Thesis Title	Analysis of Anti-Müllerian Hormone Gene Polymorphism in Temperature-dependent Sex Reversal Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)
Author	Miss Sawichaya Rueangsri
Degree	Master of Science (Agriculture) Animal Science
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Kesinee Gatphayak Advisor Dr. Stephan Wessels Co-advisor

ABSTRACT

In Nile tilapia, alternative protocols to obtain the desired all-male stocks are needed. An alternative way, to the common use of hormones, could be the application of temperature protocols to sex-reverse the fish. Various studies found that high temperatures (>34 ºC) can increase the percentage of males in Nile tilapia. QTL have been detected on linkage groups (LG) 1, 3, and 23. One candidate gene, located in the QTL-region of LG 23 is the Anti-Müllerian hormone (*amh*) gene, which represses the development of Müllerian ducts and thus leads to female sexual development. Müllerian ducts are not found in fish, though a sex specific expression of the *amh* gene was detected in Nile tilapia. Therefore, the aim of the present study was to identify genetic polymorphisms in the *amh* gene and study in their association with the temperature-dependent sex. Experimental fish were derived from matings between 5 temperature sex-reversed males (Δ♂XX) and 6 non-sensitive females (XX). DNA was obtained from fish that were phenotyped for their temperature dependent sex. DNA-pools of 4-5 individuals of either temperature sex-reversed males (Δ♂XX) or genetic females were used as PCR templates. Primers were designed for the *amh* gene (except 3', 5' UTR) using the Primer 3 software. A M13 universal primer was added to the 5' end of primers for bidirectional sequencing. The resulting sequences were analyzed by DNASTAR Lasergene® software from NCBI. A total of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the coding sequence of the *amh* gene. SNP1, SNP2 and SNP3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were located in exon 6, intron6 and exon 7, respectively. The chi-square statistic was use to test an association between the genotypes, the identified SNPs and the phenotypic sex . All three SNPs were associated with the phenotypic sex of the investigated fish ($P<0.05$). Moreover, SNP1 and SNP3 might cause change in the protein function due to the substitution of amino acids from glutamine to glutamic acid (codons Gaa/Caa) and alanine to valine (codon gCg/gTg). Amino acid substitution due to missense variants in the *amh* gene might be the cause of sexual fate in Nile tilapia. However, the functional role of the SNPs of *amh* gene reported here, remain to be elucidated.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การวิเคราะห์พหุสัณฐานของยีนแอนตี้มูลเลอเรียนฮอร์โมนในปลา-นิลแปลงเพศด้วยอุณหภูมิ	
ผู้เขียน	นางสาว สวิชญา เรืองศรี	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สัตวศาสตร์	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ.ดร. เกศินี เกตุพยัคฆ์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Dr. Stephan Wessles	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้ทั้งหมดมีวิธีการหลายวิธี ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้ฮอร์โมน การใช้อุณหภูมิเป็นวิธีการทางเลือกในการผลิตปลานิลเพศผู้ จากหลายการศึกษาพบว่า อุณหภูมิของน้ำที่สูงกว่า 34 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มอัตราส่วนของปลานิลเพศผู้ได้ มีการตรวจพบ QTL ได้บน linkage group (LG) ที่ 1, 3, 23 QTL โดยบน LG 23 พบยีนแอนตี้มูลเลอเรียนฮอร์โมน (Anti-Müllerian hormone; *am*h) ซึ่งเป็นยีนควบคุมการพัฒนาท่อมูลเลอเรียน (Müllerian ducts) ที่นำไปสู่การแสดงออกในลักษณะเพศเมีย ท่อมูลเลอเรียนไม่พบในปลาแต่พบว่ามีการแสดงออกของยีน *amh* ในปลานิล การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์พหุสัณฐานของยีน *amh* และศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *amh* ต่อการเปลี่ยนเพศด้วยอุณหภูมิ ปลานิลที่ใช้ทดลองเกิดจากปลานิลที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเพศผู้ 5 ตัว ($\Delta\male$XX) ผสมกับ ปลานิลเพศเมีย 6 ตัว (XX) ตัวอย่างดีเอ็นเอได้จากปลาที่ทำการตรวจฟีโนไทป์ของเพศหลังจากเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ โดยนำมาทำดีเอ็นเอพูล (4-5ตัวอย่าง) ของปลานิลเพศเมียและเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิได้ถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR ไพรเมอร์ *amh* (ยกเว้น 5'-3' UTR) ถูกออกแบบโดยโปรแกรม Primer 3 software และติดปลาย 5' ด้วยไพรเมอร์ M13 universal สำหรับการเปรียบเทียบลำดับเบสโดยตรงแบบสองทาง ผลการทดลองวิเคราะห์ด้วยชุดโปรแกรม DNASTAR Lasergene® software พบจุดกลายพันธุ์ single nucleotide polymorphisms (SNPs) 3 จุด คือ SNP1,SNP2 และ SNP3 อยู่ตำแหน่งเอกซอน 6 อินทรอน 6 และเอกซอน 7 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าไคสแควร์ ชี้ให้เห็นว่า การกลายพันธุ์ของ SNP มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางเพศ ($P<0.05$) นอกจากนี้ SNP2 และ SNP3 ยังมีผลในการแทนที่กรดอะมิโน โดยเปลี่ยนกรดอะมิโน glutamine เป็น glutamic (codons Gaa/Caa) และเปลี่ยนกรดอะมิโน alanine เป็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

valine (codon gCg/gTg) และซึ่งอาจมีผลต่อความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย อย่างไรก็ตาม บทบาทหน้าที่ของยีน*amh*ยังคงอยู่ในการศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved