCT
gilthead      TCCTGGGAGTTTCCAGTCGCTCTCTGTCTGGAGTTCTCTCTGAGGAACAGATTTCA
** *****

CCAAGGCTGTCTGAGCTTAAACGGGAATCTTGCTGCTGATCAGGGCCAATCAGGATGAA
niloticus     CCAAGGCTATCTGAGCTTAAACGGGAATCTTGCTGCTGATCAGGGCCAATCAGGATGAA
mossambicus   CCAAGGCTATCTGAGCTTAAACGGGAATCTTGCTGCTGATCAGGGCCAATCAGGATGAA
orange-spotted CCCAAACTGTCTGAATTGAAGACGGGATCCTGCTGCTGATCAGGGCCAATCAGGACGGA
gilthead      CCCAAACTGTCTGAGCTGAAGACGGGATCCTGCTGCTGATCAGGGCCAATCAGGACGGA
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCAGCTCCTTACGGAACTATTATCAA
niloticus     GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCAGCTCCTTACGGAACTATTATCAA
mossambicus   GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCAGCTCCTTACGGAACTATTATCAA
orange-spotted GCGGAGCTCTTCCCTGACAGCTCCGCCCTCCAGCTGGCTCCTTATGGAACTATTATCAG
gilthead      GCAGAGATCTTCCCTGATAGCTCCGCCCTCCAGCTGGCTCCTTATGGAACTACTACCAA
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

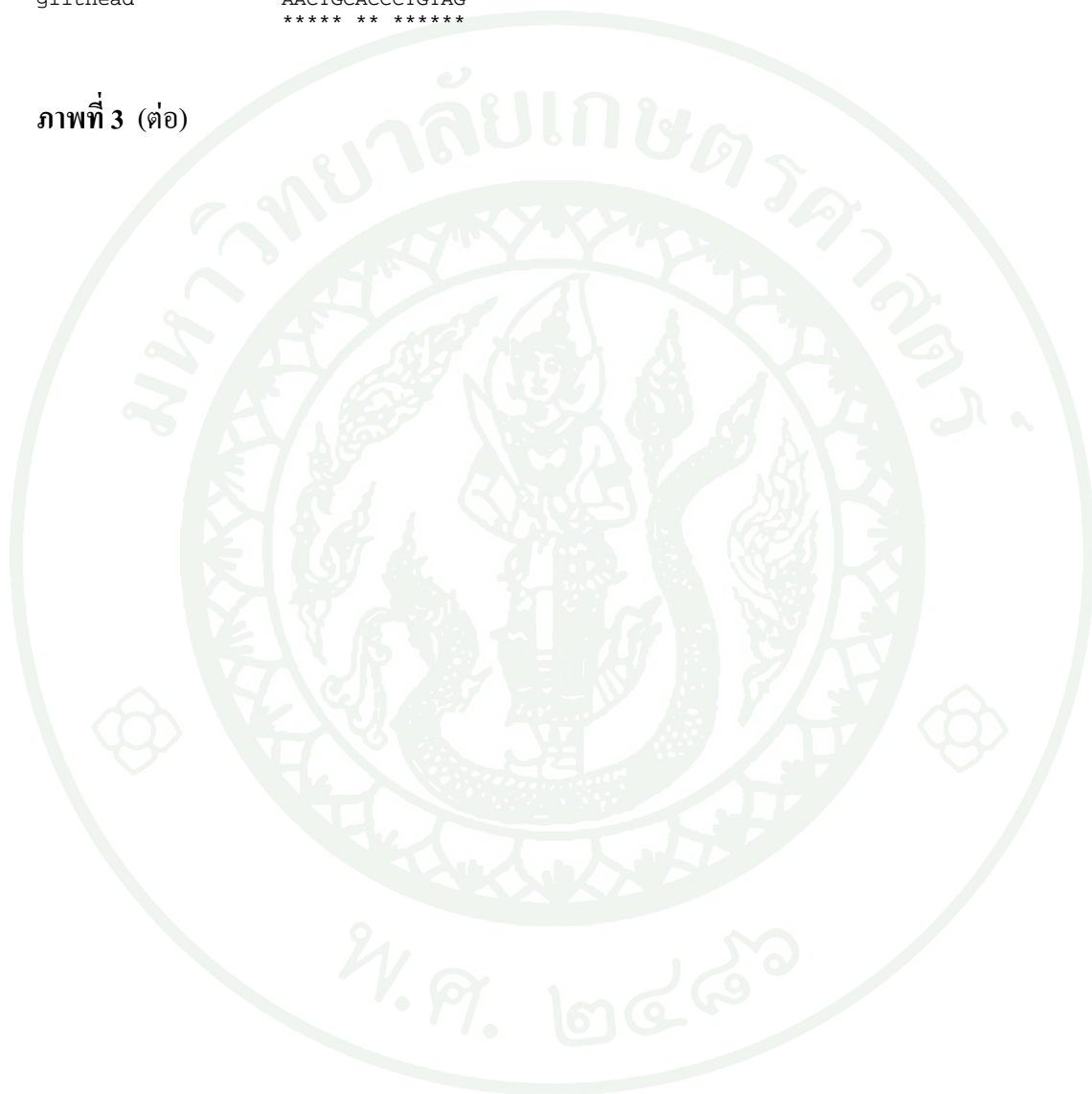
AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG
niloticus     AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG
mossambicus   AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG
orange-spotted AGTCTGGGACCGCAGAGTCACTGCGACGAACGTACGAACGTGCTGGCTTGCTTCAAGAAA
gilthead      AGTCTGGGACCGCAGAGTCACTGCGACGAACGTACGAACGTGCTGGCTTGCTTCAAGAAA
*****

```

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน GH ในปลานิล ปลาทอมเทศ ปลากะรังดอกแดง และปลา gilthead sea bream และตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับโคลน cDNA ของยีน GH

niloticus	GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA
mossambicus	GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAGGCA
orange-spotted	GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTGGCTAAATGTCGACTCTCTCCTGAGGCC
gilthead	GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTGGCAAAATGTAGACTCTCTCCAGAGGCC
	***** ** ***** ***** ** **
niloticus	AACTGCACTCTGTAG
mossambicus	AACTGCACTCTGTAG
orange-spotted	AACTGTACCCTGTAG
gilthead	AACTGCACCCTGTAG
	**** ** *****

ภาพที่ 3 (ต่อ)



ข. การทำ Primary PCR เพื่อโคลนยีน *GHRH-PACAP* และ *GH*

นำ the first strand cDNA ที่ได้มาเป็น template สำหรับสังเคราะห์ด้านปลาย 3' ของยีน *GHRH-PACAP* และ *GH* โดยใช้ไพรเมอร์ UPM-I (5'-TACGACTCACTA TAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') เป็น reverse primer และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้เป็น forward primers ในการทำปฏิกิริยา Primary PCR (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 Forward primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *GHRH-PACAP* และ *GH* ใน Primary PCR

ยีน	Forward primers
<i>GHRH-PACAP</i>	P F1 : 5' - CTCATCTACGGGATCTTWAT - 3'
<i>GH</i>	G F1 : 5' - GCCAGCGTTTGTCTCCAT - 3'

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร

10X PCR buffer	1	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	0.8	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1	ไมโครลิตร
10 μM reverse primer	1	ไมโครลิตร
5 U/μl EX- <i>Taq</i> DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
PCR grade water	5.15	ไมโครลิตร
template	1	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง thermal cycler ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงาน ดังนี้ ช่วงแรก ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ในช่วงที่สอง ขึ้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขึ้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขึ้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และช่วงที่สาม ที่อุณหภูมิ 72

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ แล้วเก็บ PCR product ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณ Target DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE (Tris-boric-EDTA) ที่มี (3 ng/μl) ethidium bromide เคลื่อนที่ภายใต้กระแสไฟฟ้า 80 มิลลิแอมแปร์ ตรวจสอบแถบแบนของ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา Primary PCR มาเป็น template ในการทำปฏิกิริยาในรอบถัดไป (Nested PCR) โดยนำ PCR product มาเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 ใช้ไพรเมอร์ NUP (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3') เป็น reverse primer และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้เป็น forward primers ในการทำปฏิกิริยา (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 Forward primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *GHRH-PACAP* และ *GH* ใน Nested PCR

ยีน	Forward primers
<i>GHRH-PACAP</i>	P F2 : 5' - CCCCAAGATGAGACTTGAAA - 3'
<i>GH</i>	G F2 : 5' - CAGAGACTCTTCTCGGACT - 3'

ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร

10 X PCR buffer	1	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	0.8	ไมโครลิตร
10 μM forward primer	1	ไมโครลิตร
10 μM reverse primer	1	ไมโครลิตร
5 U/μl <i>EX-Taq</i> DNA polymerase	0.05	ไมโครลิตร
PCR grade water	5.15	ไมโครลิตร
template	1	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง thermal cycler กำหนดให้มีสภาวะการทำงานเช่นเดียวกับรอบที่หนึ่ง ทำการตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยา ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ที่มี (3 ng/ μ l) ethidium bromide เคลื่อนที่ภายใต้กระแสไฟฟ้า 80 มิลลิแอมแปร์ ตรวจสอบแถบแบนของ DNA ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ค. การสกัด cDNA ออกจากชิ้นเจลอะกาโรส (agarose gel) และการทำให้บริสุทธิ์

หลังจากตรวจสอบแถบแบน DNA และได้ขนาดของ DNA ที่คาดว่าจะเป็นส่วนชิ้นของ DNA ของยีน *GHRH-PACAP GH* และ β actin จึงทำการตัดแถบแบนใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสกัด DNA จาก agarose gel ด้วย hiyield™ gel/PCR DNA extraction kit (Qiagen) ตามวิธีของบริษัท ทำการซ้มน้ำหนักเจล แล้วเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตรเป็น 3 เท่า ของปริมาตรเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เขย่าทุก 2-3 นาที เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 1 เท่า ของเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดลงใน column ที่ให้มาในชุด kit ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วเติมสารละลาย QG buffer ลงใน column อีก 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีก 1 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงใน column 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นปั่นเหวี่ยงต่ออีก 1 นาที ย้าย column ไปยังหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม PCR grade water 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อีก 1 นาที จะได้ DNA ที่ต้องการ นำไปตรวจสอบขนาดของ DNA ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

ค. การเชื่อมต่อชิ้นส่วน cDNA กับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEMT-easy เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม

ทำการเชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA กับเวกเตอร์ pGEMT-easy โดยนำ DNA ที่สกัดได้มา 3.5 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเวกเตอร์ pGEMT-easy (Promega) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 2X ligation buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร และ

T4 ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยการดูดสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ฉ. การเตรียม competent cells

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 (Promega) มา streak บน LB plate และนำไปบ่มเชื้อในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตร 5 มิลลิตร บ่มเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง วันต่อมา นำเชื้อแบคทีเรียจากหลอดทดลองมา 250 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOB ปริมาตร 60 มิลลิตร บ่มเชื้อในตู้เลี้ยงเชื้อแบบเขย่า ที่มีความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ในตู้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นเวลาที่เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตถึงระยะ log phase หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงเทใส่หลอด falcon tube ขนาด 50 มิลลิตร และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย จากนั้นใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 3 ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเทส่วนของสารละลายทิ้งเหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอนแบคทีเรีย และใส่สาร transformation buffer 1 ส่วนต่อ 12.5 ส่วน ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการละลายตะกอนแบคทีเรียโดยการเขย่าหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาใส่สาร DMSO 168 ไมโครลิตร เพื่อรักษาสภาพของเซลล์แบคทีเรียในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการหยดทีละหยดและทำการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการแบ่งออกเป็นส่วนๆ ใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร เพื่อหลีกเลี่ยงการแช่แข็งและการละลายหลายๆ ครั้ง และเก็บ competent cell ในตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส

ง. การนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่แบคทีเรีย

ใช้วิธีการ heat shock transformation โดยนำ competent cells (*E. coli* สายพันธุ์ JM109) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ ligation product 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วยการคนสารละลายขึ้นลงหลายๆ ครั้ง แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดที่มี competent cells บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที ย้ายลงในน้ำแข็งทันที เป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที แล้วจึงเติม super optimal culture medium (SOC) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ลงในหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำสารละลาย 100 ไมโครลิตร เทลงบนอาหารแข็ง 2XYT medium ที่มีสารละลาย x-gal IPTG และ ampicillin ผสมอยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

จ. การตรวจสอบพลาสมิดด้วยวิธีการอย่างง่าย

ตรวจสอบโคโลนีที่มี DNA ลูกผสม อย่างง่าย โดยวิธี cracking เลือกลูกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะมีเวกเตอร์ลูกผสมอยู่ โดยใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยเชื้อลงที่ก้นหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง 2XYT medium ที่มีสารละลาย x-gal, IPTG และ ampicillin ผสมอยู่ นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ส่วนเชื้อในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย cracking buffer (20% saccharose, 200 mM NaOH และ 0.5% SDS) 7.5 ไมโครลิตร และ 10 mM EDTA 7.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม loading buffer (2 M KCL และ 50% 6X loading dye) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายที่ได้ 10 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบด้วย 0.7% agarose gel โดยใช้โคโลนีสีฟ้าเป็นตัวควบคุม (control)

ฉ. การสกัดพลาสมิด

นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการตรวจสอบแล้วไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT medium ที่มี ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เทเชื้อแบคทีเรียลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500

รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูอาหารด้านบนทิ้ง เหลือแต่ตะกอนละลายเชื้อใน solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA และ 2 mg/ml lysozyme) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติม solution II (0.2 N NaOH และ 1% SDS) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดคว่ำหลายหลายๆ ครั้ง เบาๆ จนได้สารละลายใส เติม solution III (3 M potassium acetate, pH 5.2) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดคว่ำหลายหลายๆ ครั้ง จนเห็นตะกอนสีขาว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูส่วนใสด้านบนลงในหลอดใหม่ เติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้ vacuum pump ดูดสารละลายทิ้ง เหลือแต่ตะกอนด้านล่าง ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงต่อไปอีกที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้งให้หมด ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 1X TE ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เติม RNase A (10 mg/ μ l) 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย phenol และ chloroform อย่างละ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายด้านบนลงในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย 3 M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใช้ vacuum pump ดูดสารละลายทิ้ง เหลือแต่ตะกอนด้านล่าง ล้างตะกอนด้วย 80% ethanol 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงต่อไปอีกที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูสารละลายทิ้งให้หมด ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 5-10 นาที ละลายตะกอนด้วย PCR grade water 30 ไมโครลิตร จะได้พลาสติกตามต้องการ จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บพลาสติกไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ช. การตรวจสอบพลาสติกลูกผสมด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

ตรวจสอบพลาสติกลูกผสมด้วยการตัดด้วย *EcoRI* digestion โดยนำพลาสติกที่สกัดได้ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X buffer 1 ไมโครลิตร PCR grade water 5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ *EcoRI* 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2

ชั่วโมง ตรวจสอบการตัดด้วย 2% agarose gel electrophoresis นำพลาสมิดที่ผ่านการตรวจสอบแล้วว่ามีส่วน cDNA ที่ต้องการ วิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี

ซ. การวิเคราะห์และเปรียบเทียบการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลการเรียงตัวนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ของเวกเตอร์และไพรเมอร์ออก โดยใช้โปรแกรม Gyntyx version 7.0 หลังจากนั้นนำนิวคลีโอไทด์ที่เหลือไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่บันทึกไว้ใน GenBank database โดยใช้โปรแกรม blastn ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านการเปรียบเทียบแล้วให้ผลเป็นยีน *GHRH PACAP* และ *GH* β ทำการ alignment กับลำดับการเรียงตัวนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีนดังกล่าวในฐานข้อมูล GenBank เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ต่อไป

1.1.5 การโคลนยีน β actin ด้วยวิธี reverse transcriptase-polymerase chain reaction

ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน β -actin ของปลานิล โดยใช้ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank (EF206801.1) จากนั้นทำการโคลนยีนด้วยวิธี Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) ตามวิธีการในข้อ 1.1.4 โดยใช้ cDNA ที่ได้จากข้อ 1.1.3 โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีน β actin

Primer	Sequences
A F	5'-ACTACCTCATCAAGATCCTG-3'
AR	5'-CTGCTGGAAGTTGGACAGGGA-3'

ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ตามวิธีการในข้อ ข. จากนั้นทำการสกัด cDNA ที่คาดว่าจะเป็ยีน β -actin จากชิ้นส่วนอะกาโรสเจลและทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการข้อ ค. แล้วทำการ

เชื่อมต่อกันส่วน cDNA กับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEMT-easy เพื่อสร้างพลาสมิดลูกผสม ตามวิธีการข้อ ค. และนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ตามวิธีการข้อ ง. แล้วจึงทำการตรวจสอบพลาสมิดด้วยวิธีการอย่างง่าย (cracking) ตามวิธีการข้อ จ. จากนั้นทำการเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียที่คาดว่าจะมีพลาสมิดลูกผสมอยู่ภายในเซลล์และทำการสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรีย ตามวิธีการข้อ ฉ. ตรวจสอบพลาสมิดลูกผสมที่สกัดได้ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ตามวิธีการข้อ ช. จากนั้นจึงส่งพลาสมิดลูกผสมนั้นไปหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์และทำการเปรียบเทียบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับในฐานข้อมูล GenBank ตามวิธีการข้อ ซ.

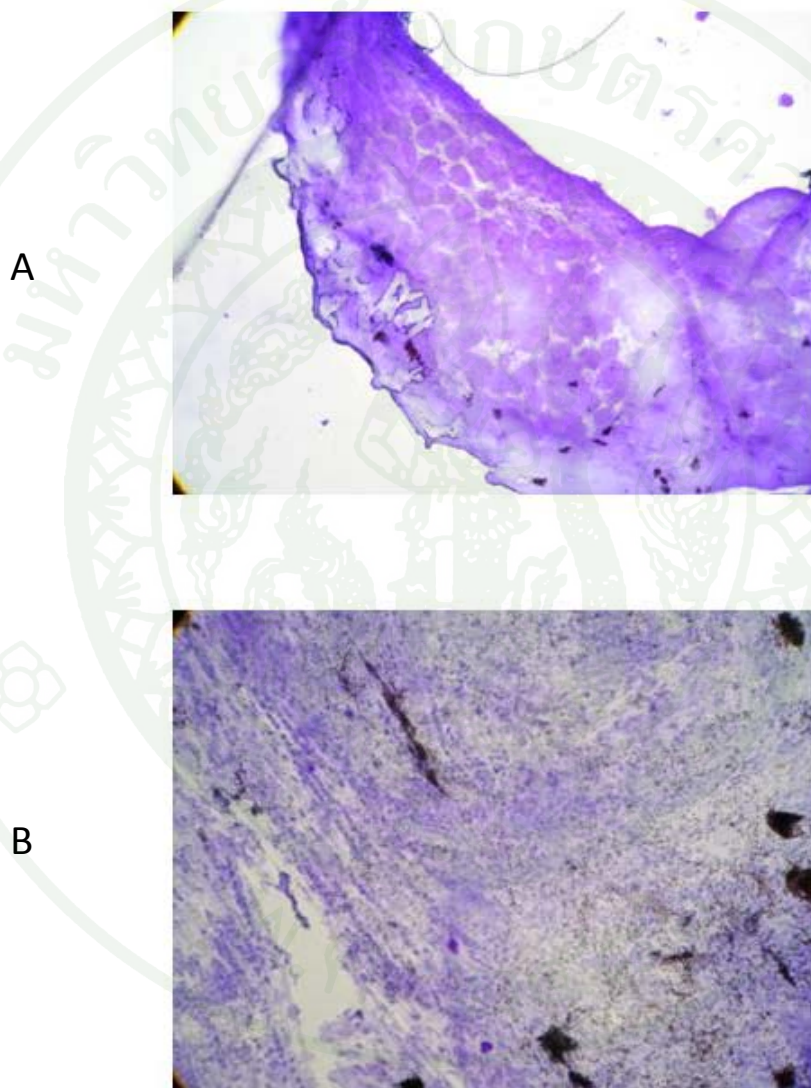
1.2 การเตรียมปลาทดลอง

นำลูกปลานิล ที่ระยะ 3 - 5 วัน หลังถูกไข่แดงยุบ จำนวน 5,000 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2,500 ตัว มาเลี้ยงในกระชังมุ้งเขียว ขนาด 2 X 5 X 2 ลูกบาศก์เมตร โดยกลุ่มแรกจะถูกแปลงเพศโดยให้อาหารผสมฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยละลายฮอร์โมนใน 95% ethanol แล้วนำไปฉีดพ่นบนปลาปน คลุกเคล้าให้ทั่ว ฟังลมในที่ร่ม ประมาณ 6-8 ชั่วโมง (เก็บไว้ในภาชนะที่บดแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้) ให้อาหารลูกปลา 4 มื้อต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน (ไพบูลย์ และ ฉัฐพงษ์, 2547) ส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มปลาปกติ ทำการให้อาหารเป็นปลาปนที่ฉีดพ่นด้วย 95% ethanol อย่างเดียว เป็นเวลา 28 วัน เช่นเดียวกัน จากนั้นเลี้ยงลูกปลาด้วยอาหารที่มีโปรตีนไม่ต่ำกว่า 35 เปอร์เซ็นต์ จนมีขนาดความยาวลำตัวประมาณ 2-3 เซนติเมตร

ทำการตรวจเพศลูกปลานิลที่มีขนาดประมาณ 2-3 เซนติเมตร อย่างง่ายด้วยวิธี squash technique (ภาพที่ 4) โดยสุ่มตัวอย่างลูกปลา กลุ่มละ 50 ตัว ผ่าท้อง แล้วนำส่วนอื่นๆ ออก เหลือแต่ส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) หยดด้วย 5% acetic acid จากนั้นใช้กรรไกรปากแหลมตัดส่วนหัวและท้ายของ gonad วางลงบนแผ่นสไลด์ หยดด้วย 0.5% crystal violet จนท่วม ทิ้งไว้สักครู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ใช้นิ้วหัวแม่มือกดเบาๆ ซับสีส่วนเกินออก แล้วนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์บันทึกเปอร์เซ็นต์เพศผู้และเพศเมีย

เลี้ยงลูกปลาทั้งสองกลุ่มต่อไป ด้วยอาหารที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ (ส่วนผสมอาหารประกอบด้วย ปลาปน 30 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง 27 เปอร์เซ็นต์ รำละเอียด

15 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพด 14.5 เปอร์เซ็นต์ มันสำปะหลัง 12 เปอร์เซ็นต์ พริกชี้ฟ้า 1 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินซี 0.5 เปอร์เซ็นต์) วันละ 2 มื้อ จนมีขนาดประมาณ 50 กรัม เพื่อใช้ในการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP*, *GHRH* และ *GH* ต่อไป



ภาพที่ 4 การย้อมสี gonad เพื่อตรวจสอบเพศ ด้วยวิธีการ squash technique

หมายเหตุ ภาพ A คือ รังไข่ของปลานิลเพศเมีย และภาพ B คือ ถุงน้ำเชื้อของปลานิลเพศผู้

1.3 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) 2 X 4 ประกอบด้วย ปัจจัย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 สอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
ปัจจัยที่ 2 เพศปลา ได้แก่ ปลาเพศเมีย ปลาเพศผู้ ปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) และปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้)

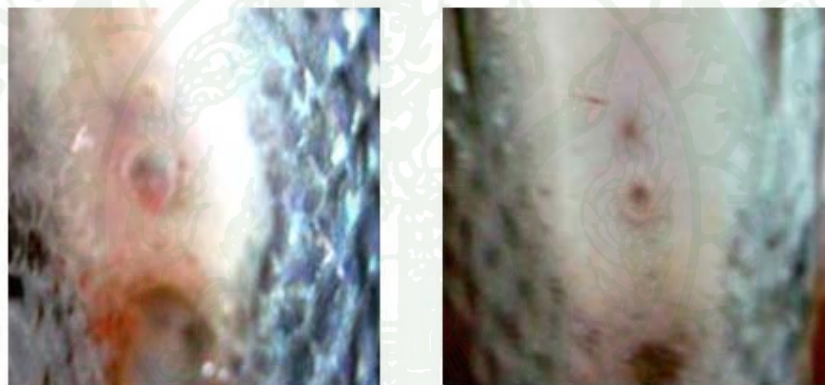
คัดแยกลูกปลานิลที่มีน้ำหนักประมาณ 50 กรัม ลงเลี้ยงในกระชังเนื้ออวน ขนาด 2 X 2.5 X 2 ลูกบาศก์เมตร แยกเพศโดยดูจากลักษณะดั้งเพศ (ภาพที่ 5)

- | | |
|------------|---|
| กลุ่มที่ 1 | ปลานิลปกติเพศผู้ ให้อาหารปกติ |
| กลุ่มที่ 2 | ปลานิลปกติเพศเมีย ให้อาหารปกติ |
| กลุ่มที่ 3 | ปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้) ให้อาหารปกติ |
| กลุ่มที่ 4 | ปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) ให้อาหารปกติ |
| กลุ่มที่ 5 | ปลานิลปกติเพศผู้ ให้อาหารผสมสอร์โมน |
| กลุ่มที่ 6 | ปลานิลปกติเพศเมีย ให้อาหารผสมสอร์โมน |
| กลุ่มที่ 7 | ปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้) ให้อาหารผสมสอร์โมน |
| กลุ่มที่ 8 | ปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) ให้อาหารผสมสอร์โมน |



A

B



C

D

ภาพที่ 5 การแยกเพศปลานิลโดยดูจากลักษณะตั้งเพศภายนอก

หมายเหตุ ภาพ A คือ ตั้งเพศของปลานิลเพศผู้ปกติ, ภาพ B คือ ตั้งเพศของปลานิลเพศเมีย, ภาพ C คือ ตั้งเพศปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเพศผู้), ภาพ D คือ ตั้งเพศปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย)

1.4 การเตรียมอาหารปลาผสมฮอร์โมน

เตรียมอาหารผสมฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยละลายฮอร์โมนใน 95% ethanol แล้วนำไปฉีดพ่นบนอาหารเม็ด คลุกเคล้าให้ทั่ว ผึ่งลมในที่ร่ม ประมาณ 6-8 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในภาชนะที่บแสง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ ส่วนในกลุ่มที่ให้อาหารปกติ ทำการเตรียมอาหารโดยนำ 95% ethanol ฉีดพ่นบนอาหารเม็ดอย่างเดียว และผึ่งลมไว้จนแห้ง แล้วจึงเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เลี้ยงปลา

1.5 การเลี้ยงปลาและการเก็บข้อมูลสมรรถนะการเจริญเติบโต

เลี้ยงปลานิลกลุ่มละ 2 ซ้ำๆ ละ 60 ตัว เป็นเวลา 15 สัปดาห์ ให้อาหารที่มีโปรตีน ไม่น้อยกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 มื้อ ทำการเก็บข้อมูลทุก 5 สัปดาห์ โดยทำการสุ่มปลาจากกลุ่ม ทดลองละ 20 ตัว ชั่งน้ำหนัก และบันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินทั้งหมด วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Percent of weight gain, %WG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็น เนื้อ (Feed conversion ratio, FCR) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (Average daily gain, ADG) และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) โดยคำนวณจากสูตร ดังนี้

$$\begin{aligned} & \text{เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \\ & = \frac{(\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง})}{\text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}} \times 100 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} \\ & = \frac{\text{น้ำหนักของอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน} \\ & = \frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด} \times \text{จำนวนวันที่ทดลอง}} \end{aligned}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

$$= \frac{(\ln \text{ น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \ln \text{ น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง}) \times 100}{\text{จำนวนวันที่ทดลอง}}$$

1.6 การเก็บตัวอย่างสมองปลาและการสกัด total RNA

ทำการเก็บตัวอย่างต่อมใต้สมองของปลานิลที่ได้จากการเลี้ยงตามแผนการทดลอง หลังจากเลี้ยงไปแล้ว 15 สัปดาห์ กลุ่มละ 20 ตัว นำมาสกัด total RNA ตามวิธีการข้อ 1.1.2

1.7 การเปลี่ยนจาก total RNA เป็น cDNA

นำ total RNA จากข้อ 1.6 มาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อดูความบริสุทธิ์ของ total RNA จากนั้นเปลี่ยนเป็น first strand cDNA จาก total RNA 1 ไมโครกรัม ด้วยชุด kit สำเร็จรูป improv-II™ reverse transcription system (Promega) ตามวิธีของบริษัท โดยนำ total RNA ปริมาตร 4 ไมโครลิตร เติม 0.5 µg/ml oligo-dT primer 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการดูดสารขึ้นลง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายลงบนน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้อย่างน้อย 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แชนบนน้ำแข็ง จนกว่าจะทำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

เตรียมสารละลายผสม ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ที่มีส่วนประกอบ ดังนี้

Improm-II™ 5X reaction buffer	4	ไมโครลิตร
25 mM MgCl ₂	4.8	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
40 U/µl RNase inhibitor	0.5	ไมโครลิตร
reverse transcriptase	1	ไมโครลิตร
DEPC water	3.7	ไมโครลิตร

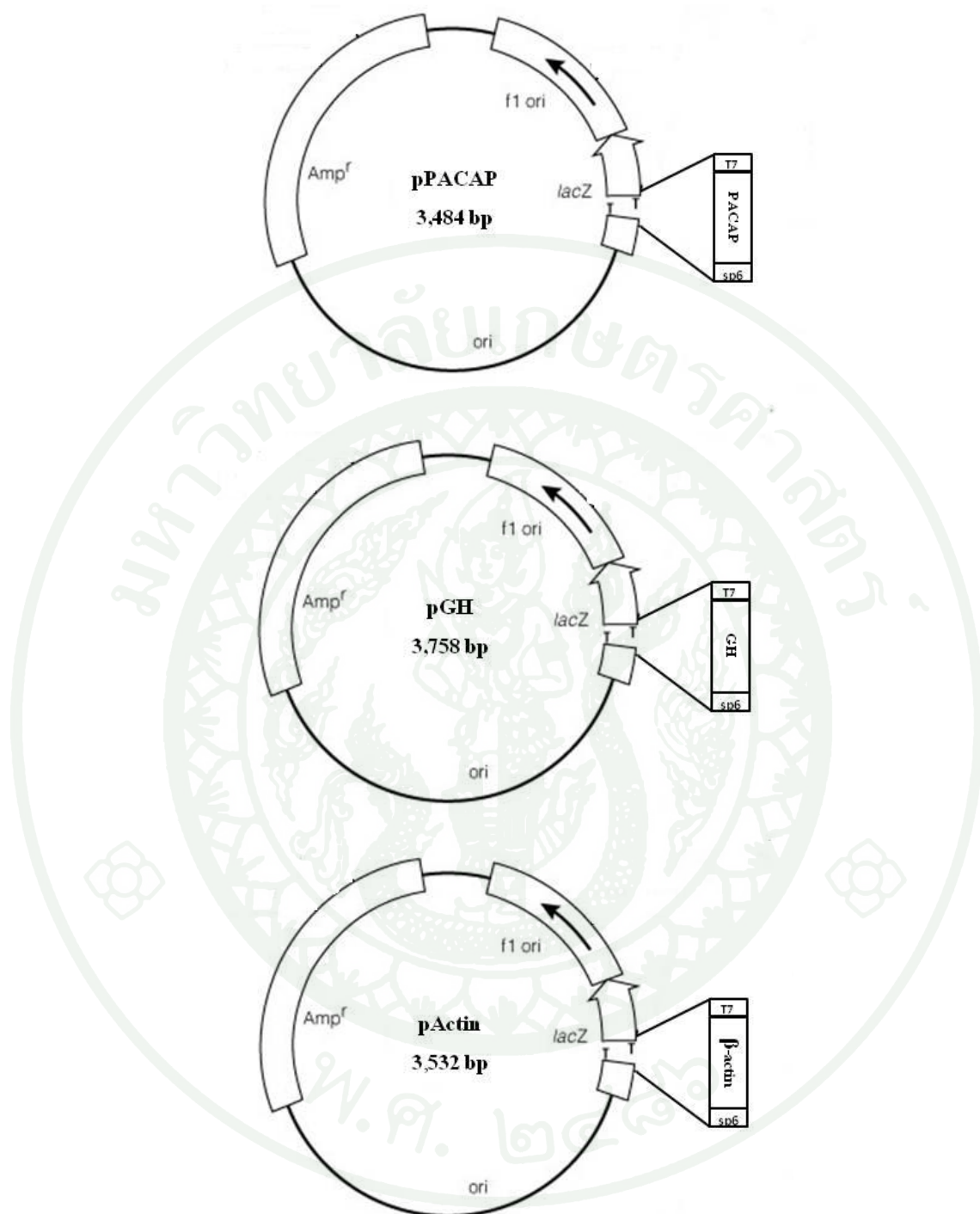
เติมสารละลายทั้งหมดลงในหลอดที่มี total RNA ทำให้มีปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน ด้วยการดูดสารขึ้นลงหลาย ๆ ครั้ง นำสารละลายทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงย้ายไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จะได้ cDNA ตามต้องการ เก็บ cDNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

1.8 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *GHRH* *PACAP* และ *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้ β -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *GHRH* *PACAP* และ *GH* ในต่อมใต้สมอง ซึ่งมีการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน β -actin *GH* *GHRH* และ *PACAP* ที่ทราบความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและความเข้มข้นแน่นอน จากนั้นทำการเจือจางดีเอ็นเอ โดยเทียบจากน้ำหนักของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 คู่เบส มีน้ำหนักเท่ากับ 1.1×10^{-15} ไมโครกรัม

พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน β -actin (pActin) มีความยาวเท่ากับ 3,532 คู่เบส พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *GH* (pGH) มีความยาวเท่ากับ 3,758 คู่เบส และพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PACAP* (pPACAP) มีความยาวเท่ากับ 3,484 คู่เบส (ภาพที่ 6)

ทำการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH* *PACAP* และ *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR โดยใช้ first strand cDNA ที่ได้จากข้อ 1.7 เป็น templates และใช้ specific primers ที่ออกแบบไว้ในการทำปฏิกิริยา (ตารางที่ 4) ตำแหน่งและลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *GHRH* *PACAP* และ *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR แสดงในภาพที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ



ภาพที่ 6 พลาสมิดลูกผสมที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *PACAP* (pPACAP), *GH* (pGH) และ β -actin (pActin)

ตารางที่ 4 Primers ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

ยีน	Primers	Product size (bp)
<i>GHRH</i>	nGHRH F-RT : 5'- TGAGGAAGAATTAGATAGAGC - 3'	86
	nGHRH R-RT : 5'- CACGAATTGTCATCAGAGAA - 3'	
<i>PACAP</i>	nPACAP F-RT : 5'- ACAACAGCATGGAGGAAG - 3'	212
	nPACAP R-RT : 5'- ACACAGGAGGGCAGTTTGA - 3'	
<i>GH</i>	nGH F-RT : 5'- AGTTTCCCAGTCGCTCTCT - 3'	117
	nGH R-RT : 5'- CTGCTTCATCCTGATTGGC - 3'	
<i>β-actin</i>	nActin F-RT : 5'- TGGCAATGAGAGGTTCCG - 3'	95
	nActin R-RT : 5'- TGCTGTTGTAGGTGGTTTCG - 3'	

เตรียมสารละลายผสมโดยใช้ชุด Kit สำเร็จรูป faststart SYBR green master (Roche) ตามวิธีของบริษัท โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้

faststart SYBR green master	5	ไมโครลิตร
5 μ M forward primer	0.3	ไมโครลิตร
5 μ M reverse primer	0.3	ไมโครลิตร
PCR-grade Water	2.4	ไมโครลิตร
cDNA	2	ไมโครลิตร

นำสารละลายผสมนี้ไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเครื่อง Light Cycler® 480 System (Roche) ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงาน ดังนี้ ช่วงแรก ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ ในช่วงที่สอง ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที เป็นจำนวน 40 รอบ และ ช่วงที่สาม ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ บันทึกค่า Threshold cycle (C_T) หรือ Crossing point (C_p) และวิเคราะห์ Melting temperature หาค่า relative expression ของยีน *PACAP* *GHRH* และ *GH* ต่อ *β -actin*

ccccaaagacgagacttgaaaaacgacgcattcgcgatgaggacgggaattcgttgccgcatg	60
P K T R L E N D A F D E D G N S L S V M	20
ggttttgatagtgatcagattgctatacgaagcccgccatccttaaacgacgacgcatac	120
G F D S D Q I A I R S P P S L N D D A Y	40
acacctatactaccacaggagaagagaccagaaaaggcatgctgaggaagaattagataga	180
T L Y Y P Q E K R P E R H A E E E L D R	60
gccttgagggagatcctgggtcagttaacagcgagacattatctgcattctctgatgaca	240
A L R E I L G Q L T A R H Y L H S L M T	80
attcgtgcaggtgacgacaacagcatggaggaagaatcagagcccttatccaaaagacac	300
I R A G D D N S M E E E S E P L S K R H	100
tcagatgggatcttcactgacagctacagtcgctatagaaaagcagatggccgtgcagaaa	360
S D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V Q K	120
tacctggcagcggttctgggtagaaggtacagacagagagttaggaacaaaggacgccgg	420
Y L A A V L G R R Y R Q R V R N K G R R	140
cttgccctatttgtagcgctgtaaggcgctcaaaactgccctcctgttaatcactagtgaa	480
L A Y L -	144
ttcgcggcccgctgcaggtcgaccatatgggagagctccaacgcgcttgatgcatagct	540
tgagtattctatagtgtcacctaataagccttggcgtaatcatggtcatagcaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	625

ภาพที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *GHRH-PACAP* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

หมายเหตุ ส่วนที่เน้นสีเทา คือ นิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขาดหายไป เมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนแบบที่ 1 (แบบยาว) และชิ้นส่วนแบบที่ 2 (แบบสั้น) ที่โคลนได้

ตัวอักษรที่อยู่ในกล่องข้อความ คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *GHRH*

ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ประ คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *PACAP*

cagagactcttctcggactttgagagctctctgcagacggaggagcaacgtcagctcaac	60
Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L N	20
aaaatcttcctgcaggacttctgcaactctgattacatcatcagcccgatcgacaaacac	120
K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K H	40
gagacgcagcgcagctcggtcctgaagctgctgtcgatctcctatggactggttgagtcc	180
E T Q R S S V L K L L S I S Y G L V E S	60
tgggagtttcccagtcgctctctgtctggaggttcctctctgaggaaccagatttcacca	240
W E F P S R S L S G G S S L R N Q I S P	80
aggctgtctgagcttaaaacgggaatcttgctgctgatcagggccaatcaggatgaagca	300
R L S E L K T G I L L L I R A N Q D E A	100
gagaattatcctgacaccgacaccctccagcacgctccttacggaaactattatcaaagt	360
E N Y P D T D T L Q H A P Y G N Y Y Q S	120
ctgggaggcaacgaatcgctgagacaaacttatgaattgctggcttgcttcaagaaggac	420
L G G N E S L R Q T Y E L L A C F K K D	140
atgcacaaggtggagacctacctgacggtagctaaatgtcgactctctccagaagcaaac	480
M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A N	160
tgcactctgtagctccacctaataattgatactgatacgtgctctgtagccccaccctcat	540
C T L	163
gttggcaactctgcttacatgtgttagcattagcaataggataataatagcagtggtaa	600
tcgtgacatcagaagttttctgacataactgtgatgcaaggtgtgaacgggaataatgt	660
tattctgtgaaataaatgtgttgattgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	718

ภาพที่ 8 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *GH* ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

