รังสรรค์ ดวงแก้ว : การพัฒนาการปลูกถ่ายเจิร์มเซลล์ในปลากลุ่มแพงกาซิดแคทฟิช (DEVELOPMENT OF GERM CELL TRANSPLANTATION IN PANGASIID CATFISH) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร, 157 หน้า.

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลากลุ่มแพงกาซิด (Pangasiid) โดยการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้แบ่งเป็น 4 การทดลอง

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาผลของอายุของปลาผู้ให้ (donor fish) ต่อประสิทธิภาพของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ โดยการทดลองในครั้งนี้ได้ศึกษาในปลาชิวข้าวสารญี่ปุ่น (Japanese medaka, *Oryzias latipes*) เนื่องจากเป็นปลาที่มีช่วงชีวิตสั้น การทดลองนี้เริ่มจากการแสดงความสัมพันธ์ของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตา และอัณฑะของปลาที่อายุ 1 2 3 4 8 และ 18 เดือน ผลการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า อายุของปลามีผลต่อจำนวน ASG แต่ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

การทดลองที่ 2 ได้ทำการโคลน และศึกษาโครงสร้างของ mRNA ของยีน *vasa* เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายเซลล์สืบพันธุ์ในการศึกษาอายุที่เหมาะสมของปลาสวาย (*Pangasianodon hypopthalmus*) ยีน *vasa* ของปลาสวาย (*Phy-vasa)* ประกอบไปด้วยโมทิฟที่สำคัญที่เป็นเอกลักษณ์ของยีน *vasa* ผลการศึกษารีเวิร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (reverse transcription PCR) พบว่า mRNA ของ *Phy-vasa* แสดงออกเฉพาะในอัณฑะ และรังไข่เท่านั้น และการศึกษาด้วยเทคนิคอินไซตูไฮบริไดเซชัน (in situ hybridization) พบว่า mRNA ของ *Phy-vasa* แสดงออกเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ และสรุปได้ว่า กระบวนการเคลื่อนย้ายของเซลล์ไพรมอร์เดียล (Primordial germ cell; PGC) เกิดขึ้นในปลาวัยอ่อนที่อายุ 2-10 วันนับจากวันหลังผสม (days post fertilization) และในลูกปลาที่อายุ 10-20 วันนับจากวันหลังผสม พบว่า PGCs ในอวัยวะสืบพันธุ์เริ่มมีเซลล์โซมาติก (somatic cell) มาเจริญรอบ นอกจากนี้ในปลาที่มีอายุ 25-30 วันนับจากวันหลังผสม กระบวนการการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนของ PGCs เริ่มเกิดขึ้น

การทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตปลาสวายทริพพลอยด์ (triploid fish) ที่มีโครโมโซม (chromosome) 3 ชุด เพื่อใช้เป็นลูกปลาผู้รับ (recipient fish) ผลการทดลองพบว่า การช็อคไข่ปลาด้วยความเย็นที่อุณหภูมิน้ำ 7.5°C เป็นระยะเวลา 30 นาที เป็นวิธีการที่ทำให้ได้ลูกปลาทริพพลอยด์ 90% โดยมีอัตราการฟักของไข่ปลาเท่ากับ 35.34% และอัตราอดที่ระยะเวลา 7 วันนับจากวันหลังผสม อยู่ที่ 20.00% และพบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาทริพพลอยมีขนาดนิวเคลียส และปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าปลาดิพพลอยด์ที่มีโครโมโซม 2 ชุด (diploid fish) ประมาณ 1.5 เท่า ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI) ของปลาดิพพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าปลาทริพพลอยด์ การศึกษานี้พบว่า กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis)

ของปลาทริพพลอยด์มีความผิดปกติ อย่างไรก็ตามพบว่า ค่าสมรรถนะการเจริญเติบโต ค่าโลหิตวิทยา และการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงปลาวัยอ่อนของปลาดิพพลอยด์ และปลาทริพพลอยด์ไม่มีความแตกต่างกัน

