



รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
การเพาะพันธุ์ปลาในบ่อเลี้ยง (ระยะที่ 2)
(Application of germ cell transplantation technique for
improvement of fish breeding in culture pond: Phase 2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ

การเพาะพันธุ์ปลาในบ่อเลี้ยง (ระยะที่ 2)

(Application of germ cell transplantation technique for
improvement of fish breeding in culture pond: Phase 2)

คณะผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอนันตสินสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.รังสรรค์ ดวงแก้ว นางสาวพงษ์วรรณ ขาวสะอาด ดร.อารยา แจ่มไพโร นางสาวธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์ ดร.สุขสันต์ ขำคง นักวิจัย ที่ได้ช่วยดำเนินการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งบุคลากรฝ่ายสนับสนุนทุกท่าน ที่ได้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวศิริวรรณ เพชรสมบัติ หัวหน้างานกลุ่มห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และนายมานะ ชาญเวช พนักงานวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยนี้ ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากรและนักศึกษา ของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ได้ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และการสนับสนุนในทุก ๆ ด้าน

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้เงินทุนสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ในการให้ความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือการวิจัย และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในการทำงานวิจัยนี้



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา กลุ่ม Pangasiid ในขั้นแรกได้ทำการพัฒนาอินเครื่องหมายที่ใช้ในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) การศึกษานี้ได้ทำการโคลนและศึกษาโครงสร้างของยีน *vasa* ในปลาบึก และให้ชื่อว่า *Pgi-vasa* โดยยีน *Pgi-vasa* ประกอบด้วยกลุ่มของโมทีฟของกรดอะมิโนที่เป็นคุณลักษณะของยีน *vasa* ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ชุดซ้ำของกรดอะมิโน RG และ RGG กรดอะมิโน ATPase motifs และ กรดอะมิโน DEAD-box การวิเคราะห์แผนภาพ Phylogenetic เปรียบเทียบกับโปรตีนของกลุ่ม DEAD-box family พบว่าโปรตีนของยีน *Pgi-vasa* จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน Vasa การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่ายีน *Pgi-vasa-vasa* มีการแสดงออกที่รังไข่และอณฑะ ผลการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาร่วมกับ in situ hybridization โดยโพรบ Antisense พบว่ายีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออกเฉพาะที่เซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell) และสามารถใช้ในการจำแนกโอโอไซท์ (oocyte) โพรมารีโอโอไซท์ (primary oocyte) และ โอโอโกเนีย (oogonia) ในรังไข่และจำแนก สเปิร์มาโทไซท์ (spermatocytes) และ สเปิร์มาโทโกเนีย (spermatogonia) ในอณฑะได้ การศึกษาต่อมาทำการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ และปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) เป็นปลาผู้รับ การศึกษาถึงระยะที่เหมาะสมของปลาบึกต่อการเป็นปลาผู้ให้ พบว่าปลาบึกที่ระยะ Immature หรือที่น้ำหนักตัวตั้งแต่ 1 - 10 กิโลกรัม เหมาะสมที่จะเป็นปลาผู้ให้ เนื่องจากพบจำนวนของ spermatogonia หรือ oogonia สูงที่สุด ระยะของลูกปลาสวายวัยอ่อนที่เหมาะสมสำหรับเป็นปลาผู้รับ คือ ที่ระยะ 4 dph (day post hatching; dph) เอ็นไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากอณฑะปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II โดยให้จำนวนเซลล์ Spermatogonia 1.4×10^6 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่ออณฑะ 100 มิลลิกรัม เอ็นไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากรังไข่ปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II เช่นเดียวกัน โดยให้จำนวนเซลล์ Oogonia 5.3×10^5 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่อรังไข่ 100 มิลลิกรัม การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดได้จากอณฑะของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia เท่ากับ 90 % การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดจากรังไข่ของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ oogonia เท่ากับ 80 % ปลาสวายผู้รับวัยอ่อนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ มีอัตราการรอดเท่ากับ 26 % ซึ่งอัตราการรอดของลูกปลาสวายไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