```

cctcatgaagatcctgacagaggggtggctactccttcaccaccacagccgagagggaaatc 60
  L M K I L T E G G Y S F T T T A E R E I 20

gtgctgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgccttgacttcgagcaggagatgggc 120
  V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M G 40

accgctgcctcctcctcctccctggagaagagttacgagctgcctgacggacaggtcatc 180
  T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I 60

      |----- Actin F RT ----->
accattggcaatgagaggttccggttgccctgagggccctcttcagccttccttccttgg 240
  T I G N E R F R C P E A L F Q P S F L G 80

      <----- Actin R RT -----|
atggaatcctgcggaatccacgaaaccacctacaacagcatcatgaagtgtgacgtcgac 300
  M E S C G I H E T T Y N S I M K C D V D 100

atccgtaaggacctgtacgcccaacaccgtgctgtctggaggtaccaccatgtaccctggc 360
  I R K D L Y A N T V L S G G T T M Y P G 120

atcgctgacaggatgcagaaggagatcacagccctggcccatccaccatgaagatcaag 420
  I A D R M Q K E I T A L A P S T M K I K 140

atcatgccccacctgagcgtaaatactccgtctggatcggaggctccatcctggcctct 480
  I I A P P E R K Y S V W I G G S I L A S 160

ctctccaccttcagcag 499
  L S T F Q Q 166

```

ภาพที่ 9 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน β -actin ที่โคลนได้ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน β -actin ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

1.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances, ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) 2 X 4 คือ

ปัจจัยที่ 1 สอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
ปัจจัยที่ 2 เพศปลา ได้แก่ ปลาเพศเมีย ปลาเพศผู้ ปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) และปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้)

เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปัจจัยจากเพศหรือสอร์โมน MT จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การทดลองที่สอง ศึกษาผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในเลือด ค่าทางภูมิคุ้มกัน และกายวิภาคของลำไส้ ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

2.1 การเตรียมปลาทดลอง

เตรียมปลาทดลอง เช่นเดียวกับการทดลองที่หนึ่ง ข้อ 1.2

2.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) 2 X 3 ประกอบด้วย ปัจจัย 2 ปัจจัย คือ

ปัจจัยที่ 1 สอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
ปัจจัยที่ 2 เพศปลา ได้แก่ ปลาเพศเมีย ปลาเพศผู้ และปลาแปลงเพศ

แบ่งปลานิลขนาดประมาณ 80 กรัม ลงเลี้ยงในกระชัง ขนาด 2 X 2.5 X 2 ลูกบาศก์เมตร ตามกลุ่มทดลอง ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 ปลานิลปกติ เพศผู้ ไม่ให้ฮอร์โมน
- กลุ่มที่ 2 ปลานิลปกติ เพศเมีย ไม่ให้ฮอร์โมน
- กลุ่มที่ 3 ปลานิลแปลงเพศ ไม่ให้ฮอร์โมน
- กลุ่มที่ 4 ปลานิลปกติ เพศผู้ ให้อาหารผสมฮอร์โมน
- กลุ่มที่ 5 ปลานิลปกติ เพศเมีย ให้อาหารผสมฮอร์โมน
- กลุ่มที่ 6 ปลานิลแปลงเพศ ให้อาหารผสมฮอร์โมน

2.3 การเตรียมอาหารปลา

เตรียมอาหารผสมฮอร์โมน MT เช่นเดียวกับการทดลองที่หนึ่ง ข้อ 1.4

2.4 การเลี้ยงปลาและการเก็บข้อมูลสมรรถนะการเจริญเติบโต

เลี้ยงปลานิลกลุ่มทดลองละ 2 ซ้ำๆ ละ 60 ตัว เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ ให้อาหารที่มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 32% วันละ 2 มื้อ เก็บข้อมูลทุก 5 สัปดาห์ โดยทำการสุ่มปลาจากกลุ่มทดลองละ 20 ตัว ชั่งน้ำหนัก และบันทึกปริมาณอาหารที่ปลากินทั้งหมด วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อสิ้นสุดการทดลอง อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ โดยคำนวณจากสูตร เช่นเดียวกับการทดลองที่หนึ่ง

2.5 การเก็บตัวอย่าง

2.5.1 การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือด จากปลานิลหลังจากเลี้ยงไปแล้ว 10 สัปดาห์ กลุ่มละ 10 ตัว โดยทำการเจาะเลือดปลาจากบริเวณเส้นเลือด caudal vein ด้วยเข็มขนาด 21G โดยการเก็บเลือด 1 มิลลิลิตร แบ่งเลือดเป็นสองส่วน คือ ส่วนแรกใส่ในหลอดพลาสติกที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (5% EDTA) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อเก็บ plasma และส่วนที่สองเก็บปริมาตร 800 ไมโครลิตร โดยไม่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แชน้ำแข็งจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ เพื่อเก็บ serum

เก็บ plasma ซึ่งได้จากส่วนใสของเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดรวมอยู่ด้วย โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนใสที่แยกออกมาใหม่ จะได้ plasma ที่ต้องการ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

เก็บ serum โดยนำหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัว ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่แยกออกมาใหม่ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

2.5.2 การวิเคราะห์ค่า heptosomatic index

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ ซึ่งน้ำหนักตับและน้ำหนักตัวปลา เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่า heptosomatic index (HSI) โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{heptosomatic index} = \frac{\text{น้ำหนักตับ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัว (กรัม)}}$$

2.5.3 การศึกษาลักษณะกายวิภาคของลำไส้

นำลำไส้ส่วนต้น และส่วนกลาง ตัดเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร ใส่ในสารละลาย 10% formaldehyde buffer ทันที แช่ไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำชิ้นเนื้อมาล้างด้วยน้ำที่หมุนเวียนอยู่ตลอดเวลาเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้น้ำยาตรึงสภาพถูกขับออกไปจากชิ้นเนื้อ นำเนื้อเยื่อที่ล้างเสร็จแล้วไปจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วย ethyl alcohol ตามลำดับความเข้มข้น จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก 25, 50, 70, 80, 95 และ 100% 2 ครั้ง อย่างละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อที่ล้างด้วย ethyl alcohol ตามลำดับแล้ว จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปล้างด้วย xylene ตามลำดับความเข้มข้น จากความเข้มข้นน้อยไปหาความเข้มข้นมาก 25, 50, 70, 80 และ 100% 2 ครั้ง อย่างละ 2 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปแช่ในสารละลายผสม paraffin: xylene ที่อัตราส่วน 25: 75, 50: 50, 75: 25 และ 100% paraffin 2 ครั้ง อย่างละ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อที่ได้มาฝังตรึงด้วย 100% paraffin ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตัดชิ้นส่วนให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมโครเมตร ทาสไลด์ที่ทำความสะอาดแล้วด้วยน้ำยาทาสไลด์ ให้พอเป็นฟิล์มบางๆ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง

ใช้ dropper หยดน้ำกลั่นลงตรงกึ่งกลางของสไลด์ที่ทำน้ำยาทาสไลด์ไว้แล้ว 1 หยด ใช้ปลายพู่กันค่อยๆ และขึ้นส่วนที่ตัดแล้วขึ้นวางบนกึ่งกลางของหยดน้ำ อุ่นสไลด์ ยกสไลด์เอียงเพื่อให้หยดน้ำไหลออกเสร็จแล้วให้แห้ง วางสไลด์ไว้บนเครื่อง magaslide ตลอดทั้งคืน ย้อมสีด้วย haematoxylin & eosin (H&E) วัดความยาวของ intestinal villi ที่พบในลำไส้ส่วนต้นและส่วนกลาง อย่างละ 10 เส้น เพื่อหาค่าเฉลี่ย และนับจำนวน goblet cell ที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.6 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

2.6.1 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (red blood cell count, RBC)

เจือจางตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวด้วยสารละลาย grower's solution ในอัตราส่วน 1 ต่อ 200 หยดตัวอย่างเลือดที่เจือจางลงใน neubauer hemocytometer นับจำนวนเม็ดเลือดแดงในช่องพื้นที่ใหญ่ตรงกลาง ซึ่งมีพื้นที่เล็ก 25 ช่อง แต้นับ 5 ช่อง ตรงมุมบน ล่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง จากนั้นคำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดจากสูตร

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด} = \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง} \times 10,000$$

2.6.2 เเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (heamatocrit)

บรรจุเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดใส่ลงในหลอด capillary จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาณเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่ตกตะกอน คำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น} = \frac{\text{ปริมาณเม็ดเลือดแดงทั้งหมดที่ตกตะกอน}}{\text{ปริมาณเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

2.6.3 ค่าฮีโมโกลบิน (heamoglobin)

นำเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวมาวิเคราะห์หาค่าฮีโมโกลบินด้วยเครื่องอัตโนมัติ Advia® 60 hematology system (Bayer Healthcare, NY) ตามวิธีของบริษัท

2.6.4 ปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (mean corpuscular volume, MCV)

คำนวณปริมาตรของเม็ดเลือดแดง จากสูตร

$$\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดง} = \frac{\text{ค่าฮีมาโตคริต} \times 10}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดง}}$$

2.6.5 ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (mean corpuscular hemoglobin, MCH)

คำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ จากสูตร

$$\text{ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์} = \frac{\text{ค่าฮีโมโกลบิน} \times 10}{\text{จำนวนเม็ดเลือดแดง}}$$

2.6.6 ความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง (mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC)

คำนวณค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินต่อเม็ดเลือดแดง} = \frac{\text{ค่าฮีโมโกลบิน} \times 100}{\text{ค่าฮีมาโตคริต}}$$

2.6.7 จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

นำเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาเจือจางด้วยน้ำยา dacie's solution อัตราส่วน 1 ต่อ 50 นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด และคำนวณจากสูตร

$$\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด} = \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว} \times 50$$

2.6.8 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด

นำเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาผสมกับสไลด์ที่วางไว้ให้แห้ง จากนั้นทำการย้อมสีด้วย wright's geimsa stain เพื่อนับเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแยกตามชนิด (monocyte, neutrophil, lymphocyte) จำนวน 100 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

2.7 การวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีในเลือดบางประการ

2.7.1 การวิเคราะห์ปริมาณ glucose

นำตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาวิเคราะห์ปริมาณ glucose โดยใช้เครื่อง Accutrend® Plus instrument (Roche, Germany) ตามวิธีของบริษัท

2.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณ cholesterol

นำตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาวิเคราะห์ปริมาณ cholesterol โดยใช้เครื่อง Accutrend® Plus instrument (Roche, Germany) ตามวิธีของบริษัท

2.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณ triglyceride

นำตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดมาวิเคราะห์ปริมาณ triglyceride โดยใช้เครื่อง Accutrend® Plus instrument (Roche, Germany) ตามวิธีของบริษัท

2.7.4 วิเคราะห์ปริมาณ protein

เป็นการวัดปริมาณ total protein โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน total protein kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน plasma กับสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ในบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

นำ plasma มาวิเคราะห์ปริมาณ total protein โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน total protein kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ด้วยการนำ plasma หรือสารละลายมาตรฐาน 60 ไมโครลิตร ผสมกับ lowry reagent 60 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที และเติม folin 2 ciocalten's phenol reagent 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คูณส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500-800 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA

2.8 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันบางประการ

2.8.1 lysozyme activity

วิเคราะห์ค่าการทำงานเอ็นไซม์ lysozyme ตามวิธีการของ Kumari และ Sahoo (2006) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่าการย่อยเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikticus* โดยตัวอย่าง serum กับการย่อยแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* โดยสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ (hen egg white lysozyme (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายไลโซไซม์มาตรฐานในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 6.0) ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* ให้มีความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ 0.05 M phosphate citrate buffer (pH 5.8)

สร้างกราฟมาตรฐานของระดับเอ็นไซม์ โดยดูดสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลท หรือหยดตัวอย่าง serum 10 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแต่ละช่อง จากนั้นหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* 190 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลายมาตรฐานหรือ serum จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หลังจากเขย่า นับเป็นค่าการดูดกลืนแสงที่เวลา 0 นาที และวัด

ค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งหลังจากเขย่าเป็นเวลา 30 นาที ทำการเปรียบเทียบระดับไลโซไซม์ใน serum กับค่าการทำงานของสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์

2.8.2 total Immunoglobulin

เป็นการวัดปริมาณ immunoglobulin ทั้งหมดที่มีอยู่ใน plasma ของปลา โดยใช้ชุดทดสอบโปรตีน Total Protein Kit, Micro Lowry (Sigma) ตามวิธีของบริษัท ทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน plasma และปริมาณโปรตีนที่เหลือใน plasma หลังจากตกตะกอน immunoglobulin ด้วย 6% polyethylene glycol กับสารละลายมาตรฐาน BSA (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BSA ในบัฟเฟอร์ phosphate buffered saline ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 50, 100, 200, 300 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ทำการตกตะกอน immunoglobulin ใน plasma โดยนำ plasma จำนวน 72 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 30% polyethylene glycol ปริมาตร 18 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายใสด้านบนซึ่งตกตะกอน immunoglobulin ไปแล้ว จากนั้นทำการดูดตัวอย่าง plasma ที่ไม่ตกตะกอน plasma ที่ตกตะกอน หรือสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงในหลอดใหม่ เติม lowry reagent 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที และเติม folin 2 ciocalten's phenol reagent 30 ไมโครลิตร ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหักออกจากค่า total protein ที่ได้จากระบวนการที่ไม่ผ่านการตกตะกอนด้วย 6% polyethylene glycol เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA

2.8.3 Alternative hemolytic complement assay (ACH50)

เติมสารละลายเม็ดเลือดแดงที่ปรับความเข้มข้นแล้ว (2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง serum ที่เจือจางให้ได้ความเข้มข้น 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125

และ 0.15625 % ด้วยสารละลาย 0.01 M GVB-EGTA-MgCl₂ (gelatin veranol buffer; 10 mM barbital, 145 mM NaCl, 0.1% gelatin, 0.5 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7.3-7.4) หลอดที่มีบัฟเฟอร์อย่างเดียวก และหลอดที่มีน้ำกลั่นอย่างเดียวก ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายที่มีส่วนผสมของ 0.85% NaCl และ 10 mM EDTA ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสปริมาตร 70 ไมโครลิตร ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น control (หลอดที่มีการ haemolysis 100%) และใช้สารละลาย GVB-EGTA-MgCl₂ เป็น blank วิเคราะห์หาค่า ACH50 จากสูตร

$$\text{ACH50 (units/ml)} = 1/K \times (\text{reciprocal of the serum dilution}) \times 0.5$$

K คือ จำนวน serum (ml) ที่ทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายแตก 50%

2.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variances, ANOVA) โดยใช้แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (Factorial Design) 2 X 3 คือ

- ปัจจัยที่ 1 ฮอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
- ปัจจัยที่ 2 เพศปลา ได้แก่ ปลาเพศเมีย ปลาเพศผู้ และปลาแปลงเพศ

เมื่อพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปัจจัยจากเพศหรือฮอร์โมน MT จึงทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

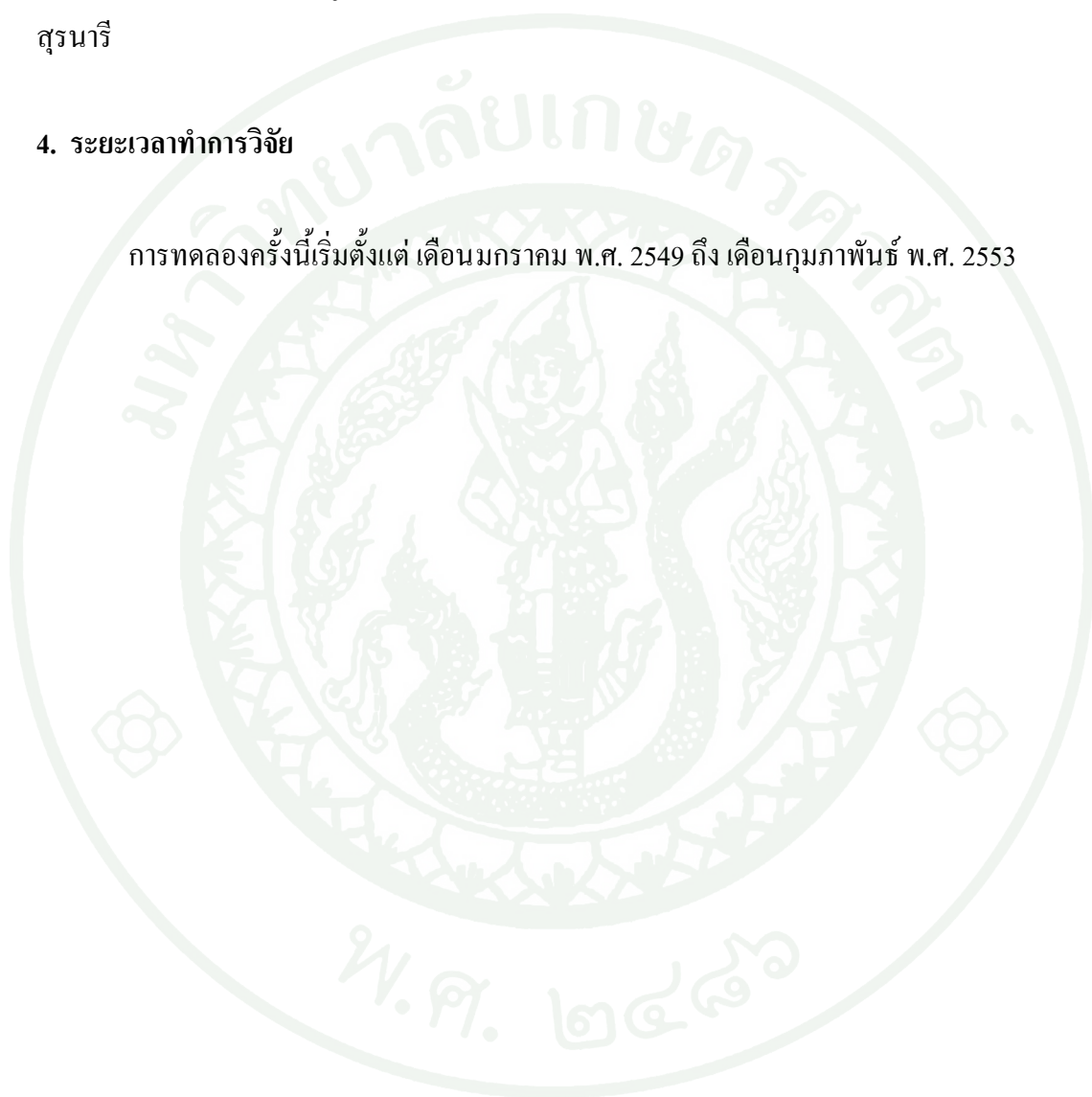
3. สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (แผนกสัตว์น้ำ)

อาคารเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี
สุรนารี

4. ระยะเวลาทำการวิจัย

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2549 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2553



ผลและวิจารณ์

ผล

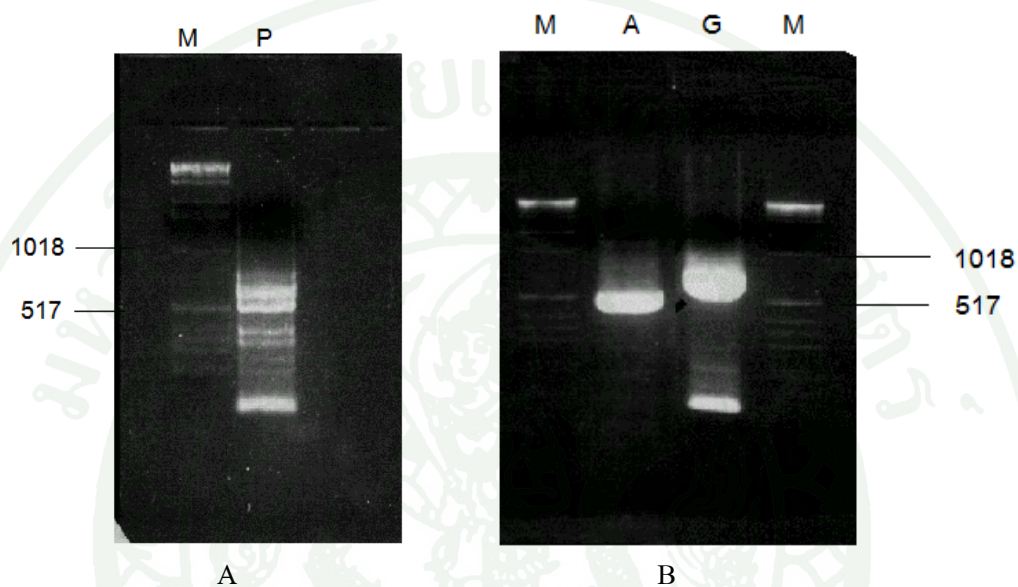
1. ผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP GHRH* และ *GH* ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

1.1 การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ complementary DNA (cDNA) ของยีน *GHRH PACAP* และ *GH* ในปลานิล ด้วยวิธี 3'-RACE

ผลจากการโคลน cDNA บางส่วน ของยีน *GHRH-PACAP* ของปลานิล ด้วยวิธี 3'-RACE พบว่าดีเอ็นเอที่โคลนได้มีขนาดความยาวประมาณ 500 และ 600 คู่เบส (ภาพที่ 10) และเมื่อทำการตัดเจลตรงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์พบว่า cDNA ของยีน *GHRH-PACAP* ในปลานิล ที่โคลนได้ มี 2 แบบ คือ แบบที่ 1 (แบบยาว) มีความยาวทั้งสิ้น 625 คู่เบส (ภาพที่ 11) และแบบที่ 2 (แบบสั้น) มีความยาวทั้งสิ้น 520 คู่เบส (ภาพที่ 12) เมื่อนำลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้ทั้งสองแบบไปเปรียบเทียบกับยีน *GHRH-PACAP* ของปลาชนิดต่างๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank คือ ปลาหมอเทศ (AY522580) ปลาม้าลาย (AF329730.1) ปลาคูกอูย (FJ882999.1) และปลาคอดอเมริกัน (X79078.1) พบว่าลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของ *GHRH-PACAP* ทั้งแบบยาวและแบบสั้น มีความคล้ายคลึงกับยีน *GHRH-PACAP* ของปลาชนิดต่างๆ ทั้งสองแบบ (ภาพที่ 11 และ 12)

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GHRH-PACAP* ในปลานิล ที่โคลนได้ทั้งสองแบบ พบว่าชิ้นส่วนทั้งสองแบบมีขนาดต่างกัน 105 คู่เบส โดยชิ้นส่วนแบบที่ 1 สามารถแปลได้กรดอะมิโน จำนวน 144 ตัว และมีนิวคลีโอไทด์ด้าน 3'-UTR จำนวน 190 คู่เบส และชิ้นส่วนแบบที่ 2 สามารถแปลกรดอะมิโนได้ จำนวน 112 ตัว และมีนิวคลีโอไทด์ด้าน 3'-UTR จำนวน 190 คู่เบส เช่นเดียวกับแบบที่ 1 โดยชิ้นส่วนแบบที่ 2 มีกรดอะมิโนลดหายไป 32 ตัว จากรายงานของ Chi-wei *et al.* (2007) ในปลาหมอเทศ พบว่าตำแหน่งของยีน *GHRH* และ *PACAP* จะเรียงต่อกัน โดยยีน *GHRH* อยู่ก่อนตำแหน่งยีน *PACAP* สอร์โมน *GHRH* ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวนทั้งสิ้น 45 ตัว ส่วนสอร์โมน *PACAP* ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวนทั้งสิ้น

38 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้ของปลานิลพบว่าชิ้นส่วนแบบที่ 1 สามารถโคลนได้ทั้งยีน *GHRH* และยีน *PACAP* ส่วนชิ้นส่วนแบบที่ 2 สามารถโคลนได้ยีน *GHRH* ที่มีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 105 คู่เบส และยีน *PACAP* ทำให้ชิ้นส่วนแบบที่สองยีน *GHRH* เมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนแล้วมีจำนวน 13 ตัว เท่านั้น (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 10 Electrophoresis ของ PCR products จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ของยีน *GHRH-PACAP* *GH* และ *β-actin* ด้วยวิธีการ Nested PCR บน 2% agarose gel

หมายเหตุ ภาพ A คือ PCR products ของ ยีน *GHRH-PACAP*, ภาพ B คือ PCR products ของยีน *β-actin*, M = DNA marker, P = *GHRH-PACAP*, G = *GH* และ A = *β-actin*

mossambicus	GCACACACGCAAACACGCACTGCCACAGCCGCGCCGGATCACAACTACAGCACAGCCT	60
Nile	-----	
zebrafish	-----	
catfish	-----	
channel	-----	
mossambicus	CCTCTCTGCTTTCCTGTATAGCATGGCCAGTTTCGAGTAAAGCGACTTTAATCTTGCTCA	120
Nile	-----	
zebrafish	-----GCCGCAGAATGATTACGAGCAGCAAAACGACTCTTGCTTTCCTCA	45
catfish	-----ATGGCCAAATCTAGTAGAGCTACTTTGGCTCTGCTCA	37
channel	-----ATGGCCAAATCTAGTAGAGCTACTTTGGCTCTGCTCA	37
mossambicus	TCTACGGGATCTTTATGCACTACAGCGTCTTCTGCACACCTCTTGACTAAGTTACCCCA	180
Nile	-----CCCCA	5
zebrafish	TCTATGGGCTCCTAGTTCATGCAATGTGTGTTTCGCCTC-----TGAGTTACCCGA	96
catfish	TCTACGGGATCTTAATGCGCTACAGC---CAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA	94
channel	TCTACGGGATCTTAATGCGCTACAGCGCCCAATGCACACCCATCGGAATGGGCTTCCCCA	97
		*** *
mossambicus	AGATGAGACTTGAAAACGACGCATTTCGATGAGGACGGGAATTCGTTATCCGACATGGGTT	240
Nile	AGACGAGACTTGAAAACGACGCATTTCGATGAGGACGGGAATTCGTTGTCCGACATGGGTT	65
zebrafish	AAATCAGAATGGAGACTGCAGATTTTGCATGAGGAGGAAACTCATTAACGGATGTAACAT	156
catfish	ATATGAGGCTAGACAACGACGTGTTTCGGGACGAGGAAACTCGTTAAGTGAGCTGTCT	154
channel	ACATGAGGCTAGAAAACGACGTGTTTCGGGACGAGGAAACTCGTTAAGTGAGCTGTCT	157
	* * * * *	
mossambicus	TTGATAGTGATCAGATTGCTATACGAAGCCCGCCATCCTTAAACGACGACGCATACACCC	300
Nile	TTGATAGTGATCAGATTGCTATACGAAGCCCGCCATCCTTAAACGACGACGCATACACCC	125
zebrafish	TTGACAGTGACCAGATCACTATACGAAGCTCTCTACAGTCACTGAAGACGCATACAGT	216
catfish	ACGAGCCGGACACGATGAGCGCGCAGTCTCCAGCCCTCCCTGAAGACGCATACACAC	214
channel	ATGAGCCGGACACGATGAGCGCGCAGTCTCCAGCCCTCCCGGAGGACGCTTACACAC	217
	** * * * *	
mossambicus	TATACTACCACAGGAGAAGAGACCAGAAAGGCATGCTGAGGAAGAATTAGATAGAGCCT	360
Nile	TATACTACCACAGGAGAAGAGACCAGAAAGGCATGCTGAGGAAGAATTAGATAGAGCCT	185
zebrafish	TATTTAGTCTCCATCAAAAAGACTGGAAAGGCACGCTGACGGGATGTTAATAAAGCCT	276
catfish	TGTACTATCCGCCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGCCT	274
channel	TGTATTATCTCCGAGAGAAGAGCCGAAACGCATGCAGACGGATTGTTAGATAGAGCCT	277
	* * * * *	
mossambicus	TGAGGGAGATCCTGGGTCAGTTAACACGCGAGACATTATCTGCATTCTCTGATGACAATTC	420
Nile	TGAGGGAGATCCTGGGTCAGTTAACACGCGAGACATTATCTGCATTCTCTGATGACAATTC	245
zebrafish	ACAGGAAAGCGCTCGGCCAGTTATCCGCGGGAAGTACCTGCATACACTGATGGCAAAAC	336
catfish	TGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTC	334
channel	TGAGGGACATCCTGGTTCAGTTATCAGCCGAAAATATCTGCATTCTCTGACGGCAGTTC	337
	*** * * * * *	

ภาพที่ 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้แบบที่ 1 (แบบขาว) ของปลานิลกับยีน *GHRH-PACAP* ของปลาชนิดอื่นๆ

หมายเหตุ ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ยีน *GHRH-PACAP* ของปลาทั้ง 4 ชนิด มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank ดังนี้ mossambicus: ปลาหมอเทศ (AY522580), zebrafish: ปลาม้าลาย (F329730.1), catfish: ปลาดุกอุย (FJ882999.1), channel: ปลากดอเมริกัน (X79078.1) และ Nile: ยีน *GHRH-PACAP* ของปลานิลที่โคลนได้

mossambicus	GTGCAGGTGACGA-CAACAGCATGGAGGAAGAATCAGAGCCCTTATCCAAAAGACACTCA	479
Nile	GTGCAGGTGACGA-CAACAGCATGGAGGAAGAATCAGAGCCCTTATCCAAAAGACACTCA	304
zebrafish	GTGTTGGAGGAGG-GAGCACAAACAGAAGATGACAATGAACCACTCTCAAAACGTCACCTCG	395
catfish	GCGTAGGTGAGGAAGAAGAGGAT-GAAGAGGACTCGGAGCCACTGTGCAAGCGCCACTCG	393
channel	GTGTAGGTGAGGAAGAAGAGGAC-GAGGAAGACTCGGAGCCACTGTGCAAGCGCCACTCG	396
	* * * * *	
mossambicus	GATGGGATCTTCACTGACAGCTACAGTCGCTATAGAAAAGCAGATGGCCGTGCAGAAATAC	539
Nile	GATGGGATCTTCACTGACAGCTACAGTCGCTATAGAAAAGCAGATGGCCGTGCAGAAATAC	364
zebrafish	GATGGGGTTTTACGGACAGCTACAGTCGCTACCGGAAGCAAATGGCCGTGAAGAAGTAT	455
catfish	GACGGCATTTCACGGACAGCTACTCGCGCTACCGGAAACAAATGGCCGTAAAAAATAC	453
channel	GACGGCATTTCACGGACAGCTACAGCCGCTACCGGAAACAAATGGCCGTAAAAAATAC	456
	** * * * *	
mossambicus	CTGGCAGCGGTTCTGGGTAGAAAGGTACAGACAGAGAGTTAGGAACAAGGACGCCGGCTT	599
Nile	CTGGCAGCGGTTCTGGGTAGAAAGGTACAGACAGAGAGTTAGGAACAAGGACGCCGGCTT	424
zebrafish	CTGGCCACGGTCCTTGGCAAAAGGTATAGACAGAGATATAGAAGCAAAGGACGCCGGCTC	515
catfish	CTTGCAGCAGTGCTGGGAAGAAGGTACAGACAGAGGTTAGAAACAAGGACGCCGATG	513
channel	CTTGCAGCAGTGCTGGGAAGAAGGTACAGACAGAGGTTAGAAACAAGGACGCCGCTTT	516
	** * * * *	
mossambicus	GCC-TA-----TTTGTAGCGCTGTTAAGGCGCTCAAACCTGCCCTCTGTGTATATACA	651
Nile	GCC-TA-----TTTGTAGCGCTGTTAAGGCGCTCAAACCTGCCCTCTGTGTATATACA	476
zebrafish	GCT-TA-----TTTGTAG-----TAA-----	530
catfish	GTTGTACCATCAGTTTGGACGGGCATTAGGGA-----	545
channel	GCT-TA-----TTTG-----TAG-----	528
	* ** * * * *	
mossambicus	TCCAGTCGTTAAATCGAAGTCATTTCAGATATATCTGACCAACCAGTGGATTGCGCCTGTG	711
Nile	TCCAGTCGTTAAATCGAAGTCATTTCAGATATATCTGACCAACCAGTGGATTGCGCCTGTG	536
zebrafish	-----	
catfish	-----	
channel	-----	
mossambicus	TTCTTTCAACATGTATTT-ATGTATGAAGTAAAGCCATTAAATGAATATTTAATAACA	770
Nile	TTCTTTCAACATGTATTTATGTATGAAGTAAAGCCATTAAATGAATATTTAATAAAA	596
zebrafish	-----	
catfish	-----CACTGTCATAATCACTCCGGAGAAG	570
channel	-----	
mossambicus	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA- 798	
Nile	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 625	
zebrafish	-----	
catfish	AGAGGAAAAAGGTATTAA----- 588	
channel	-----	

ภาพที่ 11 (ต่อ)

ccccaaagacgagacttgaaaaacgacgcattcgcgatgaggacgggaattcgttgccgcatg	60
P K T R L E N D A F D E D G N S L S V M	20
ggttttgatagtgatcagattgctatacgaagcccgccatccttaaacgacgacgcatac	120
G F D S D Q I A I R S P P S L N D D A Y	40
acccataactaccacaggagaagagaccagaaaaggcatgctgaggaagaattagataga	180
T L Y Y P Q E K R P E R H A E E E L D R	60
gccttgagggagatcctgggtcagttaacagcgcgagacattatctgcatttctctgatgaca	240
A L R E I L G Q L T A R H Y L H S L M T	80
attcgtgcagggtgacgacaacagcatggaggaagaatcagagcccttatccaaaagacac	300
I R A G D D N S M E E E S E P L S K R H	100
tcagatgggatcttccactgacagctacagtcgctatagaaaagcagatggccgtgcagaaa	360
S D G I F T D S Y S R Y R K Q M A V Q K	120
tacctggcagcgggttctgggtagaaggtacagacagagagttaggaacaaaggacgccgg	420
Y L A A V L G R R Y R Q R V R N K G R R	140
cttgccctatttgtagcgcgtgtaaggcgcctcaaaactgccctcctgttaatcactagtgaa	480
L A Y L -	144
ttcgcggcccgctgcaggtcgaccatatgggagagctccaacgcgcttgatgcatagct	540
tgagtattctatagtgtcacctaataatagcttggcgtaatcatggtcatagcaaaaaaaaa	600
aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	625

ภาพที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *GHRH-PACAP* (รายละเอียดลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 4)

หมายเหตุ ส่วนที่เน้นสีเทา คือ นิวคลีโอไทด์ส่วนที่ขาดหายไป เมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนแบบที่ 1 (แบบยาว) และชิ้นส่วนแบบที่ 2 (แบบสั้น) ที่โคลนได้

ตัวอักษรที่อยู่ในกล่องสีขาว คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *GHRH*

ตัวอักษรที่ขีดเส้นใต้ประ คือ ลำดับกรดอะมิโนของยีน *PACAP*

ผลจากการโคลน cDNA บางส่วน ของยีน *GH* ของปลานิล ด้วยวิธี 3'-RACE พบว่าดีเอ็นเอที่โคลนได้มีขนาดความยาวประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 10) แล้วทำการตัดเจลตรงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์พบว่า cDNA ของยีน *GH* ในปลานิลที่โคลนได้ มีความยาวทั้งสิ้น 718 คู่เบส เมื่อนำลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ยีน *GH* ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับยีน *GH* ของปลาชนิดต่างๆ คือ ปลานิล (M26916.1) ปลาหมอเทศ (AF033805.1) ปลากระรังคอกแดง (AY1555226.1) และปลา gilthead sea bream (AY553201.1) พบว่าลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีน *GH* ของปลาชนิดต่างๆ ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank (ภาพที่ 14) นิวคลีโอไทด์ของยีน *GH* ในปลานิลที่โคลนได้สามารถแปลได้กรดอะมิโน จำนวน 163 ตัว และมีนิวคลีโอไทด์ด้าน 3'-UTR จำนวน 226 คู่เบส (ภาพที่ 15)

1.2 การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ complementary DNA (cDNA) ของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* ในปลานิล ด้วยวิธี RT-PCR

สำหรับการโคลน cDNA ยีน β -actin ของปลานิล ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าดีเอ็นเอที่โคลนได้มีขนาดความยาวประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 10) หลังจากทำการตัดเจลตรงตำแหน่งแถบดีเอ็นเอที่ต้องการไปทำให้บริสุทธิ์และหาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์พบว่า cDNA ของยีน β -actin ในปลานิลที่โคลนได้ มีความยาวทั้งสิ้น 499 คู่เบส (ภาพที่ 16) เมื่อนำลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ยีน β -actin ที่โคลนได้ ไปเปรียบเทียบกับยีน β -actin ของปลาชนิดต่างๆ คือ ปลานิล (EF206801.1) ปลาหมอเทศ (Y18689.1) และปลาปักเป้า (*Takifugu obscurus*) (EU871643.1) พบว่าลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีน β -actin ของปลาชนิดต่างๆ ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยนิวคลีโอไทด์ของยีน β -actin ในปลานิลที่โคลนได้สามารถแปลได้กรดอะมิโน จำนวน 166 ตัว (ภาพที่ 17)

และหลังจากทราบลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *GHRH*, *PACAP*, *GH* และ β -actin ของปลานิลแล้ว ข้อมูลที่ได้จะถูกใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำไปใช้ใน Real time-RT PCR สำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป


```

niloticus      GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCACGCTCCTTACGGAACTATTATCAA 480
mossambicus   GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCACGCTCCTTACGGAACTATTATCAA 480
orange-spotted GCAGAGCTCTTCCCTGACAGCTCCGCCCTCCAGCTGGCTCCTTATGGGAACTATTATCAG 480
gilthead      GCAGAGATCTTCCCTGATAGCTCCGCCCTCCAGCTGGCTCCTTATGGAACTACTACCAA 480
Nile          GCAGAGAATTATCCTGACACCGACACCCTCCAGCACGCTCCTTACGGAACTATTATCAA 357
** ** * ** ** * * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

niloticus      AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG 540
mossambicus   AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG 540
orange-spotted AGTCTGGGCGCCGACGAGTCACTGCGACGAACGTACGAACGTGCTGGCTTGCTTCAAGAAA 540
gilthead      AGTCTGGGACCGACGAGTCACTGAGACGAACCTACGAACCTACTGCTGTTTCAAAAAA 540
Nile          AGTCTGGGAGGCAACGAATCGCTGAGACAAACTTATGAATTGCTGGCTTGCTTCAAGAAG 417
***** * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

niloticus      GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA 600
mossambicus   GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA 600
orange-spotted GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA 600
gilthead      GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA 600
Nile          GACATGCACAAGGTGGAGACCTACCTGACGGTAGCTAAATGTCGACTCTCTCCAGAAGCA 477
***** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **

niloticus      AACTGCACTCTGTAG----- 615
mossambicus   AACTGCACTCTGTAG----- 615
orange-spotted AACTGTACCCTGTAG----- 615
gilthead      AACTGCACCCTGTAG----- 615
Nile          AACTGCACTCTGTAGCTCCACCTAATATTGATACTGATACGTGCTGTAGCCCCACCT 537
***** ** ** ** **

niloticus      -----
mossambicus   -----
orange-spotted -----
gilthead      -----
Nile          CATGTTGGCAAACCTCTGCTTACATGTGTAGCATTAGCAATAGGATAATAATAGCAGTGG 597

niloticus      -----
mossambicus   -----
orange-spotted -----
gilthead      -----
Nile          TAATCGTGACATCAGAAGTTTTTCTGACATAACTGTGATGCAAGGTGTGAACGGGAATAA 657

niloticus      -----
mossambicus   -----
orange-spotted -----
gilthead      -----
Nile          TGTTATTCTGTGAAATAAATGTGTGTCATTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 717

niloticus      -
mossambicus   -
orange-spotted -
gilthead      -
Nile          A 718
    
