

หมิงหัว จาง : การพัฒนายีนเครื่องหมายที่จำเพาะต่อเพศในปลาสลิด (*Trichopodus pectoralis*) และการประยุกต์ใช้ในการจำแนกปลานีโอเมล (DEVELOPMENT OF SEX-SPECIFIC DNA MARKERS IN SNAKESKIN GOURAMI (*Trichopodus pectoralis*) AND THEIR APPLICATION FOR IDENTIFICATION OF NEOMALES). อาจารย์ที่ปรึกษา : ศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสร, 146 หน้า.

คำสำคัญ: ปลาสลิด (*Trichopodus pectoralis*)/การกำหนดเพศ/เครื่องหมาย SNP ที่จำเพาะต่อเพศ/RNA editing/นีโอเมล และนีโอพีเมล/การผลิตปลาเพศเดียว

ความแตกต่างเพศที่มีผลต่อลักษณะการเจริญเติบโตพบในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ปลาสลิด (*Trichopodus pectoralis*) เป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีการเพาะเลี้ยงมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นปลาที่เพศเมียเจริญเติบโตสูงกว่า ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการแปลงเพศปลาสลิดด้วยฮอร์โมนเอสตราไดออลเพื่อผลิตปลาสลิดเพศเมียล้วนทางการค้า ยังมีทางเลือกของการผลิตปลาสลิดเพศเมียล้วนโดยวิธีทางอ้อมโดยใช้ปลานีโอเมลและการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกเพศปลาสลิด จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตปลาสลิดนีโอเมล ซึ่งยังขาดข้อมูลด้านเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อเพศปลา ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาและประยุกต์ใช้ในการตรวจจีโนไทป์ของปลานีโอเมล

ในการทดลองที่ 1 การวิเคราะห์ทรานสคริปโตมด้วยเทคนิค RNA sequencing ในรังไข่และอวัยวะ พบ RNA SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลา 21 SNPs ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยเทคนิค Sanger และ PACE assays สามารถยืนยัน RNA SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาจำนวน 9 SNPs โดย SNPs เป็นเฮเทอโรไซโกตชนิดในปลาเพศผู้ และเป็นโฮโมไซโกตชนิดในปลาเพศเมีย ผลการศึกษาพบว่า SNP_2, SNP_3, SNP_4, SNP_5, SNP_12, และ SNP_15 อยู่ในยีน *ift172*, *man2a1*, *crk*, *ezh2*, *cs*, และ *cost* ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม SNPs เหล่านี้ไม่มีความจำเพาะต่อเพศปลาเมื่อตรวจวิเคราะห์ในจีโนม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากกระบวนการ RNA editing ที่มีผลต่อการกำหนดเพศปลา และพบว่ายีน *adar* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ RNA editing มีการแสดงออกสูงในปลาเพศผู้ ซึ่งน่าจะอธิบายได้ว่ากระบวนการ RNA editing เกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเพศปลา นอกจากนี้ SNPs อีก 3 SNPs ได้แก่ SNP_19, SNP_20, และ SNP_21 อยู่บนยีน *kap3l* โดย SNPs ทั้ง 3 มีความจำเพาะต่อเพศปลาทั้งในระดับอาร์เอ็นเอและในจีโนม จึงสามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์เพศปลาในระดับจีโนไทป์ได้ โดยสรุปการศึกษานี้ได้พบ SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาและสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลในการจำแนกเพศปลาได้

ในการทดลองที่ 2 การผลิตปลานีโอเมลโดยการเลี้ยงปลาด้วยอาหารผสมฮอร์โมน 17 α -methyltestosterone (MT) ปลาในกลุ่มควบคุมเป็นปลาเพศผู้โดยธรรมชาติ การศึกษานี้ได้ใช้

SNP_19, SNP_20, และ SNP_21 ในการจำแนกเพศปลาด้วยเทคนิค Sanger และ PACE assays ผลการศึกษาพบว่า SNPs ทั้ง 3 ให้ผลไปในทางเดียวกันคือ ปลาเพศผู้และปลาเพศผู้ที่ได้รับฮอร์โมน MT มีจิโนไทป์เป็นเฮเทอโรไซกัส ในขณะที่ปลานีโอเมลและปลาเพศเมียมีจิโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส ผลการทดสอบ Progeny testing พบว่าการผสมพันธุ์ระหว่างปลานีโอเมลและปลาเพศเมียให้ลูกปลาเพศเมียทั้งหมด โดยผลการศึกษาครั้งนี้ยืนยันระบบกำหนดเพศ XX/XY ในปลาชนิดนี้ ดังนั้น SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาสามารถนำไปใช้ในการจำแนกปลานีโอเมลได้

ในการทดลองที่ 3 การผลิตปลานีโอพีเมลโดยการเลี้ยงปลาด้วยอาหารผสมฮอร์โมน 17β -estradiol (E2) โดยการยืนยันผลจิโนไทป์ด้วย SNP_19, SNP_20, และ SNP_21