Abstract

This study aimed to develop germ cell transplantation technology in Pangasiid. First, development of gene marker for identification of germ cell in giant catfish (*Pangasianodon gigas*) was performed. Cloning and expression analysis of vasa cDNA of giant catfish was conducted and designated this as *Pgi-vasa*. The *Pgi-vasa* contained all of the predicted consensus motifs that are shared among the vasa genes in other fish species, including RG and RGG repeats, ATPase motifs, and a DEAD-box, and phylogenetic analysis using various DEAD-box family proteins demonstrated that the *Pgi-vasa* protein clustered within the Vasa family. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) indicated that *Pgi-vasa* mRNA only occurred in ovary and testis. Histological characterization and in situ hybridization showed that the antisense probe of *Pgi-vasa* was able to identify oocyte, primary oocyte and oogonia in ovary as well as spermatocytes and spermatogonia in testis. Secondly, in order to develop germ cell transplantation, the giant catfish was used as donor fish, and the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) was used as recipient. The optimum growth stage of giant catfish to be used as donor fish was the fish as size of 1 – 10 kg body weight since the high proportion of spermatogonia or oogonia were highest. The optimum stage of recipient larvae of the striped catfish were 4 dph (day post hatching; dph). The optimum enzyme for dissociation of testis was 0.4 % Collagenase IV and 0.03 % Dispase II which resulted in isolated Spermatogonia 1.4×10^6 cells/ 100 mg of testis. Similarly, 0.4 % Collagenase IV and 0.03 % Dispase II were the suitable enzyme to dissociate ovary which could isolate oogonia 5.3×10^5 cells/ 100 mg of ovary. Germ cell transplantation was developed by microinjection of the spermatogonia of giant catfish into the recipient larvae of striped catfish. The colonization rate of spermatogonia was 90 %. In addition, germ cell transplantation of dissociated cell of ovary into striped catfish larvae resulted in the colonization of 80 %. The survival rate of transplanted larvae was 26 % which was not significantly different comparing to control un-injected fish ($P>0.05$).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทกัณฑ์ย่อ	ข
Abstract	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 การตรวจสอบเอกสารทางวิชาการ	
ปลาบึก	4
ปลาชวา	6
การโคลนยีน	8
การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การทดลองที่ 1 การโคลนยีน <i>vasa</i> ในปลาบึกและการศึกษาความจำเพาะ	
เจาะจงต่อการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ และการใช้เป็นยีนเครื่องหมายใน	
การจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึก	16
การทดลองที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ปลาบึก	
เป็นปลาผู้ให้ และใช้ปลาชวาวัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ.....	21
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	
การโคลนยีน <i>vasa</i> จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก และการวิเคราะห์ความจำเพาะ	
เจาะจงต่อการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์	26
การวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อและ <i>in situ hybridization</i> ของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก..	27

สารบัญ

	หน้า
การศึกษาการพัฒนาการของอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก.....	28
การทดสอบหาระยะที่เหมาะสมของปลาสาวผู้รับวัยอ่อนต่ออัตราการรอดและ อัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาบึกผู้ให้.....	28
อัตราการรอด และอัตราการเข้าอาศัยของการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ของปลาบึกในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสาวผู้รับวัยอ่อน	30
อัตราการรอด และอัตราการเข้าอาศัยของการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ของปลาบึก เข้าสู่ปลาสาวผู้รับวัยอ่อน.....	32
อภิปรายผลการศึกษา	49
บทที่ 5 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	53
บรรณานุกรม	54
ประวัตินักวิจัย	62

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์	15
ตารางที่ 2.1 ไพรมอร์ที่ใช้ในการศึกษา	21
ตารางที่ 2.2 สภาพที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction	18
ตารางที่ 3.1 ผลของอายุลูกปลาผู้รับที่ระยะต่าง ๆ ต่ออัตราการรอดและอัตราการเข้าไปอาศัย (Colonization rate) ของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาผู้ให้ (Donor fish) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)	29
ตารางที่ 3.2 อัตราการรอดของลูกปลาผู้รับ (Survival rate) ที่ปลูกถ่ายโดยเซลล์ Spermatogonia ซึ่งสกัดได้จากอวัยวะของปลาผู้ให้ (Donor testis) ที่เข้าไปอาศัย (Colonization rate) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)	31
ตารางที่ 3.3 อัตราการรอดของลูกปลาผู้รับ (Survival rate) อัตราของเซลล์ Oogonia ที่สกัดได้จากอวัยวะของปลาผู้ให้ (Donor testis) ที่เข้าไปอาศัย (Colonization rate) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)	33