```

ภาพที่ 14 (ต่อ)

cagagactcttctcggactttgagagctctctgcagacggaggagcaacgtcagctcaac	60
Q R L F S D F E S S L Q T E E Q R Q L N	20
aaaatcttctcctgcaggactttgcaactctgattacatcatcagcccgatcgacaaacac	120
K I F L Q D F C N S D Y I I S P I D K H	40
gagacgcagcgcagctcggtcctgaagctgctgtcgcgatctcctatggactggttgagtcc	180
E T Q R S S V L K L L S I S Y G L V E S	60
tgaggagtttcccagtcgctctctgtctggaggttcctctctgaggaaccagatttcacca	240
W E F P S R S L S G G S S L R N Q I S P	80
aggctgtctgagcttaaaacgggaatcttgctgctgatcagggccaatcaggatgaagca	300
R L S E L K T G I L L L I R A N Q D E A	100
gagaattatcctgacaccgacaccctccagcagcgtccttacggaaactattatcaaagt	360
E N Y P D T D T L Q H A P Y G N Y Y Q S	120
ctgggaggcaacgaatcgctgagacaaacttatgaattgctggcttgcttcaagaaggac	420
L G G N E S L R Q T Y E L L A C F K K D	140
atgcacaaggtggagacctacctgacggtagctaaatgtcgactctctccagaagcaaac	480
M H K V E T Y L T V A K C R L S P E A N	160
tgcactctgtagctccacctaataattgatactgatacgtgctctgtagccccaccctcat	540
C T L	163
gttggcaaactctgcttacatgtgtagcattagcaataggataataatagcagtggttaa	600
tcgtgacatcagaagttttctgacataactgtgatgcaaggtgtgaacgggaataatgt	660
tattctgtgaaataaatgtggttgattgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	718

ภาพที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน GH ที่โคลนได้ ของปลานิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน GH

niloticus	TTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCCCTCTGGT	426
mossambicus	TTCAACACCCCCGCCATGTACGTTGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTACGCCCTCTGGT	519
Nile	-----	
takifugu	TTCAACACCCCCGCCATGTACGTCGCCATCCAGGCTGTGCTGTCCCTGTATGCCCTCCGGT	600
niloticus	CGTACCCTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGTGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTAC	486
mossambicus	CGTACCCTGGTATCGTCATGGACTCCGGTGTGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTAC	579
Nile	-----	
takifugu	CGTACCCTGGTATCGTCATGGACTCTGGTGTGGTGTGACCCACACAGTGCCCATCTAC	660
niloticus	GAGGGTTATGCCCTGCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTGGCTGGCCGTGACCTCACA	546
mossambicus	GAGGGTTATGCCCTGCCACGCCATCCTGCGTCTGGACTGGCTGGCCGTGACCTCACA	639
Nile	-----	
takifugu	GAGGGCTACGCTCTGCCACGCCATCCTGCGTCTGGATCTGGCCGGCCGTGACCTCACA	720
niloticus	GACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTACCACCACAGCCGAGAGG	606
mossambicus	GACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTACCACCACAGCCGAGAGG	699
Nile	-----CCTCATCAAGATCCTGACAGAGCGTGGCTACTCCTTACCACCACAGCCGAGAGG	55
takifugu	GACTACCTCATGAAGATCCTGACAGAGCGTGGTACTCCTTACTACCACAGCTGAGAGG	780

niloticus	GAAATCGTGCCTGACATCAAAGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAG	666
mossambicus	GAAATCGTGCCTGACATCAAAGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAG	759
Nile	GAAATCGTGCCTGACATCAAAGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAG	115
takifugu	GAAATCGTGCCTGACATCAAAGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAGGAG	840

niloticus	ATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGAGTTACGAGCTGCCTGACGGACAG	726
mossambicus	ATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGAGTTACGAGCTGCCTGACGGACAG	819
Nile	ATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGAGTTACGAGCTGCCTGACGGACAG	175
takifugu	ATGGGCACCGCTGCCTCCTCCTCCTCCTGGAGAAGAGTTACGAGCTGCCTGACGGACAG	900

niloticus	GTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCTGAGGCCCTCTCCAGCCTTCCTTC	786
mossambicus	GTCATCACCATTGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCCTGAGGCCCTCTCCAGCCTTCCTTC	879
Nile	GTCATCACCATTGGTAATGAGAGGTTCCGTTGCCCTGAGGCCCTCTCCAGCCTTCCTTC	235
takifugu	GTCATCACCATCGGCAATGAGAGGTTCCGTTGCCAGAGGCCCTCTCCAGCCATCCTTC	960
	***** * * *****	
niloticus	CTTGGTATGGAATCCTGCGGAATCCACGAAACCCTACAACAGCATCATGAAGTGCAC	846
mossambicus	CTTGGTATGGAATCCTGCGGAATCCACGAAACCCTACAACAGCATCATGAAGTGCAC	939
Nile	CTTGGTATGGAATCCTGCGGAATCCACGAAACCCTACAACAGCATCATGAAGTGCAC	295
takifugu	CTTGGTATGGAATCCTGCGGAATCCACGAGACTACTACAACAGCATCATGAAGTGCAC	1020
	***** * * *****	
niloticus	GTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACCCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTAC	906
mossambicus	GTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACCCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTAC	999
Nile	GTCGACATCCGTAAGGACCTGTACGCCAACCCGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTAC	355
takifugu	GTCGACATCCGTAAGGACCTGTATGCCAACACTGTGCTGTCTGGAGGTACCACCATGTAC	1080
	***** * * *****	

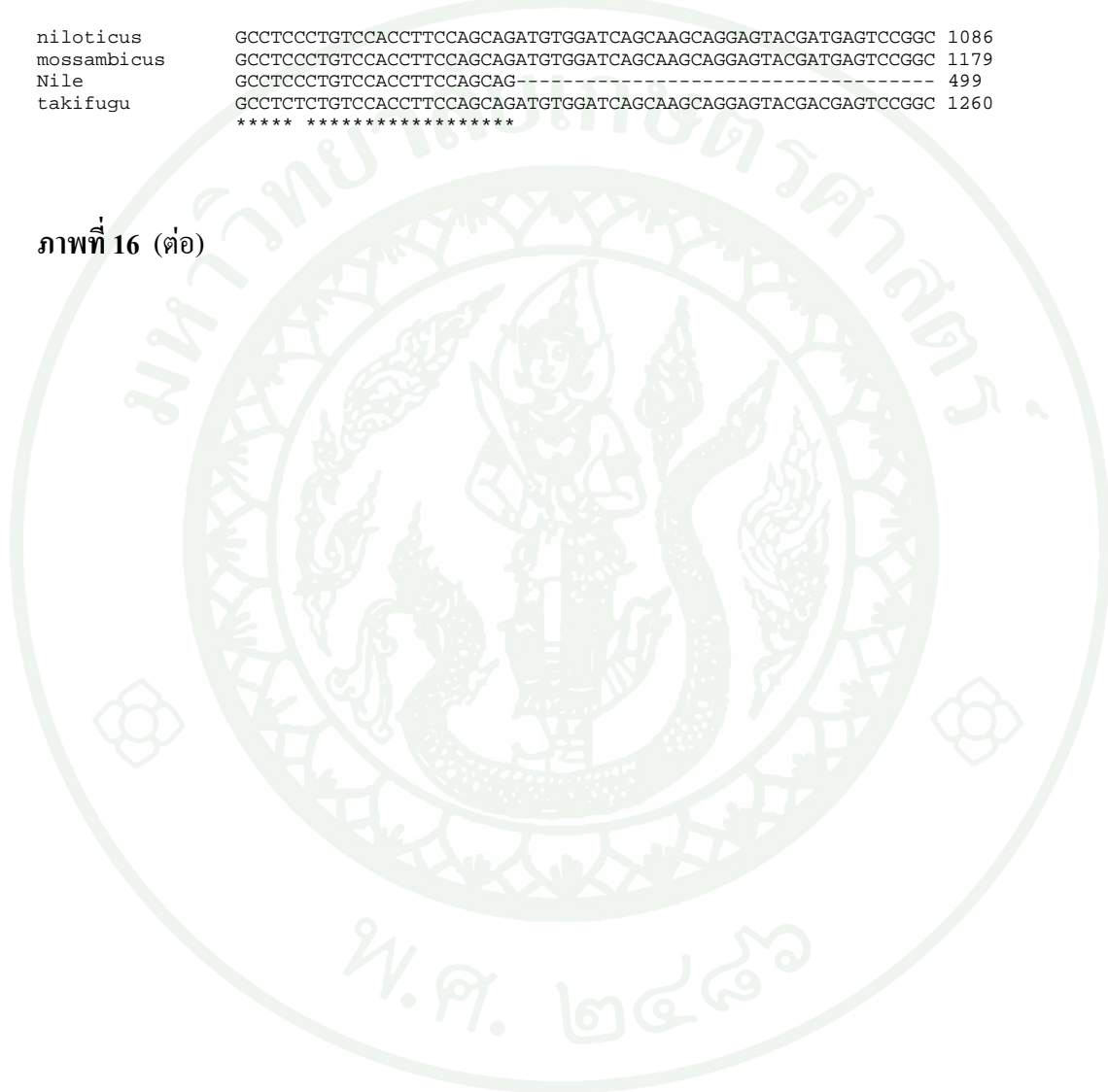
ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน cDNA ยีน β -actin ที่โคลนได้ ของปลานิล กับยีน β -actin ของปลาชนิดอื่นๆ

หมายเหตุ ลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ยีน β -actin ของปลาทั้ง 3 ชนิด มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank ดังนี้ niloticus: ปลานิล (EF206801.1), mossambicus: ปลานมเทศ (Y18689.1), takifugu: ปลาปักเป้า (*Takifugu obscura*) (EU871643.1) และ Nile: ยีน β -actin ของปลานิลที่โคลนได้

niloticus	CCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAG	966
mossambicus	CCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAG	1059
Nile	CCTGGCATCGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAG	415
takifugu	CCCGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACAGCCCTGGCCCCATCCACCATGAAG	1140
	** ** ** ** **	
niloticus	ATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCCGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTG	1026
mossambicus	ATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCCGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTG	1119
Nile	ATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCCGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTG	475
takifugu	ATCAAGATCATTGCCCCACCTGAGCGTAAATACTCTGTCTGGATCGGAGGCTCCATCCTG	1200

niloticus	GCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGC	1086
mossambicus	GCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGC	1179
Nile	GCCTCCCTGTCCACCTTCCAGCAG-----	499
takifugu	GCCTCTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGACGAGTCCGGC	1260

ภาพที่ 16 (ต่อ)



cctcatgaagatcctgacagaggggtggctactccttcaccaccacagccgagagggaaatc 60
 L M K I L T E G G Y S F T T T A E R E I 20

 gtgCGTgacatcaaggagaagctgtgctacgtcgcCCTggacttcgagcaggagatgggc 120
 V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M G 40

 accgctgcctcctcctcctccctggagaagagttacgagctgcctgacggacaggtcatc 180
 T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V I 60

Actin F RT
 accattggcaatgagaggttccgTTgCctgagggccctcttccagccttccttccttggt 240
 T I G N E R F R C P E A L F Q P S F L G 80

Actin R RT
 atggaatcctgcggaatccacgaaaccacctacaacagcatcatgaagtgtgacgtcgac 300
 M E S C G I H E T T Y N S I M K C D V D 100

 atccgtaaggacctgtacgccaacaccgtgctgtctggaggtaccaccatgtaccctggc 360
 I R K D L Y A N T V L S G G T T M Y P G 120

 atcgctgacaggatgcagaaggagatcacagccctggcccatccaccatgaagatcaag 420
 I A D R M Q K E I T A L A P S T M K I K 140

 atcatgccccacctgagcgtaaatactccgtctggatcggaggctccatcctggcctct 480
 I I A P P E R K Y S V W I G G S I L A S 160

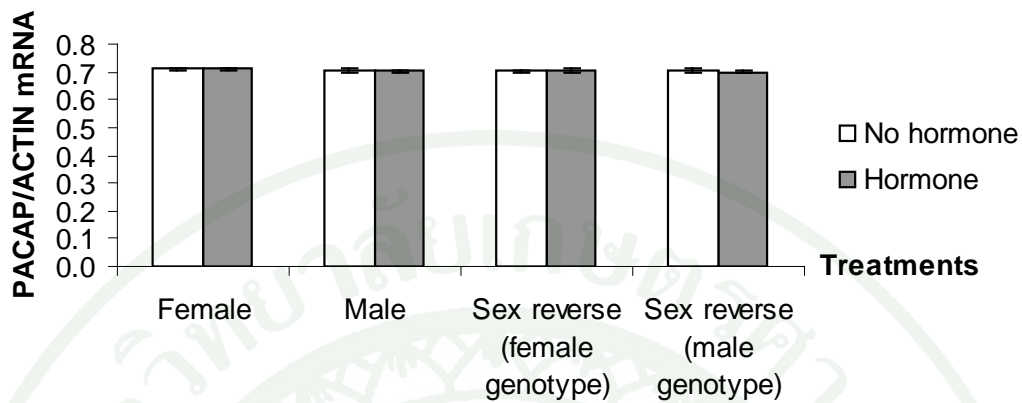
 ctctccaccttccagcag 499
 L S T F Q Q 166

ภาพที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนที่แปลจากนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *β-actin* ที่โคลนได้ ของ
 ปลายินิล และตำแหน่ง Primers ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *β-actin*

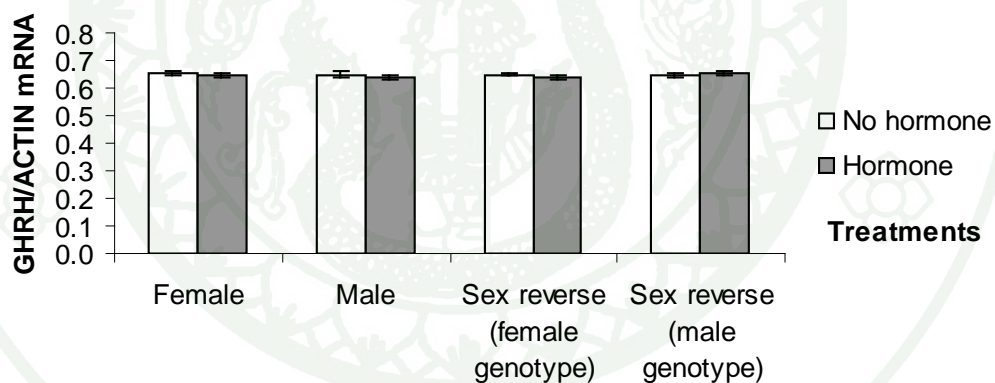
1.3 ผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* ในปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ ปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศผู้

การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* ในปลานิล ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR โดยในการศึกษาครั้งนี้แบ่งปลานิลออกเป็น 4 เพศ คือ ปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ ปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศผู้ การแยกเพศปลาในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการสังเกตจากดิงเพศโดยผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งเป็นเกษตรกรที่มีประสบการณ์ในการเพาะเลี้ยงปลานิล จากการวิเคราะห์ค่า relative expression ratio ของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* เปรียบเทียบกับ ยีน β -actin ที่ใช้เป็น reference gene พบว่าการแสดงออกของยีน *GHRH* และ *PACAP* มีการแสดงออกของยีนในปริมาณสูง อยู่ในระดับประมาณ 0.64-0.66 และ 0.70-0.71 เท่า ตามลำดับ (ภาพที่ 20 และ 21) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าปริมาณ *PACAP* mRNA สูงกว่า *GHRH* mRNA

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนแต่ละตำแหน่ง พบว่ายีน *GHRH* และ *PACAP* ทั้งสองตำแหน่งมีการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันในปลานิลทุกกลุ่มทดลอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งปลานิลเพศผู้ ปลานิลเพศเมีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศผู้ ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเพศและการแปลงเพศไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *GHRH* และ *PACAP* และเมื่อศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองตำแหน่ง พบว่าในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน MT มีแสดงออกของยีนทั้งสองตำแหน่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ไม่ได้รับฮอร์โมน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 18 และ 19)

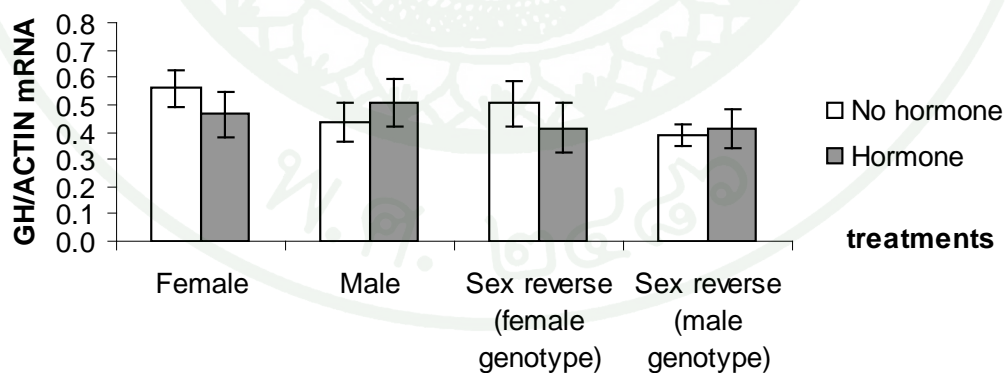


ภาพที่ 18 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *PACAP* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล



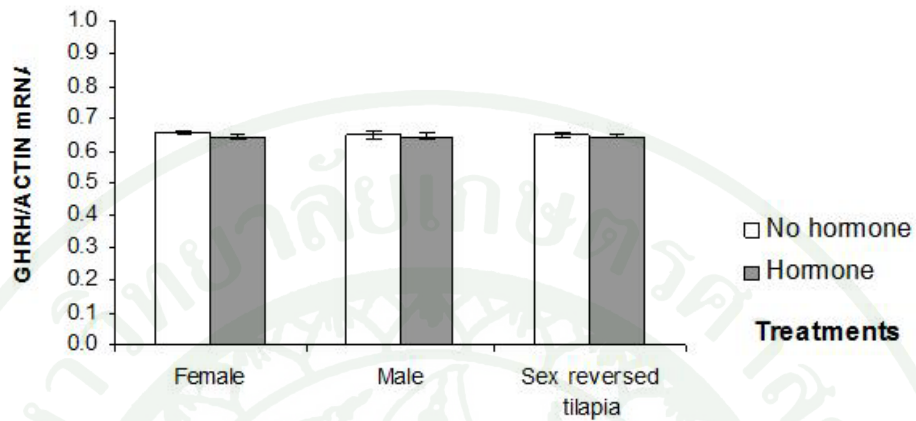
ภาพที่ 19 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล

ฮอร์โมน *GHRH* และ *PACAP* เป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากสมองส่วนไฮโปทาลามัสไปยังต่อมใต้สมองเพื่อกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองมีการหลั่ง *GH* เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *GHRH* และ *PACAP* ที่สมองแล้ว การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาการแสดงออกของยีน *GH* จากต่อมใต้สมองเป็นอันดับถัดไป ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *GH* ในปลานิลทุกกลุ่มทดลอง ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเพศและฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *GH* (ภาพที่ 20) เป็นที่น่าสังเกตได้ว่าการแสดงออกของยีน *GH* ในต่อมใต้สมองของปลานิลมีความแปรปรวนสูง โดยมีค่าระหว่าง 0.39-0.56 เท่า เมื่อเทียบกับการแสดงออกของ β -actin (reference gene) พบว่าในปลานิลเพศเมียมีระดับการแสดงออกของยีน *GH* สูงกว่าปลานิลเพศผู้ และเมื่อปลานิลเพศเมียได้รับการแปลงเพศ พบว่าการแสดงออกของยีนมีแนวโน้มเหมือนกับเพศดั้งเดิมก่อนการแปลงเพศ กล่าวคือ ระดับการแสดงออกของยีน *GH* สูงกว่าปลานิลแปลงเพศที่เพศดั้งเดิมเป็นเพศผู้ จากการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของปลานิลทั้ง 4 เพศ พบว่าปลานิลเพศเมียเมื่อได้รับฮอร์โมนมีระดับการแสดงออกของยีนลดน้อยลง ส่วนในปลานิลเพศผู้เมื่อได้รับฮอร์โมนมีระดับการแสดงออกของยีนเพิ่มสูงขึ้น ในกลุ่มปลานิลแปลงเพศพบว่าการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับฮอร์โมนมีความสอดคล้องกับเพศดั้งเดิม คือ ปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศเมียมีระดับการแสดงออกของยีนลดลงเช่นเดียวกับเพศเมียปกติ ส่วนปลานิลแปลงเพศที่พันธุกรรมเป็นเพศผู้มีระดับการแสดงออกของยีนก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเพศผู้ปกติ



ภาพที่ 20 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล

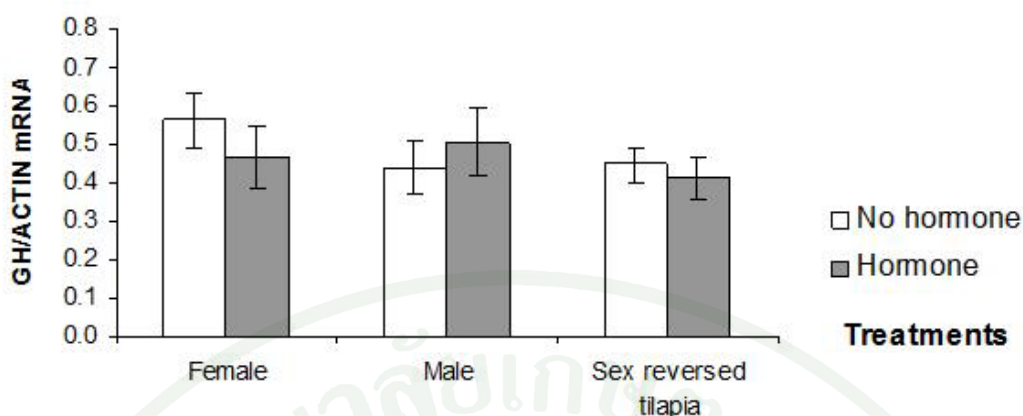
ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* ในปลานิลเพศเมีย เพศผู้ และปลาแปลงเพศโดยไม่แยกเพศตามพันธุกรรม แสดงดังภาพที่ 21-23



ภาพที่ 21 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล



ภาพที่ 22 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *PACAP* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล



ภาพที่ 23 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR ในปลานิล

1.4 ผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

จากการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิล โดยเปรียบเทียบระหว่างปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ ปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) และปลานิลแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้) อีกทั้งศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อรูปแบบการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิลทั้ง 4 กลุ่ม พบว่าหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 35 วัน น้ำหนักของปลานิลทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อเลี้ยงต่อไปอีก 35 วัน พบว่าน้ำหนักของปลานิลเริ่มแตกต่างกัน โดยปลานิลเพศเมียมีน้ำหนักน้อยที่สุด และน้ำหนักมากที่สุดพบในกลุ่มปลานิลแปลงเพศ การได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อน้ำหนักของปลานิล เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าเพศมีผลต่อน้ำหนักหลังจากเลี้ยงเป็นระยะเวลา 70 วัน ($P<0.05$) หลังจากนั้นทำการเลี้ยงต่อไปอีก 35 วัน รวมระยะเวลาการเลี้ยงตั้งแต่เริ่มต้นการทดลอง เท่ากับ 105 วัน พบว่าน้ำหนักตัวของปลานิลอยู่ระหว่าง 314.3-422.2 กรัมต่อตัว พบว่ามีความแตกต่างของน้ำหนักในแต่ละเพศ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลานิลเพศผู้มีน้ำหนักมากกว่าปลานิลเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศไม่ว่าเพศดั้งเดิมจะเป็นเพศใดก็ตามมีน้ำหนักสุดท้ายไม่แตกต่างจากปลานิลเพศผู้ปกติ การได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ปลานิลเพศเมียมีน้ำหนักเพิ่มสูงขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่ส่งผลต่อปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 5)

ที่ระยะเวลาการทดลอง 105 วัน พบว่าปลานิลมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักตัว (WG) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง อยู่ระหว่าง 512.7-688.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ปลานิลเพศเมียมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักตัวแตกต่างจากปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศ ทั้งสองกลุ่ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยร่วมระหว่างเพศและฮอร์โมน MT ต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักตัวพบว่าไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยน้ำหนักตัวหลังการทดลองมีความสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การเพิ่มน้ำหนักตัว (WG) น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นต่อวันของปลานิล (ADG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) โดยพบว่า เพศมีผลต่อค่า ADG และ SGR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ) โดยค่า ADG และ SGR มีค่ามากที่สุดที่ปลานิลแปลงเพศ รองลงมา คือ ปลานิลเพศผู้และปลานิลเพศเมีย มีค่า ADG และ SGR ต่ำที่สุด และการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อค่า ADG และ SGR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ในการศึกษาครั้งนี้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนัก (FCR) อยู่ระหว่าง 0.8-1.38 โดยพบว่าเพศมีผลต่อค่า FCR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) โดยปลานิลเพศผู้มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลแปลงเพศ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มที่เพศดั้งเดิมเป็นเพศผู้ ส่วนปลานิลเพศเมียมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักสูงที่สุด และมีค่าใกล้เคียงกับปลานิลแปลงเพศที่เพศดั้งเดิมเป็นเพศเมีย นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT มีผลต่อค่า FCR ($P < 0.05$) โดยการได้รับฮอร์โมน MT มีผลให้ปลานิลเพศเมียมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักลดลง (ตารางที่ 6) ปลานิลมีอัตราการรอดตาย (survival rate) อยู่ระหว่าง 93.3-96.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการรอดตายของทุกกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 5 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อน้ำหนักตัวเริ่มต้น น้ำหนักตัวที่ 35 วัน น้ำหนักตัวที่ 70 วัน และน้ำหนักตัวที่ 105 วัน ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักหลังเลี้ยง 35 วัน (g)	น้ำหนักหลังเลี้ยง 70 วัน (g)	น้ำหนักหลังเลี้ยง 105 วัน (g)
เพศเมีย	0	53.7 ± 0.7	162.7 ± 5.3	260.7 ± 17.9 ^a	314.3 ± 21.9 ^a
เพศเมีย	10	52.8 ± 0.4	166.5 ± 6.6	257.9 ± 6.8 ^a	346.9 ± 9.9 ^b
เพศผู้	0	54.2 ± 0.8	175.7 ± 2.0	293.3 ± 16.3 ^{ab}	403.0 ± 7.5 ^c
เพศผู้	10	54.6 ± 0.6	178.6 ± 0.3	285.6 ± 1.9 ^{ab}	396.8 ± 0.4 ^c
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศเมีย)	0	52.8 ± 0.6	167.6 ± 7.6	290.0 ± 5.5 ^{ab}	416.5 ± 9.9 ^c
แปลงเพศ พันธุกรรมเพศเมีย)	10	55.4 ± 1.1	158.6 ± 17.0	287.3 ± 19.0 ^{ab}	412.8 ± 9.6 ^c
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศผู้)	0	55.7 ± 1.4	170.2 ± 3.7	292.2 ± 1.3 ^{ab}	422.2 ± 31.9 ^c
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศผู้)	10	54.7 ± 2.3	175.4 ± 1.8	305.4 ± 2.6 ^b	412.3 ± 16.3 ^c
ผลของปัจจัย					
เพศ		ns	ns	*	**
ฮอร์โมน		ns	ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		ns	ns	ns	*

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 6 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (WG) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	WG (%)	ADG (g/day)	SGR (%)	FCR	Survival rate (%)
เพศเมีย	0	512.7 ± 41.2 ^a	2.17 ± 0.38 ^a	1.72 ± 0.08 ^a	1.38 ± 0.09 ^d	95.0 ± 1.0
เพศเมีย	10	557.4 ± 24.3 ^b	2.58 ± 0.05 ^{ab}	1.79 ± 0.03 ^{ab}	0.93 ± 0.10 ^{ab}	95.0 ± 0.0
เพศผู้	0	643.5 ± 25.7 ^{bc}	3.25 ± 0.08 ^{bc}	1.91 ± 0.03 ^{bc}	0.96 ± 0.06 ^{abc}	96.6 ± 2.0
เพศผู้	10	626.8 ± 8.1 ^{bc}	3.11 ± 0.00 ^{bc}	1.89 ± 0.01 ^{abc}	0.85 ± 0.15 ^a	95.0 ± 1.0
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศเมีย)	0	688.5 ± 9.1 ^c	3.55 ± 0.04 ^c	1.97 ± 0.01 ^c	1.23 ± 0.12 ^{bcd}	93.3 ± 2.0
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศเมีย)	10	613.8 ± 19.5 ^{abc}	3.63 ± 0.11 ^c	1.87 ± 0.03 ^{abc}	1.28 ± 0.01 ^{cd}	95.0 ± 1.5
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศผู้)	0	647.0 ± 75.3 ^{bc}	3.60 ± 0.40 ^c	1.91 ± 0.09 ^{bc}	0.80 ± 0.04 ^a	96.6 ± 0.0
แปลงเพศ (พันธุกรรมเพศผู้)	10	654.0 ± 2.8 ^{bc}	3.38 ± 0.25 ^c	1.92 ± 0.00 ^{bc}	0.88 ± 0.11 ^a	96.6 ± 1.0
ผลของปัจจัย						
เพศ		*	**	*	**	ns
ฮอร์โมน		ns	ns	ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		ns	ns	ns	*	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

2. ผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในเลือด ค่าทางภูมิคุ้มกัน และกายวิภาคของลำไส้ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

2.1 อัตราการเจริญเติบโตของปลานิล

การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ และปลานิลแปลงเพศ โดยทำการเลี้ยงปลานิลเพศต่างๆ ด้วยอาหารผสมฮอร์โมนที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เสริมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 70 วัน (10 สัปดาห์) ก่อนเริ่มทำการทดลองพบว่าน้ำหนักเริ่มต้น มีค่าอยู่ในช่วง 73.1-86.8 กรัมต่อตัว ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และหลังจากเลี้ยง 35 วัน พบว่าเพศของปลานิลส่งผลต่อน้ำหนักตัว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลานิลเพศเมียมีน้ำหนักน้อยที่สุด ส่วนปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศมีค่าน้ำหนักตัวไม่แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การได้รับฮอร์โมน MT และปัจจัยร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว ($P>0.05$) (ตารางที่ 7)

ผลการทดลองที่ระยะเวลาการเลี้ยง 70 วัน พบว่าอัตราการเจริญเติบโตมีความสอดคล้องกับการเลี้ยง 35 วัน เพศมีผลต่อน้ำหนักตัวสุดท้าย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลานิลเพศเมียมีน้ำหนักน้อยที่สุด และปลานิลเพศผู้มีน้ำหนักมากที่สุด รองลงมา คือ ปลานิลแปลงเพศ การได้รับฮอร์โมน MT และปัจจัยร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อน้ำหนักของปลานิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 7)

ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 70 วัน พบว่าเพศมีผลต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (WG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และพบอิทธิพลร่วมของเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT มีผลต่อค่า WG และ SGR อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปลานิลเพศเมียมีค่า WG และ SGR น้อยที่สุด และเมื่อได้รับฮอร์โมน MT ทำให้ปลานิลเพศเมียมีค่า WG และ SGR เพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่า WG และ SGR ใกล้เคียงกับปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศ พบว่าเพศมีผลต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (ADG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศมีค่า ADG สูงที่สุด และปลานิลเพศเมีย มีค่า ADG ต่ำที่สุด ส่วนการได้รับฮอร์โมน MT และปัจจัยร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อค่า ADG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลานิล (FCR) พบว่าเพศมีผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปลานิลเพศเมียมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด อัตราการรอดตายของปลานิลหลังจากเลี้ยงครบ 70 วัน (survival rate) พบว่าทุกกลุ่มมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีอัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 92.5-97.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)



ตารางที่ 7 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อด่อน้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักตัวที่ 35 วัน และน้ำหนักตัวที่ 70 วัน ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	น้ำหนักเริ่มต้น (g)	น้ำหนักหลังเลี้ยง 35 วัน (g)	น้ำหนักหลังเลี้ยง 70 วัน (g)
เพศเมีย	0	79.8 ± 0.6	187.8 ± 6.3 ^a	277.7 ± 6.5 ^a
เพศเมีย	10	73.1 ± 6.0	193.9 ± 4.1 ^{ab}	301.9 ± 23.9 ^{ab}
เพศผู้	0	86.8 ± 1.4	221.0 ± 0.9 ^c	374.0 ± 1.5 ^c
เพศผู้	10	83.3 ± 5.5	214.0 ± 3.7 ^c	367.2 ± 5.3 ^c
แปลงเพศ	0	73.6 ± 1.8	196.9 ± 1.7 ^{ab}	342.3 ± 1.3 ^{bc}
แปลงเพศ	10	77.4 ± 1.4	207.7 ± 7.6 ^{bc}	351.5 ± 19.5 ^c
ผลของปัจจัย				
เพศ		ns	**	**
ฮอร์โมน		ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		ns	ns	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 8 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (WG) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อตัวต่อวัน (ADG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	WG (%)	ADG (g/day)	SGR (%)	FCR	Survival rate (%)
เพศเมีย	0	248.2 ± 10.9 ^a	2.83 ± 0.10 ^a	1.79 ± 0.05 ^a	1.48 ± 0.04 ^b	93.8 ± 1.3
เพศเมีย	10	323.1 ± 11.2 ^b	3.36 ± 0.16 ^b	2.03 ± 0.00 ^b	1.25 ± 0.07 ^a	95.0 ± 0.0
เพศผู้	0	331.1 ± 5.3 ^b	4.11 ± 0.01 ^c	2.09 ± 0.02 ^{bc}	1.07 ± 0.03 ^a	95.0 ± 0.0
เพศผู้	10	342.5 ± 22.8 ^b	4.06 ± 0.00 ^c	2.13 ± 0.08 ^{bc}	1.08 ± 0.01 ^a	97.5 ± 0.0
แปลงเพศ	0	365.3 ± 8.2 ^b	3.84 ± 0.00 ^c	2.20 ± 0.03 ^c	1.16 ± 0.04 ^a	92.5 ± 2.5
แปลงเพศ	10	353.8 ± 17.3 ^b	3.92 ± 0.26 ^c	2.16 ± 0.05 ^{bc}	1.16 ± 0.14 ^a	92.5 ± 2.5
ผลของปัจจัย						
เพศ		**	**	**	*	ns
ฮอร์โมน		ns	ns	ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		*	ns	*	ns	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

2.2 ค่า heptosomatic index และกายวิภาคของลำไส้

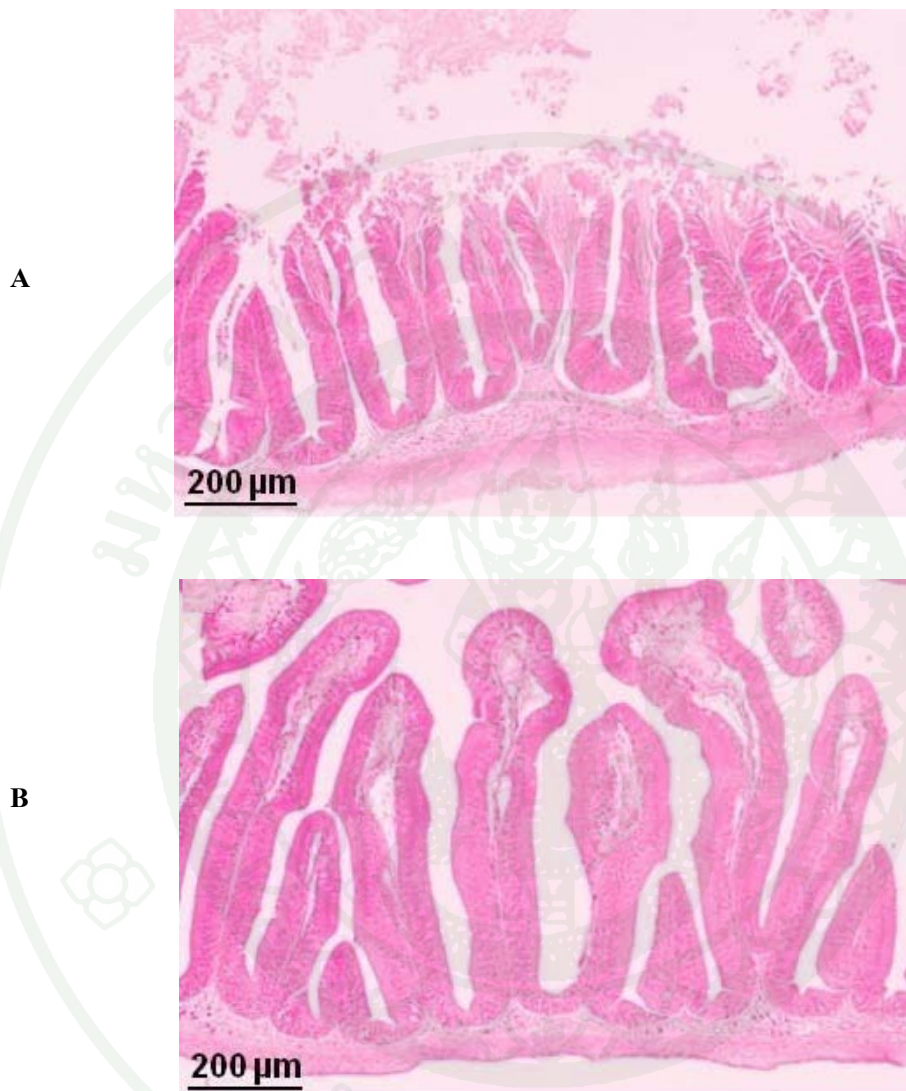
ผลการทดลองพบว่าความยาว villi ของปลานิลทั้งเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ ในลำไส้ส่วนต้น (anterior part) ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ปลานิลเพศเมียและปลานิลแปลงเพศมีความยาว villi เพิ่มขึ้น ($P<0.05$) (ตารางที่ 9 และภาพที่ 24) พบว่าความยาว villi ในลำไส้ส่วนกลาง (middle part) ของปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ ไม่มีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การได้รับฮอร์โมน MT ก็ไม่ส่งผลต่อความยาว villi ในลำไส้ส่วนกลาง และไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน ($P>0.05$) (ตารางที่ 9)

พบว่าจำนวน goblet cell ใน villi ของลำไส้ส่วนต้นและส่วนกลางของปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อจำนวน goblet cell ใน villi ของลำไส้เล็ก เช่นเดียวกัน ($P>0.05$) และพบว่า เพศ และการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีตับ (heptosomatic index) ในปลานิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อความสูงของ villi และจำนวน goblet cell ในลำไส้ส่วนต้น (anterior part) และลำไส้ส่วนกลาง (middle part) และค่า heptosomatic index ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	ความยาว Villi (μm)		จำนวน Goblet cell		HSI
		anterior part	middle part	anterior part	middle part	
เพศเมีย	0	42.55 \pm 2.44 ^a	34.99 \pm 1.98	6.08 \pm 1.03	8.50 \pm 1.17	1.94 \pm 0.19
เพศเมีย	10	52.08 \pm 2.39 ^{ab}	28.65 \pm 2.19	8.13 \pm 1.79	13.10 \pm 1.73	1.88 \pm 0.14
เพศผู้	0	48.53 \pm 6.18 ^{ab}	35.63 \pm 3.00	10.50 \pm 2.18	11.00 \pm 2.89	1.96 \pm 0.08
เพศผู้	10	50.58 \pm 3.36 ^{ab}	31.78 \pm 4.01	6.38 \pm 2.40	8.50 \pm 2.18	1.94 \pm 0.11
แปลงเพศ	0	45.23 \pm 4.05 ^a	29.77 \pm 2.83	6.55 \pm 2.40	10.20 \pm 2.80	1.74 \pm 0.22
แปลงเพศ	10	58.65 \pm 1.78 ^b	35.20 \pm 2.26	5.85 \pm 1.44	9.43 \pm 1.84	2.14 \pm 0.10
ผลของปัจจัย						
เพศ		ns	ns	ns	ns	ns
ฮอร์โมน		*	ns	ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		ns	ns	ns	ns	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 24 ความสูงของ villi ในลำไส้ส่วนต้น (anterior part) ของปลานิล

หมายเหตุ ภาพ A คือ ปลาเพศเมียที่ไม่ได้รับฮอร์โมน และภาพ B คือ ปลาเพศเมียที่ได้รับฮอร์โมน

2.3 ค่าโลหิตวิทยา

ที่ระยะเวลาการเลี้ยง 70 วัน พบว่าเพศมีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (red blood cell count, RBC) ของปลานิล ($P < 0.01$) การได้รับฮอร์โมน MT และอิทธิพลร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน ไม่ส่งผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดของปลานิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยปลานิลเพศผู้มีจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดสูงสุด เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ของปลานิล พบว่าเพศมีผลต่อปริมาณของฮีโมโกลบินในปลานิล ($P < 0.05$) โดยพบปริมาณฮีโมโกลบินสูงสุดในปลานิลเพศผู้ และพบปัจจัยร่วมระหว่างเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ในปลานิลเพศผู้ โดยเมื่อปลานิลเพศผู้ได้รับฮอร์โมนพบว่าปริมาณฮีโมโกลบินลดน้อยลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 10)

สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ของปลานิล พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น อย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 10)

เมื่อวิเคราะห์ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (MCV) ของปลานิล พบว่าเพศมีผลต่อความแตกต่างของค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงในปลานิล ($P < 0.01$) การได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลทำให้ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดงในปลานิลทั้งสามเพศมีความแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยปลานิลเพศผู้และปลาแปลงเพศมีค่า MCV สูงที่สุด เมื่อคำนวณค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCH) ของปลานิล พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่พบอิทธิพลร่วมระหว่างเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ในปลาแปลงเพศ ต่อค่า MCH โดยเมื่อปลาแปลงเพศได้รับฮอร์โมน MT ทำให้มีค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 10)

ความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ของปลานิล พบว่าเพศมีผลต่อค่า MCHC อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยปลาเพศผู้และเพศเมียมีค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าปลาแปลงเพศ เมื่อการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลให้ค่า MCHC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 10)

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว คือ lymphocyte, neutrophil และ monocyte พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และไม่พบอิทธิพลร่วมของเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT เช่นเดียวกัน ($P>0.05$) (ตารางที่ 11)



ตารางที่ 10 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (RBC) ค่าฮีโมโกลบิน (Hb) ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit) ค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (MCV) ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCH) และความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	RBC ($\times 10^6$ cells/ μ l)	Hb (g/dL)	Hematocrit (%)	MCV (fL)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dL)
เพศเมีย	0	2.07 \pm 0.03 ^a	11.11 \pm 0.35 ^a	40.05 \pm 1.40	194.28 \pm 4.38 ^a	53.85 \pm 1.85 ^{ab}	27.56 \pm 1.24 ^b
เพศเมีย	10	2.05 \pm 0.07 ^a	10.59 \pm 0.30 ^a	39.92 \pm 1.56	193.37 \pm 8.51 ^a	51.98 \pm 2.01 ^a	26.89 \pm 0.72 ^b
เพศผู้	0	2.22 \pm 0.03 ^b	12.29 \pm 0.33 ^b	45.07 \pm 2.31	206.44 \pm 10.52 ^{ab}	54.67 \pm 1.02 ^{ab}	27.64 \pm 1.25 ^b
เพศผู้	10	2.22 \pm 0.05 ^b	11.25 \pm 0.41 ^a	45.78 \pm 2.91	204.57 \pm 13.71 ^a	50.75 \pm 1.89 ^a	25.09 \pm 0.84 ^{ab}
แปลงเพศ	0	2.02 \pm 0.06 ^a	10.34 \pm 0.38 ^a	43.48 \pm 1.99	215.97 \pm 7.92 ^{ab}	51.36 \pm 1.49 ^a	23.97 \pm 0.96 ^a
แปลงเพศ	10	1.92 \pm 0.06 ^a	11.15 \pm 0.37 ^a	45.23 \pm 2.26	236.30 \pm 11.05 ^b	58.39 \pm 2.24 ^b	24.90 \pm 0.93 ^{ab}
ผลของปัจจัย							
เพศ		**	*	ns	**	ns	*
ฮอร์โมน		ns	ns	ns	ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		ns	*	ns	ns	*	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 11 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (WBC) เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	WBC (x10 ⁴ cells/ μ l)	Lymphocyte (%)	Neutrophil (%)	Monocyte (%)
เพศเมีย	0	2.01 \pm 0.07	55.88 \pm 3.30	38.88 \pm 4.02	5.25 \pm 1.32
เพศเมีย	10	1.96 \pm 0.04	52.57 \pm 3.93	42.71 \pm 4.41	4.71 \pm 1.06
เพศผู้	0	1.95 \pm 0.12	57.63 \pm 2.04	39.25 \pm 2.42	3.13 \pm 0.88
เพศผู้	10	2.14 \pm 0.10	52.57 \pm 2.72	44.00 \pm 2.90	3.43 \pm 0.72
แปลงเพศ	0	1.99 \pm 0.06	58.25 \pm 2.15	37.75 \pm 2.47	4.00 \pm 1.31
แปลงเพศ	10	1.99 \pm 0.05	51.00 \pm 2.95	44.38 \pm 3.27	4.63 \pm 0.89
ผลของปัจจัย					
เพศ		n.s	n.s	n.s	n.s
ฮอร์โมน		n.s	n.s	n.s	n.s
เพศและฮอร์โมน		n.s	n.s	n.s	n.s

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.4 ค่าทางชีวเคมีในเลือดบางประการ

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ และปลานิลแปลงเพศ ทั้งในกลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนและได้รับฮอร์โมน MT หลังจากทำการเลี้ยงครบ 70 วัน พบว่าระดับโปรตีนและคอเลสเตอรอลในเลือดของปลานิล ไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดปลานิล พบว่าเพศเมียมีระดับไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลาเพศเมียมีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงสุด รองลงมาคือ ปลาเพศผู้ และปลาแปลงเพศมีระดับไตรกลีเซอไรด์น้อยที่สุด ส่วนการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อระดับค่าไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดของปลานิล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 12)

พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT มีผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบอิทธิพลร่วมระหว่างเพศและฮอร์โมน MT มีผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปลานิลเพศผู้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดต่ำที่สุด เมื่อปลานิลเพศผู้ได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 12)

2.5 ค่าภูมิคุ้มกันบางประการ

จากการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลานิล โดยวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ lysozyme ค่า total immunoglobulin และ ACH50 พบว่าค่า lysozyme activity และค่า total immunoglobulin ในปลานิลเพศเมีย ปลานิลเพศผู้ และปลานิลแปลงเพศ มีค่าใกล้เคียงกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อวิเคราะห์ค่า ACH50 พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อค่า ACH50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) พบอิทธิพลร่วมระหว่างเพศกับการได้รับฮอร์โมน MT มีผลต่อค่า ACH50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปลานิลเพศเมียมีค่า ACH50 น้อยที่สุด และเมื่อปลานิลเพศเมียที่ได้รับฮอร์โมน MT พบว่ามีค่า ACH50 เพิ่มสูงขึ้น (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 12 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อระดับโปรตีน คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ น้ำตาลกลูโคส ในเลือดของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	โปรตีน (mg/ml)	คอเลสเตอรอล (mg/dl)	ไตรกลีเซอไรด์ (mg/dl)	น้ำตาลกลูโคส (mg/dl)
เพศเมีย	0	46.1 ± 0.8	197.4 ± 8.2	211.7 ± 51.0 ^b	124.0 ± 8.4 ^b
เพศเมีย	10	46.7 ± 2.1	200.0 ± 9.1	199.3 ± 32.4 ^b	121.1 ± 16.8 ^b
เพศผู้	0	44.6 ± 1.3	184.8 ± 5.4	140.6 ± 21.6 ^{ab}	58.2 ± 5.8 ^a
เพศผู้	10	47.7 ± 1.4	179.0 ± 6.2	138.2 ± 15.2 ^{ab}	124.2 ± 7.3 ^b
แปลงเพศ	0	45.8 ± 1.5	177.1 ± 8.1	112.2 ± 11.2 ^a	109.3 ± 11.0 ^b
แปลงเพศ	10	45.3 ± 1.1	182.4 ± 8.7	111.4 ± 9.9 ^a	112.8 ± 10.8 ^b
ผลของปัจจัย					
เพศ		ns	ns	**	*
ฮอร์โมน		ns	ns	ns	*
เพศและฮอร์โมน		ns	ns	ns	**

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)

ตารางที่ 13 ผลของเพศและฮอร์โมน MT ต่อค่า Alternative complement activity, Lysozyme activity และ Total immunity ของปลานิล

เพศ	ระดับฮอร์โมน (mg/kg)	ACH50 (U/ml)	Lysozyme activity (µg/ml)	Total Ig (mg/ml)
เพศเมีย	0	384.9 ± 74.2 ^a	10.6 ± 0.6	40.7 ± 0.8
เพศเมีย	10	593.5 ± 44.2 ^b	10.1 ± 1.1	41.1 ± 2.1
เพศผู้	0	566.6 ± 56.7 ^b	11.4 ± 0.8	38.8 ± 1.4
เพศผู้	10	517.6 ± 59.1 ^{ab}	11.1 ± 0.7	42.1 ± 1.4
แปลงเพศ	0	563.2 ± 36.5 ^b	9.6 ± 0.6	40.1 ± 1.5
แปลงเพศ	10	559.4 ± 41.8 ^b	10.0 ± 0.8	39.3 ± 1.1
ผลของปัจจัย				
เพศ		ns	ns	ns
ฮอร์โมน		ns	ns	ns
เพศและฮอร์โมน		*	ns	ns

หมายเหตุ ns ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

วิจารณ์

1. ผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP*, *GHRH* และ *GH* ในปลานิล เพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

1.1 การโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ complementary DNA (cDNA) ของยีน *GHRH-PACAP* และ *GH* ในปลานิล

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA บางส่วนของยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้จากปลานิล กับยีน *GHRH-PACAP* ของปลาชนิดต่างๆ ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank คือ ปลาหมอเทศ (AY522580) ปลาม้าลาย (AF329730.1) ปลาคูกอย (FJ882999.1) และปลาคอดอเมริกัน (X79078.1) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA บางส่วนของยีน *GHRH-PACAP* ที่โคลนได้จากปลานิลมีความคล้ายคลึงกับปลาหมอเทศมากที่สุด เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลาคูกอย ปลาคอดอเมริกา และปลาม้าลาย โดยมีความคล้ายคลึงกัน เท่ากับ 67, 67 และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ส่วนของ cDNA ยีน *GHRH-PACAP* ในปลานิล ที่โคลนได้ พบว่ามีการแสดงออกของยีน 2 รูปแบบ คือ แบบที่ 1 (แบบยาว) ซึ่งประกอบด้วยยีน *GHRH* ที่สามารถแปลได้กรดอะมิโน 45 ตัว และยีน *PACAP* ที่สามารถแปลได้กรดอะมิโน 38 ตัว และแบบที่ 2 (แบบสั้น) ซึ่งประกอบด้วยยีน *GHRH* ที่สามารถแปลได้กรดอะมิโน 13 ตัว และยีน *PACAP* ที่สามารถแปลได้กรดอะมิโน 38 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ cDNA ของปลานิลที่พบในการศึกษาครั้งนี้กับที่มีรายงานในปลาหมอเทศ ซึ่งรายงานว่า การแสดงออกของยีน *GHRH-PACAP* ในปลาหมอเทศ มี 2 รูปแบบ เช่นเดียวกัน (Chi-wei *et al.*, 2007) การแสดงออกของยีน *GHRH-PACAP* 2 รูปแบบนี้ นอกจากพบในปลาหมอเทศแล้ว ยังพบในปลาชนิดอื่นๆ เช่น ปลาคูกอเมริกัน (Small and Nonneman, 2001) ปลา Lungfish (Lee *et al.*, 2009) ปลา sockeye salmon (Parker *et al.*, 1997) ปลา grass carp (Sze *et al.*, 2007) ปลาเรนโบว์เทราต์ (Krueckl and Sheerwood, 2001) และปลากะรังดอกแดง (Yong *et al.*, 2003) เป็นต้น และยังสามารถพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำชนิดอื่นๆ ด้วย เช่น ไก่ (McRory *et al.*, 1997) ไก่กวาง (Yoo *et al.*, 2000) และกบ (Alexandre *et al.*, 2000) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการศึกษาในส่วนของ Genomic DNA จึงไม่อาจสรุปได้ว่าการที่ยีน *GHRH-PACAP* มี 2 รูปแบบที่แตกต่างกัน เป็นยีน 2 ตำแหน่ง หรือความแตกต่างของยีน 2 อัลลีล หรือความแตกต่างในกระบวนการ Splicing ของยีนนี้ แต่มีรายงานว่า การแสดงออกของ mRNA 2 รูปแบบนี้ อาจเป็นการขาด

หายไปของ mRNA ในตำแหน่งของ Exon ที่ 4 ในส่วนของยีน *GHRH* (Alternative exon skipping) โดยปัจจัยที่ควบคุมการขาดหายไปของ mRNA ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ยกเว้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งกระบวนการ Alternative exon skipping ที่เกิดขึ้นอาจส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *GHRH* และ *PACAP* ในระดับที่แตกต่างกัน (Chi-wei *et al.*, 2007) และอาจมีผลทำให้บทบาทของฮอร์โมน *PACAP* และ *GHRH* ในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน *GH* ที่แตกต่างกัน ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองของ Parker *et al.* (1997) ซึ่งได้ทำการเปรียบเทียบผลของฮอร์โมน *PACAP* และ *GHRH* ต่อการหลั่ง *GH* ในปลา coho salmon พบว่าฮอร์โมน *PACAP* สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งฮอร์โมน *GH* ได้มากกว่าฮอร์โมน *GHRH* นอกจากนี้เมื่อมีการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนของ *PACAP* และ *GHRH* ในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบว่า *PACAP* มี conserved sequence สูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *GHRH* มีส่วนที่เป็น conserved sequence แค่ 35–45 เปอร์เซ็นต์ (Peng and Peter, 1997)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ยีน *GH* ของปลานิล ได้มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (M26916.1) แล้ว ว่ามีความยาวทั้งสิ้น 847 คู่เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน จำนวน 204 ตัว โดยเมื่อเปรียบเทียบส่วนของนิวคลีโอไทด์ที่โคลนได้จากการศึกษาครั้งนี้กับที่มีรายงานในฐานข้อมูลพบว่า cDNA ของยีน *GH* ที่โคลนได้ ความยาวทั้งสิ้น 718 คู่เบส โดยตำแหน่งที่โคลนได้เริ่มต้นที่ตำแหน่ง 159-847 เมื่อเปรียบเทียบกับ cDNA ของปลานิลในฐานข้อมูล (Rentier-Delrue *et al.*, 1989) เมื่อเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ของยีน *GH* ในปลานิลกับปลาชนิดอื่นๆ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับปลาหมอเทศ (AF033805.1) 99 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ ปลากระรังดอกแดง (AY1555226.1) และปลา gilthead sea bream (AY553201.1) โดยมีความคล้ายคลึงกัน 96 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ยีน *β -actin* ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้เป็น reference gene ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญเติบโตที่บริเวณสมอง Poletto *et al.* (2008) ได้รายงานลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ cDNA บางส่วนของยีน *β -actin* ของปลานิล ในฐานข้อมูล GenBank (EF206801.1) ว่ามีความยาวทั้งสิ้น 1,035 คู่เบส ประกอบด้วยกรดอะมิโน 344 ตัว และในการศึกษาครั้งนี้สามารถโคลนได้ 499 คู่เบส ซึ่งส่วนของ cDNA ยีน *β -actin* ที่โคลนได้เมื่อเปรียบเทียบกับ cDNA ในฐานข้อมูล พบว่าเริ่มต้นจากนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 551-1,035 โดยมีคล้ายคลึงกันของลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับปลาหมอเทศ (Y18689.1) และปลาปักเป้า (EU871643.1) พบว่าลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ มีคล้ายคลึงกัน เท่ากับ 99 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

1.2 การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีน *GHRH*, *PACAP* และ *GH* ด้วยเทคนิค Real time RT-PCR

การศึกษาการแสดงออกของยีน *GHRH*, *PACAP* และยีน *GH* แสดงให้เห็นว่าเพศของปลานิลและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสามตำแหน่งในสมองส่วนไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมอง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีแนวโน้มว่าเพศอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีน *GH* ในต่อมใต้สมอง ในปลานิลเพศผู้และปลาแปลงเพศมีระดับของ *GH* mRNA ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการเจริญเติบโตของทั้งสองเพศ แม้ว่าระดับของ *GH* mRNA ในปลานิลทั้งสามเพศจะไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่พบว่ามี ความแปรปรวนสูง โดยปลานิลเพศเมียมีระดับการแสดงออกของยีน *GH* สูงกว่าปลานิลเพศผู้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลานิลเพศเมียกับระดับของ *GH* mRNA กลับมีทิศทางตรงกันข้าม ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานในปลา yellow perch (*Perca flavescens*) ปลานิลชนิดนี้มีลักษณะการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับปลานิล คือ เพศเมียโตช้ากว่าเพศผู้ (Lynn *et al.*, 2009) และรายงานของ Ji *et al.* (2011) ในปลา half-smooth tongue sole (*Cynolossus semilaevis*) ซึ่งปลาเพศเมียมีระดับการแสดงออกของยีน *GH* สูงกว่าเพศผู้เช่นกัน ผลการศึกษารังนี้ชี้ให้เห็นว่า ความแตกต่างของขนาดในปลานิลทั้งสองเพศไม่ได้เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีน *GH* ที่แตกต่างกันในช่วงวัยเจริญพันธุ์