การทดลองที่ 4 มีจุดประสงค์ที่จะพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้เซลล์สเปอร์มาโตโกเนีย (spermatogonia; SG) และโอโอโกเนีย (oogonia; OG) จากปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) และใช้ปลาสวายเป็นปลาผู้รับ โดยทำการฉีด SG และ OG เข้าสู่ช่องท้องของปลาผู้รับทั้งปลาที่เป็นดิพพลอยด์และทริพพลอยด์พบว่า อัตราการที่ SG และ OG ของปลาบึกเข้าฝังเซลล์ในอวัยวะสืบพันธุ์ (colonization rate) ของปลาสวายดิพพลอยด์ และปลาสวายทริพพลอยด์มีค่าเท่ากับ 80.00±16.33% และ 90.00±20.00% ตามลำดับ นอกจากนี้ได้ใช้เทคนิครีเวิร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์อาร์เอฟแอลพี (reverse transcription PCR-RFLP) เพื่อยืนยันผลการฝังตัวของเซลล์สืบพันธุ์ปลาบึกในปลาสวาย ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า เซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์จากปลาบึกมีการเคลื่อนย้ายและเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสวายที่เป็นปลาผู้รับได้

โดยสรุป การศึกษานี้ได้ข้อมูลทางชีววิทยา เทคนิค และวิธีการสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ และถือเป็นความสำเร็จขั้นต้นในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ และปลาที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์จะนำไปเลี้ยงต่อเพื่อทดสอบว่าเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้สามารถผลิตพ่อแม่ปลาอุ้มบุญของปลาบึก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

RUNGSUN DUANGKAEW : DEVELOPMENT OF GERM CELL TRANSPLANTATION IN PANGASIID CATFISH. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SURINTORN BOONANUNTANASARN, Ph.D., 157 PP.

GERM CELL TRANSPLANTATION/PANGASIID FISH/MEDAKA/VASA

This study aimed to develop germ cell transplantation (GCT) technology in Pangasiid fish. In order to accomplish GCT, four experiments were conducted.

Experiment I investigated the aging effects of donor fish on the efficiency of GCT in medaka (*Oryzias latipes*) since it has the short life cycle. The experiment began by determining age-related changes in the eye and testis at 1, 2, 3, 4, 8 and 18 months of age. There were age-related effects on the number of type A spermatogonia (ASG) but not for the efficiency of GCT.

Experiment II cloned and characterized *vasa* mRNA (*Phy-vasa*) for use as a gene maker for determining the suitable age of the recipient larvae of striped catfish (*Pangasianodon hypopthalmus*). *Phy-vasa* contained all of the predicted consensus motifs that are shared within the Vasa family among other fish. By RT-PCR, *Phy-vasa* mRNA was observed only in the gonad. Using in situ hybridization, *Phy-vasa* mRNA was expressed specifically only in germ cells. Migration of primordial germ cells (PGCs) were found most abundantly in larvae, 2-10 days post-fertilization (dpf) and the genital ridges containing PGCs and somatic cells were formed at 10-20 dpf. The proliferation of PGCs began in larvae between 25-30 dpf.

Experiment III determined the optimal condition for production of triploid striped catfish for the use as recipient larvae. The results showed that cold-shock at

7.5°C for 30 min was the optimum process to obtain 90% triploid fish with 35.34% of hatching rate and 20.00% of survival rate. The triploid red blood cell (RBC) has significantly larger nuclear sizes and DNA content (1.5 times) than that of diploid fish. The larger GSI in diploid fish was observed. Gametogenesis of triploid fish appeared to be disorder. However, growth performance, hematological indices and early gonadal development of diploid and triploid fish were similar.

Experiment IV developed GCT using donor germ cell [Spermatogonia (SG) and oogonia (OG)] from the Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*) and recipient larvae of striped catfish. GCT was performed by microinjecting SG or OG into the peritoneal cavity of either diploid or triploid larvae. The colonization rates of SG and OG in the gonad of diploid and triploid fish were ranged within 80.00±16.33% and 90.00±20.00%, respectively. RT-PCR-RFLP confirmed the incorporation of the donor germ cell in the gonad of the striped catfish. These findings suggest that the transplanted immature germ cell of the Mekong giant catfish migrated toward and incorporated into the genital ridge of the recipient striped catfish larvae.

In conclusion, this study provided biological information, techniques and methods for GCT. The preliminary success of GCT was achieved. Culture of the transplanted fish have been carried out to confirm whether our technology could produce surrogate broodstock of the Mekong giant catfish.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology Student's Signature Rungsun

Academic Year 2017 Advisor's Signature