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1.1 ปลาบึก	4
ภาพที่ 1.2 ปลาสวาย	6
ภาพที่ 1.3 แผนภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา	13
ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ออกจากอัมตะหรือรังไข่ ของปลาบึก	24
ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการย้อมสี Fluorescence dye PKH26 และ การ Microinjection	24
ภาพที่ 2.3 เซลล์สืบพันธุ์หลังผ่านการย้อมสี Fluorescence dye PKH26	25
ภาพที่ 2.4 ลูกปลาสวายเพื่อผู้รับอายุ 4 วันหลังจากปักเป็นตัว (N = Needle)	25
ภาพที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA และลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>vasa</i> ในปลาบึก .	35
ภาพที่ 3.2 การเปรียบเทียบตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แสดงโครงสร้างอนุรักษ์ในยีน <i>vasa</i>	37
ภาพที่ 3.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>vasa</i>	39
ภาพที่ 3.4 การแสดงออกของ mRNA ของยีน <i>vasa</i> ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลาบึก (<i>P. gigas</i>)	40
ภาพที่ 3.5 ปลาบึกและอวัยวะสืบพันธุ์ ปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย	41
ภาพที่ 3.6 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อวิทยาของปลาบึกเพศผู้และปลาบึกเพศเมีย	42
ภาพที่ 3.7 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและ in situ hybridization ในอัมตะและรังไข่	43
ภาพที่ 3.8 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและ in situ hybridization ในปลาอัมตะของปลาสวายโตเต็มวัย และเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านการสกัดเซลล์ของปลาบึก	44
ภาพที่ 3.9 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Spermatogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ ของปลาสวายผู้รับที่ระยะต่าง ๆ	45
ภาพที่ 3.10 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Oogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ ของปลาสวายผู้รับที่ระยะต่าง ๆ	46
ภาพที่ 3.11 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดจากอัมตะ ของปลาบึก และปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาสวายเพื่อกวัยอ่อน	47
ภาพที่ 3.12 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดจากรังไข่ ของปลาบึก และปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาสวายเพื่อกวัยอ่อน	48

บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

สัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาเป็นแหล่งอาหาร โปรตีนคุณภาพดีที่สำคัญของประเทศไทย ปลา และกุ้งเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญสำหรับคนทุกชั้น ผลผลิตปลาในประเทศไทยส่วนหนึ่งได้จากการจับจากธรรมชาติ (Capture) และการเพาะเลี้ยง (Culture) ภาพที่ 1.1 แสดงปริมาณปลาที่ได้จากการจับจากธรรมชาติค่อนข้างคงที่ และมีแนวโน้มจะลดลง การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ส่งผลให้ผลผลิตปลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงปลาเพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นการเพาะเลี้ยงปลาจึงช่วยชดเชยผลผลิตปลาที่ได้จากการจับจากธรรมชาติได้ (สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2553) การเพาะเลี้ยงปลาจึงเป็นกิจกรรมที่สำคัญที่ทำให้เกิดความมั่นคงทางด้านอาหารจากสัตว์น้ำ (Aquaculture for Food Security) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่า 2 - 3 ปีที่ผ่านมา ผลผลิตปลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเริ่มมีแนวโน้มลดลง ซึ่งเป็นสัญญาณเตือนถึงความมั่นคงที่ลดลงทางด้านอาหารจากสัตว์น้ำ

ปัญหาหนึ่งของการเลี้ยงปลา คือการขาดแคลนลูกพันธุ์ปลา พันธุ์ปลาหลายชนิดมีปัญหาด้านการเพาะพันธุ์ โดยเฉพาะปลาที่เลี้ยงในฟาร์ม เมื่อเลี้ยงปลาในฟาร์มหรือในบ่อดินซึ่งเป็นที่จำกัดในระยะเวลาหนึ่ง มักเกิดปัญหาเรื่องการเพาะลูกพันธุ์ปลา การศึกษาวิจัยทั้งด้านวิทยาศาสตร์พื้นฐานและวิทยาศาสตร์ประยุกต์ในด้านระบบสืบพันธุ์ปลายังมีอยู่อย่างจำกัด การวิจัยส่วนใหญ่เน้นไปที่การเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิต การประสบปัญหาด้านเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ปลาเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการสร้างความมั่นคงทางด้านอาหารที่ได้จากปลา การศึกษาวิจัยด้านเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ในปลา ต้องการเทคโนโลยีใหม่ ๆ เพื่อนำมาใช้ในการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลา หากไม่มีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีใหม่เตรียมการสำหรับอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลา การเลี้ยงปลาในอนาคตจะประสบปัญหาการขาดแคลนพันธุ์ปลาที่ดี สำหรับนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลา

เทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา (Germ cell transplatation) ได้พัฒนาขึ้นในปลาทดลองและในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Yoshizaki et al., 2002) เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เป็นการนำเอาเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ เซลล์ต้นกำเนิดของระบบสืบพันธุ์ เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogonia) และ เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonia) จากปลาผู้ให้ (Donor fish) นำไปฉีด (Microinjection) เข้าสู่ช่องว่างในลำตัวของลูกปลาผู้รับ (Recipient fish larvae) จากนั้นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์จะเคลื่อนไปฝังตัวยัง Genital ridge ของปลาผู้รับ และพัฒนาไปพร้อมกับอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ ถ้าปลาผู้รับเป็นเพศผู้ทางพันธุกรรม เซลล์ต้นกำเนิด

ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้ถ่ายเข้าไปก็จะพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และถ้าปลาผู้รับเป็นเพศเมียทางพันธุกรรม เซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้ถ่ายเข้าไปก็จะพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เมื่อปลาผู้รับเจริญเติบโตเต็มวัย และพร้อมจะสืบพันธุ์ (Maturation) ก็จะเป็นพ่อแม่ปลาอุ้มบุญ (Surrogate broodstock) เมื่อนำมาผสมพันธุ์กันก็จะผลิตลูกของปลาผู้ให้ (Donor-derive offspring) เนื่องจากปลาให้ลูกครั้งละจำนวนมาก จึงทำให้ได้ลูกปลาที่มาจากการปลูกถ่ายเซลล์จำนวนไม่น้อย และเทคนิคการฉีด หรือ Microinjection ก็ไม่ซับซ้อน ดังนั้นเทคนิคการปลูกถ่ายอวัยวะสืบพันธุ์จึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในปลา นอกจากนี้ระบบภูมิคุ้มกันในปลาในระยะที่เป็นลูกปลาวัยอ่อนยังไม่พัฒนาสมบูรณ์ ด้วยเหตุนี้การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะลูกปลาวัยอ่อน จึงไม่ถูกปฏิเสธ (Rejection) ดังนั้นเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในตัวปลาจึงเป็นการสร้าง พ่อแม่ปลาอุ้มบุญของปลาที่ต้องการเพิ่มจำนวนลูกพันธุ์ และรักษาพันธุ์

งานวิจัยการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์ในระยะเริ่มต้น จึงจะเริ่มการพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลากลุ่มปลาสาวย เนื่องจากปลาสาวยเป็นปลาที่การเพาะพันธุ์โดยวิธีการฉีดฮอร์โมนผสมเทียมสามารถได้โดยทั่วไป ฤดูกาลการผสมพันธุ์ประมาณ 6 - 8 เดือนต่อปี ปลาที่จะเจริญเป็นพ่อแม่พันธุ์ใช้ระยะเวลา 2 - 3 ปี ซึ่งไม่นานจนเกินไป ปลาสาวยจัดอยู่ในกลุ่มปลาหนัง (*Pangasius*) กลุ่มปลาหนังในสกุล *Pangasius* เป็นกลุ่มปลาที่มีความหลากหลายสูง มีจำนวนสปีชีส์อยู่ในปลาสกุลนี้ 21 สปีชีส์ มีทั้งปลาที่มีการเพาะพันธุ์และเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลาย เช่น ปลาสาวย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ปลาที่มีขนาดใหญ่อย่างปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) และปลาที่อยู่ในสภาวะที่ใกล้จะสูญพันธุ์เช่น ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) จึงน่าจะเป็นกลุ่มปลาที่เหมาะสมที่จะนำมาพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อเพิ่มองค์ความรู้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในปลาต่าง ๆ ในประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อโคลนและศึกษาโครงสร้างคุณลักษณะของยีน *vasa* ในปลาบึก ซึ่งใช้เป็นปลาผู้ให้ (Donor fish) เพื่อพัฒนาการใช้ยีน *vasa* ในปลาบึกเป็นยีนเครื่องหมายติดตามการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาบึก ในการหาระยะของปลาผู้ให้สำหรับการสกัดเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์
2. เพื่อพัฒนาการเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ปลาสาวยวัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ และใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นการโคลนยีน *vasa* ซึ่งเป็นยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงและแสดงออกที่อวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้นในปลาบึก และทำการพัฒนาโดยใช้ยีน *vasa* เป็นยีนเครื่องหมาย (Gene marker) ในการศึกษาและติดตามการพัฒนาการของรังไข่และอวัยวะในปลาบึก และนำมาใช้เป็นแหล่งของเซลล์ผู้ให้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ และการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ (Donor fish) และลูกปลาสวายวัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ (Recipient fish) โดยการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากศึกษาการพัฒนาของอวัยวะและรังไข่ของปลาผู้ให้แล้ว ยังต้องมีการศึกษาในส่วนของปลาผู้รับด้วย โดยงานวิจัยนี้ใช้ปลาสวายเป็นปลาผู้รับ จึงต้องทำการศึกษาระยะที่เหมาะสมของปลาสวายที่จะใช้เป็นปลาผู้รับ จากนั้นทำการติดตามการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Spermatogonia หรือเซลล์ Oogonia ที่สกัดได้จากอวัยวะและรังไข่ของปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ (Genital ridges) ของปลาผู้รับ