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *GH* ในปลานิลแปลงเพศกับเพศดั้งเดิมพบว่ามี การแสดงออกของยีน *GH* ไปในทิศทางเดียวกับเพศดั้งเดิมก่อนแปลงเพศ ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการแปลงเพศทำให้ปลานิลมีโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจส่งผลต่อระดับของฮอร์โมนเพศที่สร้างขึ้น แต่ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *GH* ดังนั้นอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มสูงขึ้นในปลานิลแปลงเพศจึงน่าจะเกิดจากฮอร์โมนที่สร้างจากอวัยวะสืบพันธุ์ไปมีผลต่ออวัยวะอื่นๆ ไม่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง *GH* จากต่อมใต้สมอง

ฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อระดับของ *GHRH* mRNA และ *PACAP* mRNA สอดคล้องกับ รายงานในหนู ซึ่งพบว่าฮอร์โมน testosterone ไม่มีผลต่อระดับของ *GHRH* mRNA เช่นเดียวกัน (Hasegawa *et al.*, 1992; Maiter *et al.*, 1991) ในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าฮอร์โมน MT จะไม่มีผลต่อระดับของ *GH* mRNA อย่างมีนัยสำคัญ แต่ฮอร์โมน MT มีแนวโน้มเพิ่มระดับของ *GH* mRNA ในปลานิลเพศเมีย และลดระดับของ *GH* mRNA ในปลานิลเพศผู้ สอดคล้องกับรายงานของ Melamed *et al.* (1995) ซึ่งไม่พบผลของฮอร์โมน MT ต่อระดับของ *GH* mRNA เช่นเดียวกัน แต่ตรงกันข้าม

กับรายงานของ Riley *et al.* (2002) ซึ่งพบว่าฮอร์โมน MT มีผลต่อระดับของ GH mRNA ในปลาหมอเทศ

1.3 ผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโตของปลานิล

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการแปลงเพศลูกปลานิล โดยให้กินปลาปนผสมฮอร์โมน MT ที่ระดับความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 28 วัน จากนั้นตรวจสอบผลการแปลงเพศ ด้วยวิธี squash technique ผลการแปลงเพศพบว่าสามารถแปลงเพศ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ นวลมณี และคณะ (2547) ซึ่งทำการแปลงเพศปลานิลที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าสามารถแปลงเพศได้ 98 เปอร์เซ็นต์

การทดลองจำแนกเพศปลานิลออกเป็น 4 กลุ่ม โดยดูจากดิ่งเพศภายนอก คือ เพศผู้ เพศเมีย ปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศเมีย) และปลาแปลงเพศ (พันธุกรรมเป็นเพศผู้) ซึ่งจะเห็นได้ว่าดิ่งเพศของปลานิลเพศเมียจะมีลักษณะโค้งมน ส่วนดิ่งเพศของปลานิลเพศผู้จะมีลักษณะเรียวยาวแหลม และเมื่อปลานิลถูกแปลงเพศ ดิ่งเพศจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเล็กน้อย คือ มีขนาดเล็กลง โดยวิธีการดังกล่าวเป็นการแยกเพศที่ใช้เฉพาะในฟาร์ม ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และใช้เวลาไม่นาน

ปลานิลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีอายุประมาณ 3 เดือน โดยนำหนักเริ่มต้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าเพศยังไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต ซึ่งจะทำให้ผลตอบสนองต่อปัจจัยในแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกัน

โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการเลี้ยงในกระชังในอ่างเก็บน้ำ เป็นระยะเวลา 105 วัน มีการให้อาหารจนอิ่ม วันละ 2 มื้อ อุณหภูมิอากาศ อยู่ระหว่าง 30-34 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิน้ำ อยู่ระหว่าง 28-30 องศาเซลเซียส มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อยู่ระหว่าง 6.5-8 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า pH ของน้ำ อยู่ระหว่าง 8-8.5 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคุณภาพน้ำอยู่ในระดับดี เนื่องจากเป็นแหล่งน้ำธรรมชาติขนาดใหญ่

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของปลานิลแปลงเพศในการศึกษาครั้งนี้กับรายงานการศึกษาของ เกตุณภัส และคณะ (2556) ซึ่งทำการเลี้ยงปลานิลเป็นระยะเวลา 122 วัน จาก

น้ำหนักเริ่มต้นประมาณ 30 กรัม พบว่าปลานิลแปลงเพศมีอัตราการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าในการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากอัตราการปล่อยปลาในกระชังที่หนาแน่นกว่าการทดลองครั้งนี้และเป็นการเลี้ยงในบ่อดินซึ่งเป็นน้ำนิ่ง จึงส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตต่ำ

เมื่อทำการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ในปลานิลเพศผู้ ปลานิลเพศเมีย และปลานิลแปลงเพศ โดยแยกเพศตามพันธุกรรม พบว่าปลานิลเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำที่สุด ส่วนปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศทั้งเพศผู้และเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลานิลเริ่มมีความแตกต่างของน้ำหนักตัวหลังเลี้ยงไป 70 วัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในช่วงนี้เพศผู้เริ่มมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล โดยความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากฮอร์โมนเพศที่สร้างขึ้น โดยมีรายงานในหนูว่าฮอร์โมน estrogen มีผลยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน GH (Borski *et al.*, 1996) ซึ่งฮอร์โมน estrogen ในปลาเพศเมียอาจส่งผลต่ออัตราการกินและประสิทธิภาพการใช้อาหาร ทำให้ปลานิลเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศ ผลการทดลองสอดคล้องกับการรายงานของ Toguyeni *et al.* (1997) ซึ่งศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตของปลานิลเช่นกัน โดยเลี้ยงปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ พบว่าปลานิลเพศผู้จะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่าปลานิลเพศเมีย และปลานิลเพศผู้ปกติมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าปลาแปลงเพศ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาเพศผู้และปลาแปลงเพศมีอัตราการเจริญเติบโตไม่ต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ Toguyeni *et al.* (2002) ยังเปรียบเทียบการเจริญเติบโตระหว่างปลานิลจีโนไทป์ XX และปลานิล จีโนไทป์ XX (ถูกแปลงเป็นเพศผู้ด้วยฮอร์โมน) พบว่าปลานิลเพศเมียที่ถูกแปลงเพศด้วยฮอร์โมนมีอัตราการเจริญเติบโตแตกต่างจากปลานิลเพศผู้ปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้

และจากการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลานิล พบว่าการได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลเฉพาะในปลานิลเพศเมียเท่านั้น ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าฮอร์โมน MT อาจกระตุ้นให้ปลาเพศเมียมีอัตราการกินและมีประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มสูงขึ้น โดยจะสังเกตได้จากค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่ลดลง และมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับรายงานในปลาหมอเทศ (Sparks *et al.*, 2003; Ron *et al.*, 2003) ปลาคออเมริกา (Gannam and Lovell, 1991) และปลา red sea bream (*Chrysophrys major*) (Woo *et al.*, 1993) ซึ่งพบว่าฮอร์โมน MT ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น และการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากฮอร์โมน MT มีผลต่อการแสดงออกของ

GH และ IGF-1 mRNA ที่ต่อมใต้สมอง ดังจะเห็นได้ว่าการศึกษาคั้งนี้ฮอร์โมน MT มีแนวโน้มส่งผลกระทบต่อการแสดงออกของ GH เช่นเดียวกัน

2. ผลของ MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีในเลือด ค่าทางภูมิคุ้มกัน และกายวิภาคของลำไส้ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

2.1 ผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโต

ผลการทดลองที่สอง พบว่าเริ่มสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างเพศได้ตั้งแต่หลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 35 วัน และเมื่อเลี้ยงครบเวลา 70 วัน พบว่าปลานิลเพศผู้และปลาแปลงเพศสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าปลานิลเพศเมีย สอดคล้องกับการทดลองที่หนึ่ง แต่ในการทดลองครั้งที่หนึ่งพบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงกว่าการทดลองครั้งที่สอง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงต่างกัน และทั้งสองการทดลองปลายังได้รับอาหารจากธรรมชาติ ในการทดลองครั้งนี้ ผู้วิจัยทำการเลี้ยงปลาในอ่างเก็บน้ำซึ่งมีขนาดเล็กกว่าในการทดลองที่หนึ่ง โดยขณะเลี้ยงอุณหภูมิอากาศ อยู่ระหว่าง 32-34 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิน้ำ อยู่ระหว่าง 28.5-30 องศาเซลเซียส มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ อยู่ระหว่าง 6.0-7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่า pH ของน้ำ อยู่ระหว่าง 8-8.5

2.2 ผลของฮอร์โมน MT ต่อลักษณะทางกายภาพของลำไส้

จะเห็นได้ว่าความยาวของ villi ในลำไส้ของปลานิลแต่ละเพศจะมีความแตกต่างกัน เฉพาะในลำไส้ส่วนต้นเท่านั้น ซึ่งปกติแล้วการดูดซึมสารอาหารจะเกิดขึ้นในลำไส้ส่วนต้นมากกว่าลำไส้ส่วนกลาง โดยพบว่าปลานิลเพศเมียจะมีความยาวของ villi น้อยที่สุด รองลงมา คือ ปลานิลแปลงเพศ และยาวที่สุด คือ ปลานิลเพศผู้ ผลการทดลองสอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความยาวของ villi ในลำไส้เล็กส่วนต้นมีผลต่ออัตราการดูดซึมอาหารในปลานิลแต่ละเพศ เพศที่มีความยาวของ villi มาก ก็จะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงเช่นเดียวกัน และการได้รับฮอร์โมนส่งผลเฉพาะในลำไส้ส่วนต้นเท่านั้น โดยทำให้ปลานิลเพศเมียมีความยาวของ villi เพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลกระทบต่ออาหารทำให้มีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้นด้วย ผลการศึกษาสอดคล้องกับรายงานของ Sukhotnik *et al.* (2005) ซึ่งกล่าวว่าฮอร์โมน testosterone มีผลต่อความยาวของ villi

ในลำไส้เล็กของหนูเช่นกัน แต่การศึกษาในหนูพบว่าฮอร์โมน testosterone มีผลต่อความยาวของ villi ในลำไส้เล็กส่วนกลางของหนูเพศผู้ ซึ่งในการศึกษาค้างนี้ฮอร์โมน MT มีผลเฉพาะในลำไส้เล็กส่วนต้นของปลานิลเพศเมียและปลานิลแปลงเพศเท่านั้น

2.3 ผลของฮอร์โมน MT ต่อค่าโลหิตวิทยา

จากผลการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลานิลจะเห็นได้ว่าค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดในปลาแต่ละเพศมีความสอดคล้องกับค่าฮีโมโกลบิน โดยปลานิลเพศผู้มีค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดและค่าฮีโมโกลบินมากกว่าปลานิลเพศเมียและปลานิลแปลงเพศ ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bastami *et al.* (2009) และ Svobodova *et al.* (2001) ในปลา common carp ซึ่งเพศผู้จะมีขนาดใหญ่กว่าเพศเมียเช่นเดียวกับปลานิล ทำให้ปลาเพศผู้ต้องมีการทำกิจกรรมเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตสูงกว่าปลาเพศเมียและปลาแปลงเพศ ดังนั้นปลาเพศผู้จึงต้องผลิตเม็ดเลือดแดงจำนวนมากเพื่อใช้ในการขนส่งออกซิเจน

การศึกษาของ Munkittrick *et al.* (1983) ในปลา goldfish พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นในเพศผู้มีค่ามากกว่าเพศเมีย ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ และจากรายงานการศึกษาของ Santos *et al.* (2012) ในปลา fat snook (*Centropomus parallelus*) พบว่าค่าโลหิตวิทยาในปลาเพศเมียและเพศผู้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นและค่าฮีโมโกลบินในแต่ละเพศจะมีความแตกต่างกัน และในแต่ละช่วงวัยของการเจริญเติบโตค่าโลหิตวิทยาจะมีความแตกต่างกันด้วย โดยช่วงที่ปลาอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (mature stage) จะมีจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดสูงที่สุด และจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดจะลดลงเมื่อพ้นวัยเจริญพันธุ์ เมื่อศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ในปลานิลพบว่าการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น แต่จากรายงานของ Peterson and Shehadeh (1971) พบว่าฮอร์โมน MT ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มสูงขึ้นในปลา stripped mullet (*Mugil cephalus*)

ในการศึกษาค้างนี้พบว่าการได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลทำให้ปลานิลเพศผู้มีค่าฮีโมโกลบิน (Hb) ลดลง และมีแนวโน้มค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (MCV) ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCH) และความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Piferrer *et al.* (1993) ในปลา chinook salmon ซึ่งกล่าวว่าฮอร์โมน MT มีผลทำให้ค่าฮีโมโกลบินในปลาเพศผู้ลดลง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาค่าโลหิตวิทยาในปลาโตเต็มที ซึ่งปลาเพศผู้มีการผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจนอยู่แล้ว ฮอร์โมน MT ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ การได้รับฮอร์โมนเพศผู้เป็นระยะเวลาสั้นอาจส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมนเพศ ซึ่งมีรายงานว่าฮอร์โมนแอนโดรเจนอาจเปลี่ยนแปลงเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ได้ ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนจึงเพิ่มสูงขึ้น มีผลทำให้ค่าฮีโมโกลบินลดลงและค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (MCV) ค่าเฉลี่ยปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ (MCH) และความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง (MCHC) ในปลานิลเพศผู้เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีรายงานการศึกษาของ Schafhauser-Smith and Benfey (2003) ในปลา brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้ค่าฮีโมโกลบินและค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ก็พบว่าในปลานิลเพศเมียมีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นน้อยกว่าปลานิลเพศผู้เช่นเดียวกัน

จากการศึกษาพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดในเลือดของปลานิลไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการได้รับฮอร์โมน MT ก็ไม่ส่งผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดเช่นเดียวกัน แต่จากรายงานของ Slater and Schreck (1997) ในปลา chinook salmon พบว่าการได้รับฮอร์โมน testosterone ส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง

2.4 ผลของฮอร์โมน MT ต่อค่าชีวเคมีในเลือดบางประการ

พบว่าเพศผู้ผลต่อค่าชีวเคมีในเลือดบางประการของปลานิล ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและไตรกลีเซอไรด์ โดยปลานิลเพศผู้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่ำที่สุด ส่วนปลานิลเพศเมียมีระดับของน้ำตาลกลูโคสและไตรกลีเซอไรด์สูงที่สุด และเมื่อปลานิลได้รับฮอร์โมน MT พบว่าส่งผลให้ในเลือดมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นทุกเพศ ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Sangiao-Alvarellos *et al.* (2006) ในปลา gilthead sea bream ซึ่งพบว่าฮอร์โมน testosterone ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณไตรกลีเซอไรด์

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเพศและฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนและปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดของปลานิล ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Woo *et al.* (1993) ในปลา red sea bream (*Chrysophrys major*) ซึ่งพบว่าฮอร์โมน testosterone ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในกระแสเลือดเช่นเดียวกัน แต่ฮอร์โมน testosterone มีผลต่อปริมาณกลูโคส ปริมาณไตรกลีเซอไรด์ และปริมาณไกลโคเจน ในกระแสเลือดโดยทำให้มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

สอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ fructose-1,6-diphosphatase, glucose-6-phosphatase และ glycogen synthetase ในตับที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ในลำไส้ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ T-glutamyltransferase เพิ่มขึ้นด้วย แต่จากการศึกษาของ Ng *et al.* (1984) ในปลา *Epinephelus akaara* เพศเมีย พบว่าฮอร์โมน testosterone มีผลทำให้ปริมาณโปรตีน ปริมาณคอเลสเตอรอล เพิ่มขึ้น แต่ไม่ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือด

Guijarro *et al.* (2003) ได้กล่าวว่าปลา tench เพศผู้จะมีอัตราเมตาโบลิซึมสูงกว่าปลา เพศเมีย โดยมีปริมาณของกลูโคส โปรตีน ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอล ในกระแสเลือดสูง และปริมาณค่าชีวเคมีในเลือดขึ้นอยู่กับฤดูกาลด้วย โดยพบว่าเฉพาะฤดูร้อนเท่านั้นที่ปลาเพศผู้จะมี ปริมาณคอเลสเตอรอลและปริมาณ ไตรกลีเซอไรด์ ในกระแสเลือดสูงกว่าปลาเพศเมีย แต่ในฤดูอื่นๆ จะมีปริมาณต่ำกว่าปลาเพศเมีย ส่วนปริมาณ โปรตีนทั้งหมดในกระแสเลือดปลาเพศผู้ช่วงฤดูร้อน จะมีปริมาณสูงกว่าในเพศเมีย ผลการทดลองสอดคล้องกับในปลานิลโดยปลานิลเพศเมียจะมี ปริมาณไตรกลีเซอไรด์สูงกว่าในเพศผู้ ซึ่งปริมาณ ไตรกลีเซอไรด์ที่สูงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการ สร้างไข่ และการสะสม vitellogenin ของปลาเพศเมีย

2.5 ผลของฮอร์โมน MT ต่อระบบภูมิคุ้มกันบางประการ

จากการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อค่า ACH50 ในปลานิล พบว่าฮอร์โมน MT ส่งผลต่อค่า ACH50 เฉพาะในปลานิลเพศเมียเท่านั้น ซึ่งผลการศึกษาค้นนี้สอดคล้องกับรายงาน การศึกษาของ Cuesta *et al.* (2007) ในปลา gilthead sea bream โดยฮอร์โมน testosterone มีผลต่อ ระบบคอมพลีเมนต์ หลังจากที่ได้รับฮอร์โมน testosterone ทำให้ค่า ACH50 เพิ่มขึ้น แต่ไม่มี ผลต่อระดับของ IgM ส่วนฮอร์โมน estrogen ยังส่งผลทำให้ค่า ACH50 และระดับของ IgM ลด น้อยลงด้วย สอดคล้องกับผลการศึกษาค้นนี้ โดยการที่ปลานิลเพศเมียมีค่า ACH50 ต่ำกว่าปลาเพศ ผู้และปลาแปลงเพศอาจเนื่องมาจากการทำงานของฮอร์โมน estrogen และเมื่อปลานิลเพศเมียได้รับ ฮอร์โมน MT จึงไปกระตุ้นให้ค่า ACH50 เพิ่มขึ้น ส่วนการทำงานของเอนไซม์ lysozyme และ ปริมาณ total immunoglobulin ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเพศและและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผล แต่จากรายงานการศึกษาของ Saha *et al.* (2002) ในปลา common carp พบว่าการได้รับฮอร์โมน testosterone ไม่มีผลต่อปริมาณของ IgM ในกระแสเลือดเช่นเดียวกัน แต่ถ้าได้รับฮอร์โมน testosterone ในปริมาณสูงมีแนวโน้มว่าจะมีผลลดการหลั่ง IgM จากม้ามและไตส่วนหน้า

จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่าปลานิลเพศเมียมีค่าโลหิตวิทยาและค่าภูมิคุ้มกันบางประการต่ำกว่าปลานิลเพศผู้ แต่เมื่อปลานิลได้รับการแปลงเพศ พบว่าปลานิลแปลงเพศมีสุขภาพไม่ต่างจากปลาเพศผู้ปกติ และการได้รับฮอร์โมน MT ยังส่งผลให้ปลานิลเพศเมียมีสุขภาพดีขึ้น ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมน MT ในการเพาะเลี้ยงปลานิล ไม่มีผลทำให้สุขภาพของปลานิลลดลงแต่อย่างใด ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงช่วยสร้างความมั่นใจให้เกษตรกรต่อการใช้ฮอร์โมน MT ในการแปลงเพศได้



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การโคลน cDNA บางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในปลานิล คือ *GHRH-PACAP* และ *GH* พบว่า สามารถโคลน cDNA ของยีน *GHRH-PACAP* ได้ 2 แบบ คือ มีความยาว 625 และ 520 คู่เบส โดยแบบที่สองมีการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ 105 คู่เบส ที่ตำแหน่งของ cDNA ยีน *GHRH* มีกรดอะมิโนขาดหายไป 32 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับในปลาหมอเทศพบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 99 เปอร์เซ็นต์ ส่วน cDNA ยีน *GH* สามารถได้ความยาว 722 คู่เบส ส่วนยีน *β -actin* สามารถได้ความยาว 499 คู่เบส ซึ่งการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ cDNA ทั้งยีน *GH* และ *β -actin* มีความคล้ายคลึงกับที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank 100 เปอร์เซ็นต์

การแสดงออกของ *PACAP* mRNA และ *GHRH* mRNA ไม่มีความแตกต่างในเพศผู้เพศเมีย ปลาแปลงเพศซึ่งแยกเพศดั้งเดิมออกจากกัน แต่ยีน *PACAP* มีการแสดงออกของ mRNA สูงกว่ายีน *GHRH* การได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *PACAP* mRNA และ *GHRH* mRNA สำหรับการแสดงออกของ *GH* mRNA ในเพศต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มที่เพศเมียจะมีการแสดงออกของ mRNA สูงกว่าในเพศผู้และการแสดงออกของยีนในปลานิลแปลงเพศพบว่ามีทิศทางการแสดงออกของยีนเช่นเดียวกับในเพศดั้งเดิม การได้รับฮอร์โมน MT ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *GH* mRNA เช่นเดียวกัน แต่มีแนวโน้มที่ปลานิลเพศเมียจะมีการแสดงออกของ *GH* mRNA ลดลง ส่วนปลานิลเพศผู้ มีการแสดงออกของ *GH* mRNA เพิ่มขึ้น และในปลานิลแปลงเพศการแสดงออกของ *GH* mRNA มีทิศทางเช่นเดียวกับในเพศดั้งเดิม

2. ปลานิลเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำกว่าในปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศ โดยปลานิลแปลงเพศไม่ว่าจะมีเพศดั้งเดิมเป็นเพศผู้หรือเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารไม่ต่างจากปลานิลเพศผู้ การได้รับฮอร์โมน MT มีผลให้ปลานิลเพศเมียมีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลกับปลานิลเพศผู้และปลานิลแปลงเพศไม่ว่าเพศดั้งเดิมเป็นแบบใดก็ตาม

3. เพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนและคอเลสเตอรอล แต่เพศมีผลต่อปริมาณไตรกลีเซอไรด์และกลูโคส โดยในปลานิลเพศเมียมีปริมาณไตรกลีเซอไรด์และกลูโคสสูงกว่าในเพศผู้ และในเพศผู้พบว่าการได้รับฮอร์โมนส่งผลให้ปริมาณกลูโคสในกระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้น

ความยาว villi ในลำไส้ส่วนต้นของปลานิลมีความยาวมากกว่าในลำไส้ส่วนกลาง โดยปลานิลเพศผู้และเพศเมียมีความยาวของ villi ในลำไส้ไม่แตกต่างกัน แต่การได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ความยาวของ villi ในลำไส้เพิ่มสูงขึ้นในเพศเมียและปลานิลแปลงเพศ ส่วนจำนวน goblet cell ในลำไส้และค่า hepatosomatic index ในปลานิลแต่ละเพศไม่มีความแตกต่างกัน

4. เพศมีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่า MCV และ MCHC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยปลานิลเพศผู้จะมีดังกล่าวสูงกว่าเพศเมียและปลาแปลงเพศ การได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ค่าฮีโมโกลบินในเพศผู้ลดลง และยังส่งผลต่อค่า MCH ในเพศเมียและเพศผู้ลดน้อยลงด้วย เพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อค่า hematocrit จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด และเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ และจากการวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันบางประการของปลานิล พบว่าเพศและการได้รับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อค่า lysozyme activity และปริมาณ total immunoglobulin และพบว่าการได้รับฮอร์โมน MT ส่งผลให้ค่า ACH50 เพิ่มสูงขึ้นเฉพาะในเพศเมียเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงปลานิลและการศึกษาวิจัยได้ในอนาคต การเพาะเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันเป็นการเพาะพันธุ์เพศผู้ล้วน โดยการแปลงเพศปลานิลเพศเมียให้กลายเป็นเพศผู้เพื่อเพิ่มผลผลิต การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนทำให้ทราบว่าปลานิลเพศเมียเมื่อได้รับการแปลงเพศแล้ว นอกจากมีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารเพิ่มสูงขึ้นแล้ว ระบบการดูดซึมอาหารและระบบภูมิคุ้มกันก็ไม่แตกต่างจากเพศผู้ปกติแต่อย่างใด และการศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อค่าโลหิตวิทยา และภูมิคุ้มกันชี้ให้เห็นว่าการใช้ฮอร์โมน MT ในการเพาะเลี้ยงปลานิลไม่มีผลกระทบต่อปลานิลแต่อย่างใด และยังสามารถกระตุ้นให้ปลานิลเพศเมียมีภูมิคุ้มกันบางประการเพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังนั้นองค์ความรู้ที่ได้จึงเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลานิลและอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอื่นๆ ได้ด้วย การศึกษาวิจัยในอนาคตควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณฮอร์โมน

GH และ testosterone ในกระแสเลือดว่ามีเมื่อแปลงเพศแล้วปลานิลเพศเมียมีปริมาณฮอร์โมนเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปอย่างไร เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในระดับ (transcriptional control) กับการสังเคราะห์โปรตีน (translational control) ต่อไป และอาจศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต เช่น GH receptor, IGF-1 และ IGF-1 receptor ในอวัยวะต่างๆ เป็นต้น การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตทำให้สามารถเข้าใจบทบาทของฮอร์โมนเพศว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตรวมถึงผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละเพศอย่างไร การศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ระดับเดียวกันทำให้ไม่สามารถเข้าใจบทบาทได้อย่างเต็มที่ ในการศึกษาในอนาคตจึงควรศึกษาผลของฮอร์โมนหลาย ๆ ระดับ และที่ระยะเวลาต่างๆ เนื่องจากระดับของฮอร์โมนที่ต่างกัน และระยะเวลาในการได้รับฮอร์โมนก็อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตต่างกันด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2557. ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (พ.ศ. 2553-2557). แหล่งที่มา: www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf, 15 กรกฎาคม 2557.
- เกตุณภัต ศรีไพโรจน์, รุ่งกานต์ กล้าหาญ, พงศ์นรินทร์ เมฆขุนทด และ ทองอยู่ อุดเลิศ. 2556. การเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ปลานิลที่เลี้ยงในจังหวัดพะเยา. วารสารเกษตร 29: 137-144.
- ธงชัย เข็มเป็ง, ธรพันธ์ วัฒนะมหาตม์, จุฑามาศ ชัยนนท์ และ สุนทร กัณหาสุระ. 2554. การผลิตลูกปลานิลแปลงเพศในถังไฟเบอร์กลาสระบบน้ำหมุนเวียนที่ความหนาแน่นแตกต่างกัน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 21/2554. สำนักวิจัยแลพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.
- นวลมณี พงศ์ธนา, สายฝน เสี่ยงหวาน และ จินตนา นิชรรม. 2547. ผลของการใช้ฮอร์โมนแอนโดรเจนในการแปลงเพศปลานิล. วารสารการประมง 57 (3): 251-259.
- ไพบุลย์ วรสาขันธ์ และ ณัฐพงษ์ เพชรฤทธิ์. 2547. การเพาะพันธุ์ปลานิลแปลงเพศโดยใช้ฮอร์โมนผสมอาหาร. วารสารการประมง 2: 160.
- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2556. มาตรฐานสินค้าเกษตร. มกษ. 7001-2556.
- สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. 2542. ปลาพระราชทาน. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.
- ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2552. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี 2552. เอกสารฉบับที่ 6/2553. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alexandre, D., H. Vaudry, S. Je'gou and Y. Anouar. 2000. Structure and distribution of the mRNAs encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in the frog, *Rana ridibunda*. **J. Comp. Neurol.** 421: 234–246.

Bastami, K.D., A.H. Moradlou, A.M. Zaragabadi, S.V. Salehi Mir and M.M. Shakiba. 2009. Measurement of some haematological characteristics of the wild carp. **Comp. Clin. Path.** 18 (3): 321-323.

Biga, P.R., B.C. Peterson, G.T. Schelling, R.W. Hardy, K.D. Cain, K. Overturf and T.L. Ott. 2005. Bovine growth hormone treatment increased IGF-1 in circulation and induced the production of a specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 246: 437-445.

_____, G.T. Schelling, R.W. Hardy, K.D. Cain, K. Overturf and T.L. Ott. 2004. The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 135: 324–333.

Borski, R.J., W. Tsai, R. Demott-Friberg and A.L. Barkan. 1996. Regulation of somatic growth and the somatotropic axis by gonadal steroids: primary effect on insulin-like growth factor I. **Endocrinology** 137 (8): 3253-3259.

Butler, A.A. and D.L. Roith. 2001. Control of growth by the somatropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. **Annu. Rev. Physiol.** 63: 141–164.

Canosa, L.F., J.P. Chang and R.E. Peter. 2007. Neuroendocrine control of growth hormone in fish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 151: 1–26.

- Chi-Wei, L., S.L. Chang and C.F. Weng. 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulates the expression of PACAP in cultured tilapia astrocytes. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**. 232 (2): 262-276.
- Clemens, H.P. and T. Inslee. 1968. The production of unisexual broods by *Tilapia mossambica* sex-reversed with methyl testosterone. **Trans. Am. Fish. Soc.** 97(1): 18-21.
- Coutant, R., F.B. de Casson, S. Rouleau, O. Douay, E. Mathieu, F. Gatelais, N. Bouhours-Nouet, C. Voinot, M. Audran and J.M. Limal. 2004. Divergent effect of endogenous and exogenous sex steroids on the insulin-like growth factor I response to growth hormone in short normal adolescents. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 89: 6185–6192.
- Cravedi, J.P., G. Delous, L. Debrauwer and D. Prome. 1993. Biotransformation and branchial excretion of 17-alpha methyltestosterone in trout. **Drug Metab. Dispos.** 21: 377-385.
- Cuesta, A., L. Vargas-Chacoff, A. Garcia-Lopez, F.J. Arjona, G. Martinez-Rodriguez, J. Meseguer, J.M. Mancera and M.A. Esteban. 2007. Effect of sex-steroid hormones, testosterone and estradiol, on humoral immune parameters of gilthead seabream. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 693-700.
- Erfurth, E.M., L.E. Hagmar, M. Saaf and K. Hall. 1996. Serum levels of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor-binding protein 1 correlate with serum free testosterone and sex hormone binding globulin levels in healthy young and middle-aged men. **Clin. Endocrinol.** 44: 659–664.
- Ferrando, A.A., K.D. Tipton, D. Doyle, S.M. Phillips, J. Cortiella and R.R. Wolfe. 1998. Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 275 (5): E864-E871.

- Fitzpatrick, M.S., W.M. Contreras-Sánchez, R.H. Milston, M. Lucero, G.W. Feist and C.B. Schreck. 1998. Steroid immersion for masculinization of tilapia, pp. 29–34. *In* Burke, D., J. Baker, B. Goetze, D. Clair, and H. Egna, eds. **Fifteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP**. Oregon State University. Corvallis, Oregon.
- Foster, A.R., D.F. Houlihan, C. Gray, F. Medale, B. Fauconneau, S. Kaushik and P.Y.L. Bail. 1991. The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. **Gen. Comp. Endocrinol.** 82: 111–120.
- Fradinger, E.A. and N.M. Sherwood. 2000. Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing hormone (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. **Mol. Cell Endocrinol.** 165 (1-2): 211-219.
- Gannam, A.I. and R.T., Lovell. 1991. Effect of feeding 17-alpha-methyltestosterone, 11-ketotestosterone, 17 β -estradiol and 3,5,3'-triiodothyronine to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture** 92, 377-388.
- Gibney, J., T. Wolthers, G. Johannsson, A.M. Umpleby and K.K. Ho. 2005. Growth hormone and testosterone interact positively to enhance protein and energy metabolism in hypopituitary men. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.** 289 : 266-271.
- Guerrero, R.D.. 1975. Use of androgens for the production of all-Male *Tilapia aurea* (Steindachner). **Trans. Am. Fish. Soc.** 104(2): 342-348.
- Guijarro, A.I., M.A. Lopez-Patino, M.L. Pinillos, E. Isorna, N. De pedro, A.L. Alonso-Gomez, M. Alonso-Bedate and M.J. Delgado. 2003. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. **J. Fish Biol.** 62: 803–815.

- Guillemin, R., P. Brazeau, P. Bohlen, F. Esch, N. Ling, and W.B. Wehrenberg. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. **Science** 218 (4572): 585-587.
- Hasegawa, O., H. Sugihara, S. Minami and I. Wakabayashi. 1992. Masculinization of growth hormone (GH) secretory pattern by dihydrotestosterone is associated with augmentation of hypothalamic somatostatin and GH-releasing hormone mRNA levels in ovariectomized adult rats. **Peptides** 13: 475-481.
- Holloway, A.C. and J.F. Leatherland. 1997. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 105: 246-254.
- Huggard, D., Z. Khakoo, G. Kassam and H.R. Habibi. 1996. Effect of testosterone on growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 74: 1039-1046.
- Ji, X.S., H.W. Liu, S.L. Chen, Y.L. Jiang and Y.S. Tian. 2011. Growth differences and dimorphic expression of growth hormone (GH) in female and male *Cynoglossus semilaevis* after male sexual maturation. **Mar. Genomics** 4: 9-16.
- Kimura, C., S. Ohkubo, K. Ogi, M. Hosoya, Y. Itoh, H. Onda, A. Miyata, L. Jiang, R.R. Dahl, H.H. Stibbs, A. Arimura and M. Fujino. 1990. A novel peptide which stimulates adenylate cyclase: molecular cloning and characterization of the ovine and human cDNAs. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 166: 81-89.
- Krueckl, S.L., N.M. Sheerwood. 2001. Developmental expression, alternative splicing and gene copy number for the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GRF) gene in rainbow trout. **Mol. Endocrinol.** 9: 267-277.

- Kumari, J. and P.K. Sahoo. 2006. Dietary beta-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). **J. Fish Dis.** 29(2):95-101.
- Larsen, D.A., M. Shimizu, K.A. Cooper, P. Swanson and W.W. Dickhoff. 2004. Androgen effects on plasma GH, IGF-I, and 41-kDa IGFBP in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 139: 29–37.
- Law, W.Y., W.H. Chen, Y.L. Song, S. Dufour and C.F. Chang. 2001. Differential *in vitro* suppressive effects of steroids on leukocyte phagocytosis in two teleosts, tilapia and common carp. **Gen. Comp. Endocrinol.** 121:163-172.
- Lee, L.T.O., J.K.V. Tam, D.W. Chan and B.K.C. Chow. 2009. Molecular cloning and mRNA distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)/ PACAP-related peptide in the lungfish. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 1163: 204-214.
- Leedom, T.A., K. Uchida, T. Yada, N.H. Richman III, J.C. Byatt, R.J. Coliver, T. Hirano and E.G. Grau. 2002. Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia : growth response, metabolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production. **Aquaculture** 207: 359-380.
- Leung, M.Y., B.K.C. Chow, K.L. Yu and A.O.L. Wong. 1999. Molecular characterization, tissue distribution, and functional studies of PACAP in the goldfish. **Comp. Biochem. Physiol, Part A Mol. Integr. Physiol.** 124: S98.
- Leung, T.C., T.B. Ng and N.Y.S. Woo. 1991. Metabolic effects of bovine growth hormone in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Physiol A.** 99: 633–636.
- Li, W.S., D. Chen, A.O.L. Wong and H.R. Lin. 2005. Molecular cloning, tissue distribution, and ontogeny of mRNA expression of growth hormone in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 144: 78–89.

- Lynn, S.G., K.A. Powell, D.F. Westneat and B.S. Shepherd. 2009. Seasonal and sex-specific mRNA levels of key endocrine genes in adult yellow perch (*Perca flavescens*) from Lake Erie. **Mar. Biotechnol.** 11: 210-222.
- Maiter, D., J.I. Koenig and L.M. Kaplan. 1991. Sexually dimorphic expression of the growth hormone releasing hormone gene is not mediated by circulating gonadal hormones in the adult rat. **Endocrinology** 128: 1709-1716.
- Matsuda, K., T. Yoshida, Y. Nagano, K. Kashimoto, T. Yatohgo, H. Shimomura, S. Shioda, A. Arimura and M. Uchiyama. 1998. Purification and primary structure of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) from the brain of an elasmobranch, stingray, *Dasyatis akajei*. **Peptides** 19 (9): 1489-1495.
- Mauras, N., A. Rini, S. Welch, B. Sager and S.P. Murhy. 2003. Synergistic effects of testosterone and growth hormone on protein metabolism and body composition in prepubertal boys. **Metabolism** 52 (8): 964-969.
- McRory, J.E., B.P. David, S. Ngamvongchon and N.M. Sherwood. 1995. Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. **Mol. Cell Endocrinol.** 108 (1-2): 169-177.
- _____, R.L. Parker and N.M. Sherwood. 1997. Expression and alternative processing of a chicken gene encoding both growth hormone-releasing hormone and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. **DNA Cell Biol.** 16 (1): 95-102.
- Melamed, P., N. Eliahu, M. Ofir, B. Levavi-Sivan, J. Smal, F. Rentier-Delrue and Z. Yaron. 1995. The effects of gonadal development and sex steroids on growth hormone secretion in the male tilapia hybrid (*Oreochromis niloticus* X *O. aureus*). **Fish Physiol. Biochem.** 14: 267-277.

- Møller, N., and J.O.L. Jørgensen. 2009. Effects of Growth Hormone on Glucose, Lipid, and Protein Metabolism in Human Subjects. **Endocr. Rev.** 30 (2): 152-177.
- Montero, M., L. Yon, S. Kikuyama, S. Dufour and H. Vaudry. 2000. Molecular evolution of the growth hormone-releasing hormone/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide gene family: functional implication in the regulation of growth hormone secretion. **J. Mol. Endocrinol.** 25 (2): 157-168.
- Moschet, C.. 2009. **Microbial degradation of steroid hormones in the environment and technical systems.** Available Source: http://www.thermopileproject.com/.../HS08_CHRISTOPH_MOSCHET_rev_termpaper.pdf, July 15, 2014.
- Munkittrick, K.R. and J.F. Leatherland. 1983. Haematocrit values in feral goldfish, *Camssius auratus* L., as indicators of the health of the population. **J. Fish. Biol.** 23 (2): 153–161.
- Ng, T.B., N.Y. Woo, P.P. Tam and C.Y. Au. 1984. Changes in metabolism and hepatic ultrastructure induced by estradiol and testosterone in immature female *Epinephelus akaara* (Teleostei, Serranidae). **Cell Tissue Res.** 236 (3): 651-9.
- Ogi, K., C. Kimura, H. Onda, A. Arimura and M. Fujino. 1990. Molecular cloning and characterization of cDNA for the precursor of rat pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 173 (3): 1271-1279.
- Parker, D.B., I.R. Coe, G.H. Dixon and N.M. Sherwood. 1993. Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily. **Eur. J. Biochem.** 215 (2): 439-448.
- _____, M.E. Power, P. Swanson, J. Rivier and N.M. Sherwood. 1997. Exon skipping in the gene encoding pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in salmon alters the expression of two hormones that stimulate growth hormone release. **Endocrinology** 138 (1): 414-423.

- Peng, C. and R.E. Peter. 1997. Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. **Zoological Studies** 36 (2): 79-89.
- Perez-Sanchez, J. and P.L. Bail. 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. **Aquaculture** 177: 117-128.
- Peter, R.E. and J.P. Chang. 1999. Brain regulation of growth hormone secretion and food intake in fish, pp. 55-67. *In* Prasada Rao, P.D. and R.E. Peter, eds. **Neural regulation in the vertebrate endocrine system**. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Peterson, G.L. and Z.H. Shehadeh. 1971. Changes in blood components of mullet, *Mugil cephalus*., following treatment with salmon gonadotropin and methyltestosterone. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 38 (2): 451-454.
- Pfeilschifter, J., C. Scheidt-Nave, G. Leidig-Bruckner, H.W. Woitge, W.F. Blum, C. Wuster, D. Haack and R. Ziegler. 1996. Relationship between circulating insulin-like growth factor components and sex hormones in a population-based sample of 50- to 80-year-old men and women. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 81: 2534-2540.
- Piferrer, F., I.J. 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.
- Poletto, A.B., P.A. Wasko, C. Oliveira, A. Azevedo, R.F. Carvalho, M.D.P. Silva, F. Foresti and C. Martins. 2008. Identities among actin-encoding cDNAs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and other eukaryote species revealed by nucleotide and amino acid sequence analyses. **Genet. Mol. Biol.** 31 (1): 67-75.
- Rasquin, P. 1951. Effects of carp pituitary and mammalian ACTH on the endocrine and lymphoid systems of the teleost *Astyanax mexicanus*. **J. Exp. Zool.** 117: 317-357.

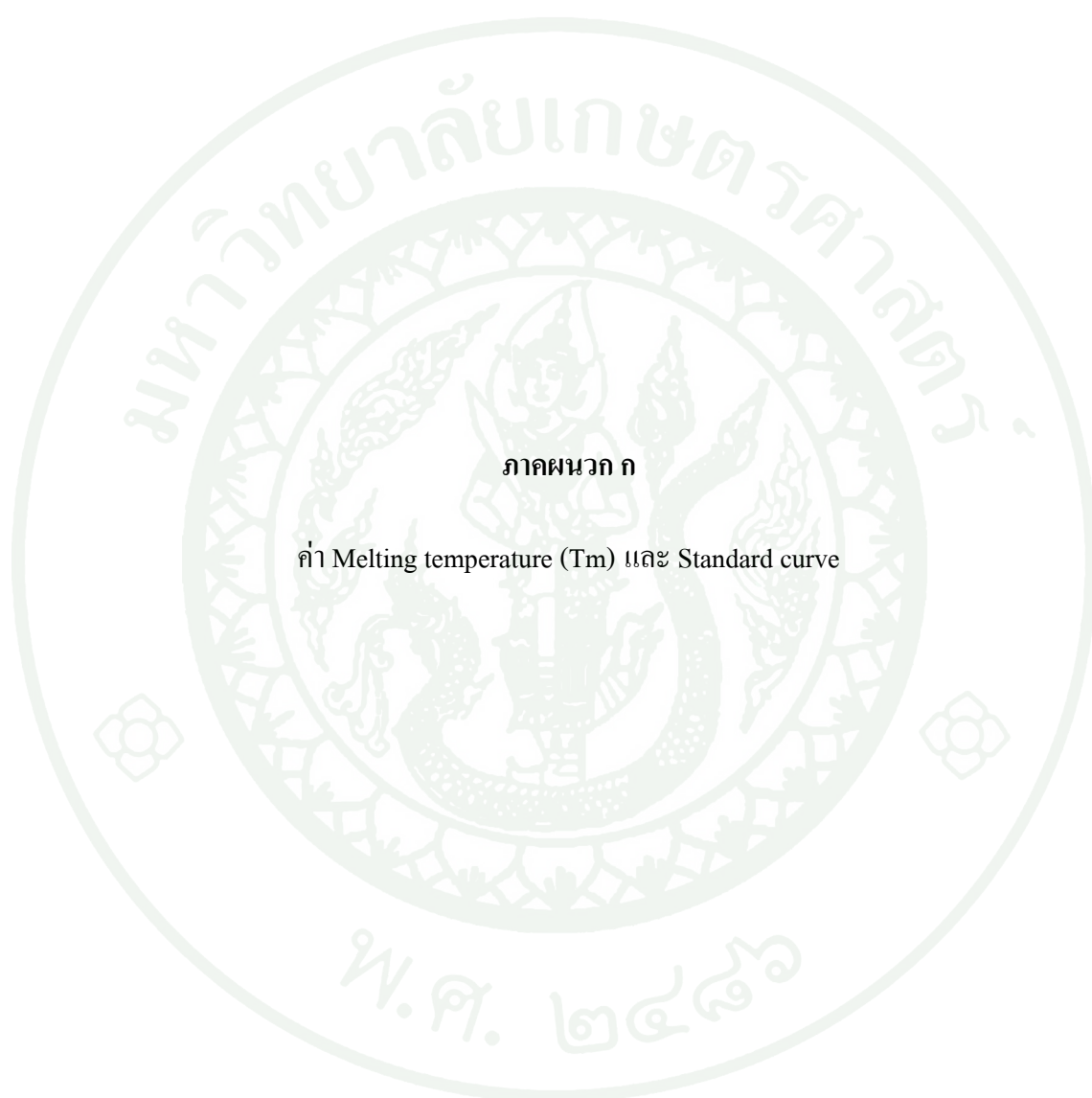
- Rentier-Delrue, F., D. Swennen, J.C. Philippart, C.L. Hoir, M. Lion, O. Benrubi and J.A. Martial. 1989. Tilapia growth hormone: molecular cloning of cDNA and expression in *Escherichia coli*. **DNA** 8 (4): 271-278.
- Riley, L.G., N.H. Richman III, T. Hirano and E.G. Grau. 2002. Activation of the growth hormone/insulin-like growth factor axis by treatment with 17 α -methyltestosterone and seawater rearing in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 127 (3): 285-292.
- Ron, B., S.K. Shimoda, G.K. Iwama and E.G. Grau. 2003. Relationships among ration, salinity, 17 α -methyltestosterone and growth in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 136 (4): 657-65.
- Rooman, R.P., L.D. Beek, M. Martin, J. van Doorn, S. Mohan and M.V. Du Caju. 2005. Ethinylestradiol and testosterone have divergent effects on circulating IGF system components in adolescents with constitutional tall stature. **Eur. J. Endocrinol.** 152: 597-604.
- Saha, N.R., T. Usami, and Y. Suzuki. 2002. Seasonal changes in the immune activities of common carp (*Cyprinus carpio*). **Fish Physiol. Biochem.** 26 (4): 379-387.
- Sakai, M., M. Kobayashi and H. Kawauci. 1996. *In vitro* activation of fish phagocytic cells by GH, prolactin and somatostatin. **J. Endocrinol.** 151: 113-118.
- Sangiao-Alvarellos, S., S. Polakof, F.J. Arjona, A. García-López, M.P. Martín del Río, G. Martínez-Rodríguez, J.M. Míguez, J.M. Mancera and J.L. Soengas. 2006. Influence of testosterone administration on osmoregulation and energy metabolism of gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 149 (1): 30-41.

- Santos, A.A., M.J. Ranzani-Paiva, M.L. Veiga, L. Faustino and M.I. Egami. 2012. Hematological parameters and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*) bred in captivity. **Fish Shellfish Immunol.** 33 (4): 953-61.