ผลการศึกษาพบว่าปลาเพศเมียที่ได้รับฮอร์โมน E2 มีจิโนไทป์เป็นโฮโมไซกัส ผลการทดสอบ Progeny testing พบว่าการผสมพันธุ์ระหว่างปลานีโอพีเมลและปลาเพศผู้ให้ลูกปลาเพศผู้ $73.34 \pm 3.16\%$ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ยืนยันระบบกำหนดเพศ XX/XY ในปลาชนิดนี้ ดังนั้น SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาสามารถนำไปใช้ในการจำแนกปลานีโอพีเมลได้เช่นกัน

โดยสรุป ดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ได้พัฒนา SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศ ที่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกเพศปลา การที่ปลาเพศผู้แสดงเฮเทอโรไซกัสของ SNPs สามารถยืนยันระบบกำหนดเพศในปลาชนิดนี้เป็นระบบ XX/XY และ SNPs ที่มีความจำเพาะต่อเพศปลาสามารถนำไปใช้ในการจำแนกปลานีโอเมลและนีโอพีเมล

สาขาวิชาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์
ปีการศึกษา 2568

ลายมือชื่อนักศึกษา Minghua Zhang
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ส.วิเศษ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Satoshi Kubota

MINGHUA ZHANG : DEVELOPMENT OF SEX-SPECIFIC DNA MARKERS IN
SNAKESKIN GOURAMI (*Trichopodus pectoralis*) AND THEIR APPLICATION FOR
IDENTIFICATION OF NEOMALES. THESIS ADVISOR: PROF. SURINTORN
BOONANUNTANASARN, Ph. D., 146 PP.

Keyword: SNAKESKIN GOURAMI (*Trichopodus pectoralis*)/SEX DETERMINATION/SEX-
SPECIFIC SNP MARKERS/RNA EDITING/NEOMALE AND NEOFEMALE/MONOSEX
PRODUCTION

Sexual dimorphism in growth characteristics is observed in many economically important fish species. The snakeskin gourami (*Trichopodus pectoralis*), an economically important freshwater fish widely cultured in Southeast Asia, exhibits pronounced female-biased growth. Recently, estradiol-induced sex reversal technology has been established to produce all-female populations for commercial purposes. In addition, an indirect method to generate neomales could be an alternative strategy to produce all-female fish populations, and a genotypic sex-specific marker could offer an efficient procedure to produce neomales. However, information on sex-specific markers in snakeskin gourami remains limited. Therefore, this study aimed to develop sex-specific markers and apply them to determine the genotype of neomales.

In Experiment I, transcriptome-based SNP analysis using RNA sequencing of ovarian and testicular tissues identified 21 candidate sex-specific RNA SNPs. Validation by Sanger sequencing and PACE assays confirmed nine sex-specific SNPs identified from RNA-seq, that were heterozygous in males and homozygous in females. Among these SNPs, six SNPs including SNP_2, SNP_3, SNP_4, SNP_5, SNP_12, and SNP_15 were located in *ift172*, *man2a1*, *crk*, *ezh2*, *cs*, and *cast*, respectively. However, these SNPs were not detected in genomic DNA, suggesting that RNA editing may be involved in sex determination. Additionally, male-biased expression of *adar* suggested that RNA editing may contribute to sex differentiation in snakeskin gourami. The remaining three SNPs (SNP_19, SNP_20, and SNP_21) were located in *kap3l*. Subsequent validation at the genomic DNA level showed that SNP_19, SNP_20, and SNP_21 were concordant with nucleotide variation in genomic DNA, suggesting that these three SNPs could be

used for sex genotyping. Collectively, these findings demonstrate the identification of sex-specific SNP markers for sex determination in snakeskin gourami.

In Experiment II, neomale broodstock were generated through dietary administration of 17α -methyltestosterone (MT), while the control group consisted of naturally developed broodstock. Genetic sex was determined using sex-specific SNP markers (SNP_19, SNP_20, and SNP_21) via Sanger sequencing and PACE SNP assays. All markers exhibited consistent genotyping patterns, with MT-treated males and control males showing heterozygous genotypes, whereas MT-derived neomales and females displayed homozygous genotypes. Progeny testing confirmed that crosses between neomales (XX) and females (XX) consistently produced 100% female offspring. These results support an XX/XY sex-determination system in snakeskin gourami. Therefore, sex-specific SNP markers could be applied to identify neomales.

In Experiment III, neofemales induced by 17β -estradiol (E2) were genetically confirmed using SNP_19, SNP_20, and SNP_21. E2-treated neofemales and control males exhibited heterozygous genotypes, whereas E2-treated females displayed homozygous genotypes. Crosses between neofemales (XY) and males (XY) produced male-biased progeny (male: $73.34 \pm 3.16\%$), consistent with an XX/XY sex determination system. Therefore, sex-specific SNP markers could also be applied to identify neofemales.

In summary, this study developed reliable sex-specific SNP markers and demonstrated their application in genetic sex identification. The presence of heterozygous SNPs in males suggests an XX/XY sex-determination system in snakeskin gourami. These sex-specific SNP markers can be applied for genotyping not only neomales but also neofemales.

School of Animal Technology and Innovation
Academic Year 2025

Student's Signature Minghua Zhang

Advisor's Signature [Signature]

Co-advisor's Signature Satashi Kubota