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ผลการวิจัยที่ได้จากโครงการนี้ จะเป็นประโยชน์ในแง่ของทางวิชาการ เป็นการโคลนยีนที่มีความจำเพาะต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก (ปลาผู้ให้) เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการศึกษาและติดตามการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในปลาสวาย (ปลาผู้รับ) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการวิจัยที่จะศึกษาในเชิงชีววิทยาของระบบสืบพันธุ์ของปลาต่อไป

นอกจากนี้งานวิจัยในครั้งนี่ยังสามารถใช้เป็นงานต้นแบบในการพัฒนาการใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ในปลาชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เริ่มมีการใช้อย่างแพร่หลาย และมีความจำเป็นอย่างมากสำหรับการเพาะขยายพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีปัญหาในเรื่องการเพาะพันธุ์เองตามธรรมชาติ หรือยังสามารถใช้สำหรับการขยายพันธุ์ปลาที่มีพันธุกรรมดี และปลาบางชนิดที่การเพาะขยายพันธุ์ในแต่ละครั้งต้องใช้ต้นทุนสูง เป็นต้น

บทที่ 2

การตรวจเอกสารทางวิชาการ

ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*)



ภาพที่ 1.1 ปลาบึก

การศึกษาด้านอนุกรมวิธานได้ยึดเอาการจำแนกชนิดของ Nelson (1994) มาเป็นหลักการลำดับชั้นของปลาบึก และได้เอาการจำแนกของ Chevey (1930) ในการจำแนกชนิดของปลาบึก ดังนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Siluriformes
Family	Pangasiidae
Genus	<i>Pangasianodon</i>
Species	<i>Pangasianodon gigas</i>

ปลาบึก (Mekong giant catfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pangasianodon gigas* (ภาพที่ 1.1) เป็นปลาน้ำจืดขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง ไม่มีเกล็ด อาศัยอยู่ในแม่น้ำโขงตั้งแต่ประเทศจีน, ลาว, เมียนมาร์ และไทย เรื่อยมาตลอดความยาวของแม่น้ำรวมไปถึงสาขาต่าง ๆ เช่น แม่น้ำจิม, แม่น้ำมูล และแม่น้ำสงคราม แต่ไม่พบในตอนปลายของแม่น้ำโขงที่เป็นน้ำกร่อย ซึ่งเป็นจุดที่ไหลออกทะเลจีนใต้ ปลาบึกเป็นปลาที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์

เนื่องจากมีการจับปลามากเกินไป คุณภาพน้ำที่แย่ลงจากการพัฒนาและการสร้างเขื่อนบริเวณต้นน้ำ ปัจจุบัน สหภาพระหว่างประเทศเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติจัดปลาบึกให้อยู่ในกลุ่มเสี่ยงขั้นวิกฤติต่อการสูญพันธุ์ (Critically endangered) และติดอยู่ในบัญชีไซเตส กลุ่ม 1 ชนิดสัตว์ป่าและซากของสัตว์ป่าท้ายบัญชีอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่า และพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ (ลำดับที่ 909)