- Schafhauser-Smith, D. and T.J. Benfey. 2003. The effects of long-term estradiol-17 treatment on the growth and physiology of female triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 131: 9–20.
- Sciara, A.A., J.A. Rubiolo, G.M. Somoza and S.E. Arranz. 2006. Molecular cloning, expression and immunological characterization of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) growth hormone. **Comp. Biochem. Physiol.** 142C: 284–292.
- Shelton, W.L., R.D. Guerrero and J. Lopez-Marcias. 1981. Factors effecting androgen sex-reversal of *Tilapia aurea*. **Aquaculture** 25: 59-65.
- Sheridan, M.A. 1986. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. **Gen. Comp. Endocrinol.** 64: 220–238.
- Sherwood, N.M. and S. Wu. 2005. Developmental role of GnRH and PACAP in a zebrafish model. **Gen. Comp. Endocrinol.** 142 (1-2): 74-80.
- Slater, C.H. and C.B. Schreck. 1997. Physiological levels of testosterone kill salmonid leukocytes in vitro. **Gen. Comp. Endocrinol.** 106 (1): 113-9.
- Small, B.C. and D. Nonneman. 2001. Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 122: 354–363.

- Sparks, R.T., B.S. Shepherd, B. Ron, N. Harold Richman 3rd, L.G. Riley, G.K. Iwama, T. Hirano and E.G. Grau. 2003. Effects of environmental salinity and 17 α -methyltestosterone on growth and oxygen consumption in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.** 136 (4): 657-65.
- Sukhotnik, I., E. Shiloni, J. Mogilner, M. Lurie, M. Hirsh, A.G. Coran and M.M. Krausz. 2005. Effect of sex and sex hormones on structural intestinal adaptation after massive small bowel resection in rats. **J. Pediatr. Surg.** 40: 489-495.
- Svobodova, Z., M. Flajšhans, J. Kolarčova, H. Modra, M. Svoboda and V. Vajcova. 2001. Leukocyte profiles of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L. leukocyte profiles of diploid and triploid tench, *Tinca tinca* L.. **Aquaculture** (159-168).
- Sze, K.H., H. Zhou, Y. Yang, M. H, Y. Jiang and A.O. Wong. 2007. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) as a growth hormone (GH)-releasing factor in grass carp: II. Solution structure of a brain-specific PACAP by nuclear magnetic resonance spectroscopy and functional studies on GH release and gene expression. **Endocrinology** 148(10): 5042-59.
- Toguyeni, A., B. Fauconneau, A. Fostier, J. Abucay, G. Mair and J. Baroiller. 2002. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture** 207 (3-4): 249-261.
- _____, B. Fauconneau, T. Boujard, A. Fostier, E. R. Kuhn, K. A. Mol and J. F. Baroiller. 1997. Feeding behaviour and food utilisation in Tilapia, *Oreochromis niloticus*: Effects of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiol. Behav.** 62 (2): 273-279.
- Trudeau, V.L., G.M. Somoza, C.S. Nahorniak and R.E. Peter. 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. **Neuroendocrinology** 56: 483-490.

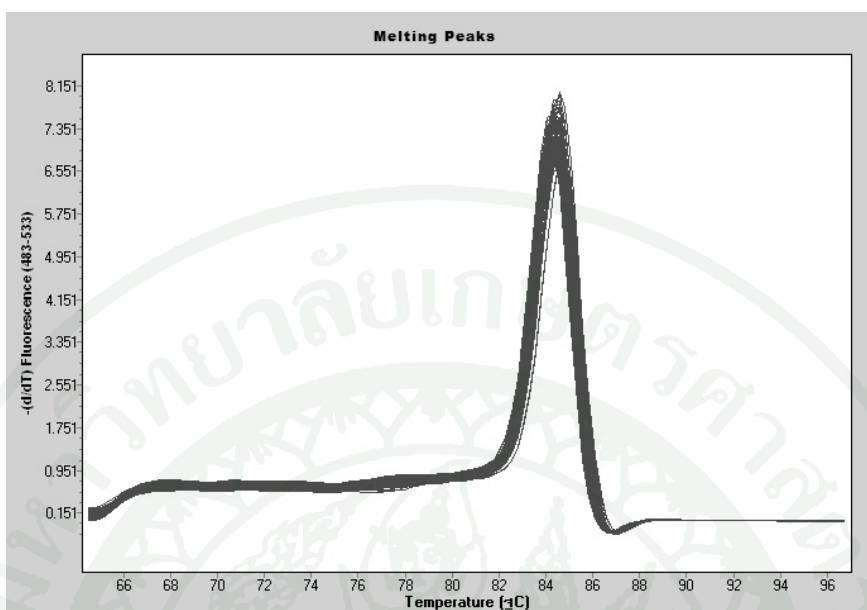
- Venkatesh, B. and S. Brenner. 1997. Genomic structure and sequence of the pufferfish (*Fugu rubripes*) growth hormone-encoding gene: a comparative analysis of teleost growth hormone genes. **Gene** 187 (2): 211-215.
- Woo, N.Y. S., A.S.B. Chung and T.B. Ng. 1993. Influence of oral administration of estradiol-17 β and testosterone on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chrysophrys major*. **Fish Physiol. Biochem.** 10 (5): 377-387.
- Yada, T., T. Azuma and Y. Takagi. 2001. Stimulation of non-specific immune functions in seawater-acclimated rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, with reference to the role of growth hormone. **Comp. Biochem. Physiol.** 129: 695-701.
- Yamaguchi, K., D.S. King, J.L. Specker, R.S. Nishioka, T. Hirano and H.A. Bern. 1991. Amino acid sequence of growth hormone isolated from medium of incubated pituitary glands of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 81(2): 323-31.
- Yong, J., L. Wen-Sheng, X. Jun and L. Hao-Ran. 2003. Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone releasing hormone in grouper (*Epinephelus coioides*). **Acta Biochim. Biophys. Sin.** 35 (9): 864-872.
- Yoo, S.J., S. You, H. Kim, S.C. Kim, Y.J. Choi and El.M. Halawani. 2000. Molecular cloning and characterization of alternatively spliced transcripts of the turkey pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide. **Gen. Comp. Endocrinol.** 120: 326-335.
- Zou, J.J., V.L. Trudeau, Z. Cui, J. Brechin, K. Mackenzie, Z. Zhu, D.F. Houlihan and R.E. Peter. 1997. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. **Gen. Comp. Endocrinol.** 106: 102-112.



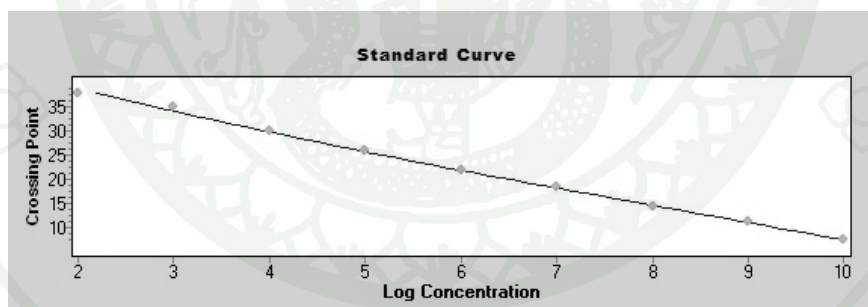


ภาคผนวก ก

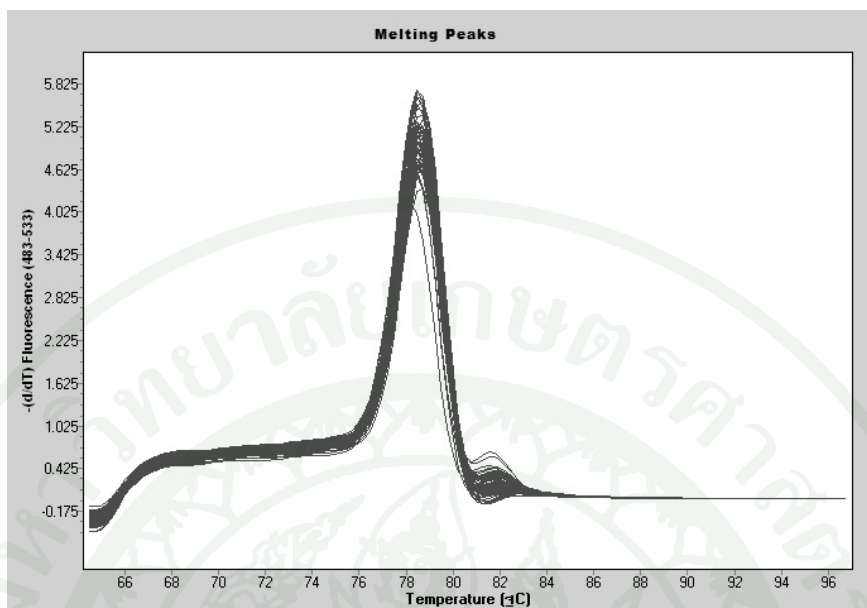
ค่า Melting temperature (T_m) และ Standard curve



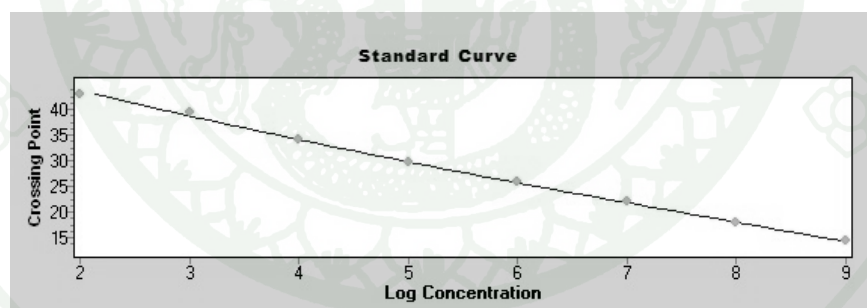
ภาพผนวกที่ ก1 ค่า T_m ของยีน PACAP



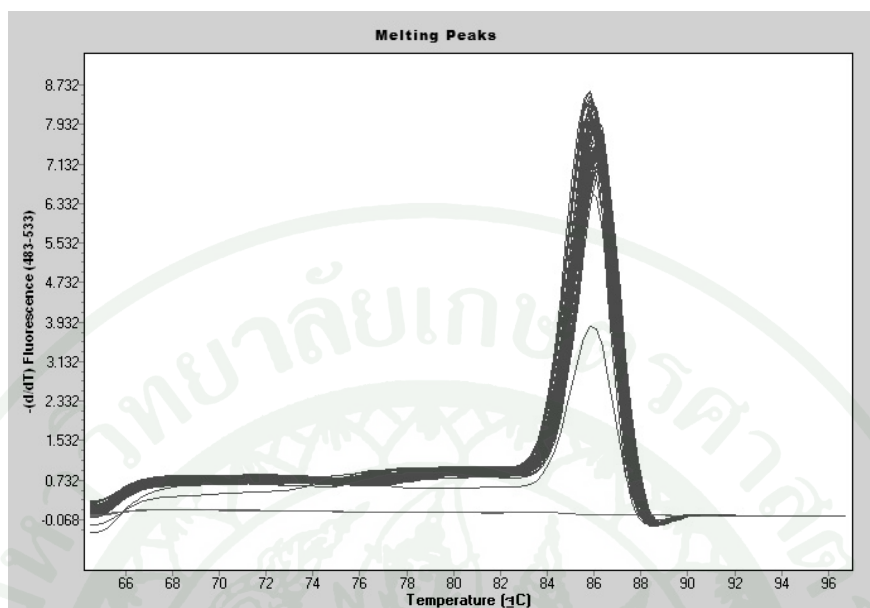
ภาพผนวกที่ ก2 Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน PACAP (Efficiency = 1.909)



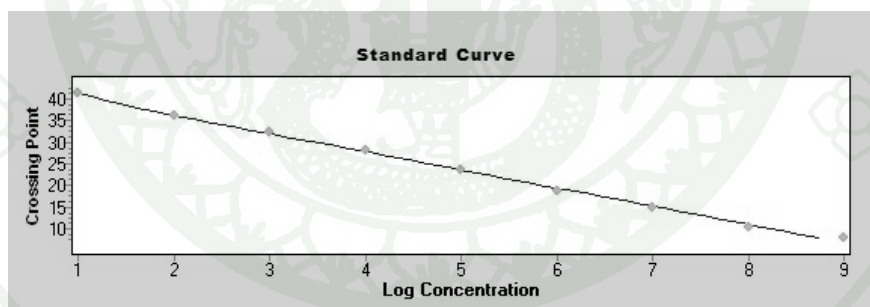
ภาพผนวกที่ 3 ค่า T_m ของยีน GHRH



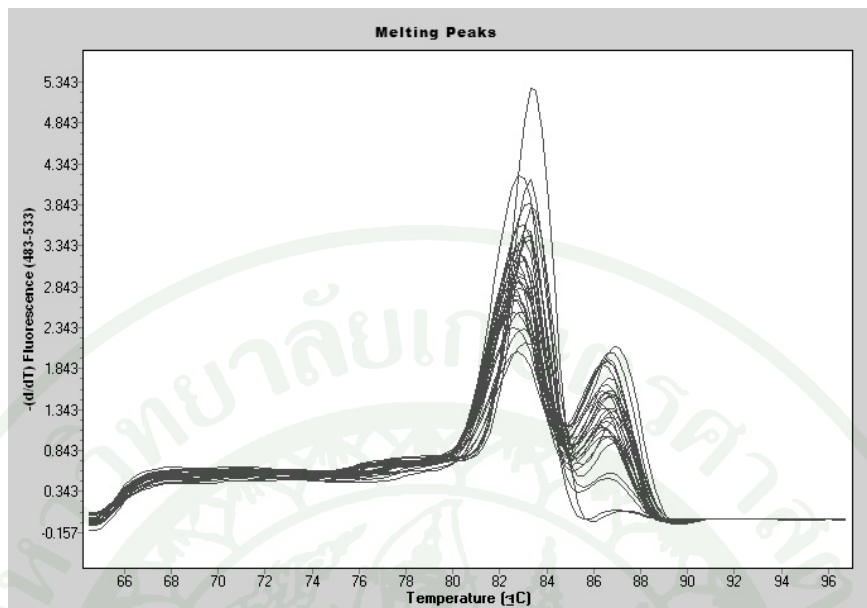
ภาพผนวกที่ 4 Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน GHRH (Efficiency = 1.845)



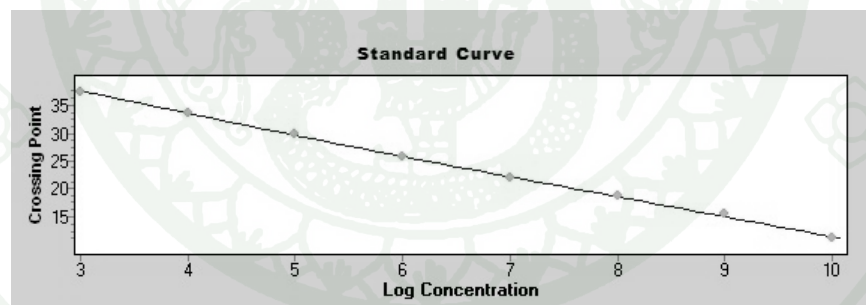
ภาพผนวกที่ 5 ค่า T_m ของยีน GH



ภาพผนวกที่ 6 Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน GH (Efficiency = 1.729)



ภาพผนวกที่ ๗ ค่า T_m ของยีน β -actin



ภาพผนวกที่ ๘ Standard curve ของดีเอ็นเอมาตรฐานยีน β -actin (Efficiency = 1.902)



1. การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และการแสดงออกของยีน *PACAP*, *GHRH* และ *GH* ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ โดยแยกเพศตามพันธุกรรม

ตารางผนวกที่ ข1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *PACAP* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	7	.000	.405	.895
Within Groups	.015	56	.000		
Total	.016	63			

ตารางผนวกที่ ข2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *GHRH* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	7	.000	.488	.839
Within Groups	.033	56	.001		
Total	.035	63			

ตารางผนวกที่ ข3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *GH* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.295	7	.042	.627	.732
Within Groups	5.906	88	.067		
Total	6.201	95			

ตารางผนวกที่ ข4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *PACAP* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	5	.000	.611	.692
Within Groups	.015	55	.000		
Total	.016	60			

ตารางผนวกที่ ข5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *GHRH* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	5	.000	.287	.919
Within Groups	.032	55	.001		
Total	.033	60			

ตารางผนวกที่ ข6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการแสดงออกของยีน *GH* ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.211	5	.042	.633	.675
Within Groups	5.990	90	.067		
Total	6.201	95			

ตารางผนวกที่ ข7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.332	7	3.619	1.304	.357
Within Groups	22.206	8	2.776		
Total	47.538	15			

ตารางผนวกที่ ข8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังเลี้ยง 35 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับ ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	670.393	7	95.770	.869	.567
Within Groups	881.832	8	110.229		
Total	1552.226	15			

ตารางผนวกที่ ข9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3777.107 ^a	7	539.587	2.079	.163
Intercept	1291149.283	1	1291149.283	4973.579	.000
Sex	3526.108	3	1175.369	4.528	.039
Hormone	5.625E-5	1	5.625E-5	.000	1.000
Sex * Hormone	250.999	3	83.666	.322	.809
Error	2076.813	8	259.602		
Total	1297003.203	16			
Corrected Total	5853.920	15			

ตารางผนวกที่ ข10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวหลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21120.400 ^a	7	3017.200	4.543	.025
Intercept	2441367.188	1	2441367.188	3676.137	.000
Sex	19913.393	3	6637.798	9.995	.004
Hormone	40.291	1	40.291	.061	.812
Sex * Hormone	1166.716	3	388.905	.586	.641
Error	5312.897	8	664.112		
Total	2467800.484	16			
Corrected Total	26433.297	15			

ตารางผนวกที่ ข11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	45248.498 ^a	7	6464.071	2.565	.105
Intercept	6110215.453	1	6110215.453	2424.720	.000
Sex	37335.378	3	12445.126	4.939	.032
Hormone	395.413	1	395.413	.157	.702
Sex * Hormone	7517.707	3	2505.902	.994	.443
Error	20159.737	8	2519.967		
Total	6175623.688	16			
Corrected Total	65408.235	15			

ตารางผนวกที่ ข12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3.917 ^a	7	.560	5.737	.013
Intercept	159.833	1	159.833	1638.786	.000
Sex	3.682	3	1.227	12.583	.002
Hormone	.005	1	.005	.047	.834
Sex * Hormone	.230	3	.077	.787	.534
Error	.780	8	.098		
Total	164.530	16			
Corrected Total	4.697	15			

ตารางผนวกที่ ข13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.087 ^a	7	.012	2.614	.101
Intercept	56.164	1	56.164	11834.699	.000
Sex	.072	3	.024	5.070	.030
Hormone	.000	1	.000	.056	.819
Sex * Hormone	.014	3	.005	1.011	.437
Error	.038	8	.005		
Total	56.289	16			
Corrected Total	.125	15			

ตารางผนวกที่ ข14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.694 ^a	7	.099	5.479	.014
Intercept	17.264	1	17.264	953.814	.000
Sex	.471	3	.157	8.668	.007
Hormone	.046	1	.046	2.554	.149
Sex * Hormone	.177	3	.059	3.265	.080
Error	.145	8	.018		
Total	18.103	16			
Corrected Total	.839	15			

ตารางผนวกที่ ข15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดตายของปลานิล หลังจากเลี้ยง 105 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศตามพันธุกรรม 4 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.197	7	.038	.489	.564
Within Groups	1.849	8	.048		
Total	2.137	15			

2. การศึกษาผลของฮอร์โมน MT ต่ออัตราการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมี ระบบการย่อยอาหาร และภูมิคุ้มกัน ในปลานิลเพศผู้ เพศเมีย และปลาแปลงเพศ

ตารางผนวกที่ ข16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวเริ่มต้นการทดลอง ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	291.993	5	58.399	2.405	.158
Within Groups	145.696	6	24.283		
Total	437.689	11			

ตารางผนวกที่ ข17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัว หลังจากเลี้ยง 35 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1633.936 ^a	5	326.787	7.416	.015
Intercept	497113.884	1	497113.884	11280.944	.000
Sex	1431.443	2	715.721	16.242	.004
Hormone	32.374	1	32.374	.735	.424
Sex * Hormone	170.120	2	85.060	1.930	.225
Error	264.400	6	44.067		
Total	499012.220	12			
Corrected Total	1898.336	11			

ตารางผนวกที่ ข18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัว หลังจากเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	14534.125 ^a	5	2906.825	8.504	.011
Intercept	1352830.762	1	1352830.762	3957.578	.000
Sex	13816.009	2	6908.005	20.209	.002
Hormone	236.031	1	236.031	.690	.438
Sex * Hormone	482.085	2	241.043	.705	.531
Error	2050.998	6	341.833		
Total	1369415.885	12			
Corrected Total	16585.123	11			

ตารางผนวกที่ ข19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น หลังจากเลี้ยง 70 วัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	17332.947 ^a	5	3466.589	8.975	.009
Intercept	1285667.135	1	1285667.135	3328.696	.000
Sex	11453.989	2	5726.995	14.828	.005
Hormone	1871.252	1	1871.252	4.845	.070
Sex * Hormone	4007.706	2	2003.853	5.188	.049
Error	2317.425	6	386.237		
Total	1305317.507	12			
Corrected Total	19650.372	11			

ตารางผนวกที่ ข20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อวัน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2.455 ^a	5	.491	14.265	.003
Intercept	162.877	1	162.877	4731.358	.000
Sex	2.165	2	1.082	31.441	.001
Hormone	.106	1	.106	3.091	.129
Sex * Hormone	.184	2	.092	2.676	.148
Error	.207	6	.034		
Total	165.539	12			
Corrected Total	2.662	11			

ตารางผนวกที่ ข21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.218 ^a	5	.044	11.318	.005
Intercept	51.006	1	51.006	13248.216	.000
Sex	.157	2	.079	20.398	.002
Hormone	.019	1	.019	4.987	.067
Sex * Hormone	.042	2	.021	5.403	.046
Error	.023	6	.004		
Total	51.247	12			
Corrected Total	.241	11			

ตารางผนวกที่ ข22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.231 ^a	5	.046	5.255	.034
Intercept	17.136	1	17.136	1951.002	.000
Sex	.178	2	.089	10.121	.012
Hormone	.016	1	.016	1.837	.224
Sex * Hormone	.037	2	.018	2.099	.204
Error	.053	6	.009		
Total	17.420	12			
Corrected Total	.283	11			

ตารางผนวกที่ ข23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการรอดตาย ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.178	5	.036	.689	.484
Within Groups	1.849	41	.045		
Total	2.027	46			

ตารางผนวกที่ ข24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า hepatosomatic index ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.658	5	.132	.731	.604
Within Groups	7.559	42	.180		
Total	8.216	47			

ตารางผนวกที่ ข25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาว villi ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	183.653	5	36.731	1.175	.359
Within Groups	562.614	18	31.256		
Total	746.268	23			

ตารางผนวกที่ ข26 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาว villi ในลำไส้เล็กส่วนต้น
ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ
โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	635.558 ^a	5	127.112	2.362	.082
Intercept	59046.320	1	59046.320	1097.036	.000
Sex	85.478	2	42.739	.794	.467
Hormone	416.458	1	416.458	7.737	.012
Sex * Hormone	133.621	2	66.811	1.241	.313
Error	968.823	18	53.823		
Total	60650.701	24			
Corrected Total	1604.381	23			

ตารางผนวกที่ ข27 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน goblet cell ในลำไส้เล็กส่วนต้น
ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ
โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63.697	5	12.739	.847	.534
Within Groups	270.663	18	15.037		
Total	334.360	23			

ตารางผนวกที่ ข28 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวน goblet cell ในลำไส้เล็กส่วนกลาง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.143	5	11.628	.784	.578
Within Groups	207.648	14	14.832		
Total	265.790	19			

ตารางผนวกที่ ข29 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	.557 ^a	5	.111	5.157	.001
Intercept	203.323	1	203.323	9415.552	.000
Sex	.516	2	.258	11.950	.000
Hormone	.018	1	.018	.849	.362
Sex * Hormone	.021	2	.010	.478	.624
Error	.885	41	.022		
Total	204.679	47			
Corrected Total	1.442	46			

ตารางผนวกที่ ข30 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าฮีโมโกลบิน ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	18.214 ^a	5	3.643	3.538	.009
Intercept	5936.301	1	5936.301	5765.398	.000
Sex	10.165	2	5.083	4.936	.012
Hormone	.750	1	.750	.728	.398
Sex * Hormone	7.299	2	3.649	3.544	.038
Error	43.245	42	1.030		
Total	5997.760	48			
Corrected Total	61.459	47			

ตารางผนวกที่ ข31 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	240.030	5	48.006	1.383	.252
Within Groups	1319.108	38	34.713		
Total	1559.137	43			

ตารางผนวกที่ ข32 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าปริมาตรของเม็ดเลือดแดง ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	9499.437 ^a	5	1899.887	2.717	.034
Intercept	1851344.510	1	1851344.510	2647.897	.000
Sex	7824.875	2	3912.437	5.596	.008
Hormone	364.949	1	364.949	.522	.475
Sex * Hormone	1188.013	2	594.006	.850	.436
Error	25869.488	37	699.175		
Total	1925546.076	43			
Corrected Total	35368.925	42			

ตารางผนวกที่ ข33 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าปริมาณฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงแต่ละเซลล์ ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	317.038 ^a	5	63.408	2.435	.051
Intercept	134190.691	1	134190.691	5153.842	.000
Sex	45.057	2	22.528	.865	.428
Hormone	2.011	1	2.011	.077	.782
Sex * Hormone	265.521	2	132.761	5.099	.011
Error	1067.518	41	26.037		
Total	135783.006	47			
Corrected Total	1384.556	46			

ตารางผนวกที่ ข34 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าความเข้มข้นฮีโมโกลบินเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	91.834 ^a	5	18.367	2.345	.060
Intercept	29432.579	1	29432.579	3757.104	.000
Sex	60.477	2	30.239	3.860	.030
Hormone	6.292	1	6.292	.803	.376
Sex * Hormone	23.392	2	11.696	1.493	.238
Error	297.686	38	7.834		
Total	30028.054	44			
Corrected Total	389.520	43			

ตารางผนวกที่ ข35 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด ด้วยการทดลอง แบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.178	5	.036	.789	.564
Within Groups	1.849	41	.045		
Total	2.027	46			

ตารางผนวกที่ ข36 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	353.191	5	70.638	1.106	.372
Within Groups	2553.679	40	63.842		
Total	2906.870	45			

ตารางผนวกที่ ข37 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	319.626	5	63.925	.765	.580
Within Groups	3341.179	40	83.529		
Total	3660.804	45			

ตารางผนวกที่ ข38 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	25.846	5	5.169	.592	.706
Within Groups	349.393	40	8.735		
Total	375.239	45			

ตารางผนวกที่ ข39 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าโปรตีนในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45.322	5	9.064	.568	.724
Within Groups	669.928	6	15.951		
Total	715.250	11			

ตารางผนวกที่ ข40 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	88220.684 ^a	5	17644.137	2.542	.040
Intercept	1317154.854	1	1317154.854	189.741	.000
Sex	87816.952	2	43908.476	6.325	.004
Hormone	381.521	1	381.521	.055	.816
Sex * Hormone	372.391	2	186.196	.027	.974
Error	354033.878	51	6941.841		
Total	1760703.000	57			
Corrected Total	442254.561	56			

ตารางผนวกที่ ข41 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าคอเลสเตอรอลในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4507.964	5	901.593	1.618	.172
Within Groups	28418.597	51	557.227		
Total	32926.561	56			

ตารางผนวกที่ ข42 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่ากลูโคสในเลือด ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	31943.933 ^a	5	6388.787	5.651	.000
Intercept	703300.267	1	703300.267	622.045	.000
Sex	10060.633	2	5030.317	4.449	.016
Hormone	7392.600	1	7392.600	6.539	.013
Sex * Hormone	14490.700	2	7245.350	6.408	.003
Error	61053.800	54	1130.626		
Total	796298.000	60			
Corrected Total	92997.733	59			

ตารางผนวกที่ ข43 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า lysozyme activity ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17.973	5	3.595	.759	.585
Within Groups	198.991	42	4.738		
Total	216.964	47			

ตารางผนวกที่ ข44 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า alternative complement activity (ACH50) ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	228591.632 ^a	5	45718.326	1.989	.100
Intercept	1.353E7	1	1.353E7	588.582	.000
Sex	44384.758	2	22192.379	.965	.389
Hormone	32447.480	1	32447.480	1.412	.241
Sex * Hormone	151759.393	2	75879.697	3.301	.047
Error	965462.565	42	22987.204		
Total	1.472E7	48			
Corrected Total	1194054.197	47			

ตารางผนวกที่ ข45 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า total immunoglobulin ด้วยการทดลองแบบ Factorial design แยกเพศ 3 แบบ และฮอร์โมน 2 ระดับ โดยใช้วิธี Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.508	5	11.702	.715	.616
Within Groups	687.506	42	16.369		
Total	746.014	47			

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวนงลักษณ์ พุ่มอยู่
เกิดวันที่	15 มกราคม 2516
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งปัจจุบัน	พนักงานสายวิชาการ (อาจารย์)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