ลักษณะทั่วไปของปลาปลาบึกเป็นปลาไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดโตเต็มที่ยาวประมาณ 3 เมตร มีน้ำหนักมากกว่า 250 กิโลกรัม เป็นปลาที่กินพืชเป็นอาหาร ไม่มีฟันทั้งที่ขากรรไกรและเพดานปาก มีรูปร่างเพรียวขาวแบนข้างเล็กน้อย ลูกปลาบึกขนาดเล็กมีสีคล้ำเหลือง ข้างลำตัวมีแถบสีคล้ำตามยาว 1 – 2 แถบ ครีบหางตอนบนและล่างมีแถบสีคล้ำตามยาว ในปลาขนาดใหญ่ด้านหลังของลำตัวจะมีสีเทาอมน้ำตาลแดง ด้านข้างเป็นสีเทาปนน้ำเงินและจางกว่าด้านหลัง เมื่อก่อนลงมาทางท้องสีจะจางลงเรื่อย ๆ จนเป็นสีขาวเงิน ตามลำตัวมีจุดสีดำค่อนข้างกลมกระจายอยู่ห่าง ๆ กันเกือบทั่วตัว บริเวณจงอยปากมีจุดกลม 2 คู่ ตั้งอยู่บนริมฝีปากทางด้านข้างจงอยปาก คู่หน้าอยู่ชิดกันมากกว่าคู่หลัง นัยตาของปลาบึกมีขนาดเล็กอยู่เป็นอิสระไม่ติดกับขอบตามีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 ใน 20 เท่า ของความยาวหัว ตำแหน่งของนัยตาคู่หน้าต่ำกว่าระดับมุมปาก ลูกตามีหนังบาง ๆ คลุมด้านขอบเล็กน้อยเปิดเป็นช่องรูปกลมที่กึ่งกลางกะโหลกมีจุดสีขาวขนาดเดียวกับตา 1 จุด ครีบหลัง มีสีเทาปนดำ จุดเริ่มต้นของครีบหลังอยู่ล้ำหน้าจุดเริ่มต้นของครีบท้อง แต่ไม่ถึงกึ่งกลางของลำตัว ก้านครีบแข็งเป็นเงี่ยงแต่สั้นและทู่ลงเมื่อมีขนาดใหญ่ขึ้น ครีบอก มีสีเทาปนดำอยู่ค่อนข้างต่ำ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งใหญ่ 1 อัน ซึ่งปลายโค้งงอได้ไม่แข็งเป็นเงี่ยง หรือหยักเป็นฟันเลื่อย ก้านครีบอ่อนมีจำนวน 10 อัน ความยาวครีบอกมีขนาดเท่าหรือเกือบเท่ากับความยาวครีบหลัง คือมีความยาวครึ่งหนึ่งของหัว ครีบท้อง มีสีเทาอ่อน มีก้านครีบโค้งงอได้ 1 อัน มีก้านครีบอ่อนจำนวน 7 อัน ครีบกัน มีสีเทาอ่อน มีก้านครีบแข็งที่โค้งงอได้ 5 อัน ก้านครีบอ่อน 29 – 32 อัน ครีบไขมัน มีสีเทาปนดำ มีขนาดเล็กอยู่ค่อนข้างต่ำทางครีบหาง ครีบหาง มีสีเทาปนดำ ขนาดอ่อนข้างสั้นเว้าลึก ส่วนของแพนหางบนและล่างมีขนาดเท่ากัน

ถิ่นที่อยู่อาศัยปลาบึกชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีระดับน้ำลึกกว่าสิบเมตร พื้นท้องน้ำเต็มไปด้วยก้อนหินและโขดหินสลับซับซ้อนกัน ยังมีถ้าได้น้ำด้วยแล้วปลาบึกจะชอบมากที่สุด ปลาบึกขนาดใหญ่อาศัยอยู่ในระดับน้ำที่ลึกและอาศัยถ้าได้น้ำเป็นที่หลบซ่อนตัว นอกจากนี้ยังได้ตะไคร่น้ำที่ขึ้นตามโขดหินกินเป็นอาหาร ปลาบึกมีเฉพาะในแม่น้ำโขงเพียงแห่งเดียวเท่านั้น แม้ว่าบางครั้งอาจจับปลาบึกได้จากแม่น้ำสายใหญ่ ๆ ที่เป็นสาขาของแม่น้ำโขง เช่น แม่น้ำสงคราม จังหวัดนครพนม แม่น้ำมูล จังหวัดอุบลราชธานี แม่น้ำจิม แขวงนครเวียงจันทน์ ประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เป็นต้น ปลาบึกอาศัยในแม่น้ำโขงตั้งแต่ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนลงมาจนถึงประเทศเมียนมาร์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ประเทศไทย สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนกัมพูชา และสาธารณรัฐเวียดนามตอนใต้ แต่ไม่เคยปรากฏว่าพบในบริเวณน้ำกร่อยหรือบริเวณปากแม่น้ำโขงที่ไหลออกสู่ทะเลจีนใต้

ประเทศไทยพบว่าปลาน้ำจืดอาศัยอยู่ในแม่น้ำโขงบริเวณที่กั้นพรมแดนไทยโดยตลอด คือนับตั้งแต่อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย ลงไปจนถึงอำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี แหล่งที่พบปลาน้ำจืดอาศัยอยู่ชุกชุมมากที่สุดอยู่ในเขตท้องที่จังหวัดหนองคาย โดยเฉพาะวังปลาน้ำจืดหรืออ่างปลาน้ำจืดบ้านผาตั้ง อำเภอศรีเชียงใหม่ ซึ่งเป็นถิ่นที่อยู่ของปลาน้ำจืดมาตั้งแต่ในสมัยเมื่อ 40 ปีก่อน เฉพาะวังปลาน้ำจืดเคยจับปลาน้ำจืดได้ไม่ต่ำกว่าปีละ 40 – 50 ตัว ส่วนปลาน้ำจืดที่จับได้ที่จังหวัดเชียงราย ชาวประมงเชื่อว่าเป็นปลาที่อพยพย้ายถิ่นมาจากวังปลาน้ำจืดที่หลวงพระบาง

จากรายละเอียดที่กล่าวมาในข้างต้นปลาน้ำจืดเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่และใช้ระยะเวลาในการเป็นพ่อแม่พันธุ์และไม่สามารถผสมพันธุ์เองได้ตามธรรมชาตินักวิจัยจึงเลือกใช้ปลาน้ำจืดเป็นปลาผู้ให้ (Donor fish) ในการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในครั้งนี้

ปลาสาวย (*Pangasianodon hypophthalmus*)



ภาพที่ 1.2 ปลาสาวย

การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน (Sauvage, 1878) ดังนี้

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Siluriformes
Family	Pangasiidae
Genus	<i>Pangasianodon</i>
Species	<i>P. hypophthalmus</i>

ปลาสาวย (Striped catfish) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pangasianodon hypophthalmus* (ภาพที่ 1.2) เป็นปลาน้ำจืดประเภทที่ไม่มีเกล็ดเช่นเดียวกับ ปลาเทโพ ปลาเทพา และปลาสังกะวาด ซึ่งสามารถพบได้ในแถบประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา เวียดนาม และประเทศไทย (ไทยเกษตรศาสตร์, 2013) ปลาสาวยมีรูปร่างค่อนข้างเรียวยาว หัวค่อนข้างกว้าง แต่ ไม่แบนมากนัก ปากอยู่ต่ำมีลักษณะกว้างทุ่ มีตาขนาดเล็ก มีหนวด 2 คู่ คือ หนวดขากรรไกรบน 1 คู่ และหนวดขากรรไกรล่าง 1 คู่ ซึ่งหนวดคู่แรกมีความยาวกว่าหนวดคู่ที่ 2 เส้นข้างลำตัวมีลักษณะเป็นเส้นสมบูรณ์ สัดส่วนของลำตัวที่สำคัญๆ คือ ความยาวสุดของลำตัวประมาณ 4 เท่าครึ่ง ของความยาวส่วนหัว ส่วนความยาวมาตรฐานลำตัวยาวประมาณเกือบ 4 เท่าครึ่งของความกว้างลำตัว ครีบหลังมีก้านแข็ง 1 ก้าน มีลักษณะฟันเลื่อย และมีก้านแขนง 6 ก้าน มีครีบไขมันขนาดเล็กอยู่ระหว่างครีบหลังและครีบหาง ครีบกันมีก้านแข็ง 4 ก้าน และก้านแขนง 30 - 32 ก้าน ครีบหูมีก้านแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 6 ก้าน ลักษณะภายในที่สำคัญ มีซี่เหงือก 20 ซี่ มีฟันซี่เล็กๆ เรียงเป็นแถวบนขากรรไกรบนทั้ง 2 คู่ มีฟันบนเพดานเรียงเป็น 2 แถว ปลาสาวยที่โตเต็มวัยจะมีลำตัวเป็นสีเทาดำบริเวณด้านหลังและมีสีขาวบริเวณตั้งแต่ด้านข้างของลำตัว จากส่วนหน้า ถึง โคนหางขนานไปกับเส้นข้างตัวทั้งด้านบนและด้านล่างทำให้ดูสวยงามมาก (กรมประมง, 2549)

การแบ่งเพศปลาสาวย ความแตกต่างระหว่างเพศเมียและเพศผู้ของปลาสาวยนั้นในตอนเป็นปลาวัยอ่อนจนถึงยังไม่โตเต็มวัยจะสังเกตได้ยาก แต่พอถึงฤดูผสมพันธุ์ปลาเพศเมียและเพศผู้จะสามารถแยกออกได้ชัดเจนจากลักษณะภายนอก ลักษณะของปลาเพศเมีย ส่วนท้องพองป่อง กลมมนูน พื้นที่ของท้องนูนถึงนูนมาก ลักษณะของช่องเพศเป็นรูปร่างใหญ่กว้างกว่าตัวผู้ และช่องเพศยังปวมพองเป่ง และมีสีแดงเข้ม และในกรณีที่ปลาเพศเมียพร้อมมากๆ จะเห็นไข่สีเหลืองไหลออกมาจากช่องเพศ และเมื่อจับ โคนหางงอพับไข่ที่สุกแล้วจะไหลออกมาพร้อมให้ผสม และลักษณะของปลาเพศผู้ ส่วนท้องเรียบและไม่พองนูนเหมือนปลาตัวเมีย พื้นที่ท้องแข็ง ช่องเพศเป็นรูปร่างรีเช่นเดียวกับตัวเมียแต่แคบและเล็กเรียกว่า มีสีแดงอ่อน ซึ่งปลาตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์พร้อมแล้วนั้น เมื่อใช้มือบีบบริเวณช่องเพศเบา ๆ จะเห็นน้ำเชื้อสีขาวข้นไหลออกมา

ในปัจจุบัน ปลาในกลุ่ม Pangasiidae ได้มีรายงานว่าสูญพันธุ์ไปแล้ว 1 สกุล คือ *Cetopangasius* (*Cetopangasius chaetobranchus*) (Roberts and Jumnonhthai, 1999) และในสกุล *Pangasius* อีก 1 ชนิด คือ *Pangasius indicus* (Marck, 1876) และยังมีปลาในกลุ่มนี้อีกหลากหลายชนิดที่ขึ้นบัญชีเป็นปลาใกล้สูญพันธุ์ของ IUCN Red List of Threatened Species (IUCN Red List หรือ Red Data List) ได้แก่ ปลาบึก (Mekong Giant Catfish; *Pangasianodon gigas*) และ ปลาเทพา (Chao phraya giant catfish; *Pangasius sanitwongsei*) เป็นต้น (IUCN, 2017) และปลาในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปลาสาวย ที่คนในประเทศนิยมบริโภคและรู้จักกันเป็นอย่างดี และนอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อปลาในวงศ์ปลาสาวยมีโอเมก้า 3 เทียบเท่ากับปลา

ทะเลบางชนิด และมีปริมาณสูงถึง 2,570 มิลลิกรัม (milligram; mg) ต่อน้ำหนัก 100 กรัม (gram; g) (Carl and Ferraris, 2007)

เนื่องจากปลาสวายเป็นปลาที่สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่ายใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโตเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่สั้นและวงจรชีวิตของปลาสวายสามารถเพาะเลี้ยงได้ในฟาร์มและอยู่ในสายพันธุ์เดียวกับปลาบึก ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ปลาสวายเป็นปลาผู้รับสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึกเพื่อเป็นการเก็บรักษาพันธุ์ปลาบึกที่ดีและช่วยลดระยะเวลาในการเจริญพันธุ์ของปลาบึกได้

การโคลนยีน

การโคลนยีนเครื่องหมายซึ่งมีความจำเพาะต่อการแสดงออกของเซลล์ในระยะต่าง ๆ ในระบบสืบพันธุ์ เป็นข้อมูลที่สำคัญในการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา การศึกษาอื่นที่มีการแสดงออกที่จำเพาะเจาะจงในเซลล์สืบพันธุ์ในปลา มีหลายยีน ได้แก่ *vasa*, *nanos*, *dazl*, *deadend*, และ *cxcr4b* ซึ่งยีนเหล่านี้ถือเป็นยีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นยีนเครื่องหมาย (RAZ, 2004) การศึกษาส่วนใหญ่นิยมใช้ยีน *vasa* เป็นยีนเครื่องหมาย ในการจำแนกเซลล์ระยะต่าง ๆ ในระบบสืบพันธุ์ ยกตัวอย่างเช่น การจำแนก Primordial germ cell ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ในสิ่งมีชีวิต และใช้ในการจำแนกเซลล์ Primordial germ cell ในระหว่างกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ไปยังบริเวณ Genital ridge โดยใช้ยีนเครื่องหมายร่วมกับการศึกษาเนื้อเยื่อ เพื่อใช้ในการติดตามการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของตัวอ่อนปลา เช่น มีการรายงานการใช้ยีน *vasa* ในการจำแนก Primordial germ cell ในตัวอ่อนปลา และใช้ในการจำแนก Spermatogonia และ Oogonia ในระบบสืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ (Braat et al., 1999; Yoshizaki et al., 2002; Ubed-Manzanaro et al., 2014) และรายงานการศึกษาในแมลงหวี่, ปลาฆ่าลาย, ปลาเมดากะ, ปลาเรนโบว์เทรา และปลา Brown-marble grouper โดยการศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของยีน *vasa* และนำมาใช้ในการระบุตำแหน่งเพื่อจำแนกและติดตามการเคลื่อนย้ายของ Primordial germ cell (Fujiwara et al., 1994; Braat et al., 1999; Shinomiya et al., 2000; Yoshizaki et al., 2000; Ubed-Manzanaro et al., 2014; Boonanuntasarn et al., 2016)

ยีน *vasa* (มีอีกชื่อหนึ่งว่า *Ddx4*) จัดอยู่ในยีนกลุ่ม DEAD-box (Asp-Glu-Ala-Asp) protein family of ATP-dependent RNA helicase ได้ถูกค้นพบครั้งแรกในแมลงหวี่ (Schupbach and Wieschaus, 1986; Hay et al., 1988) มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ DNA splicing, RNA editing, rRNA processing, translation initiation, nuclear RNA export และ mRNA degradation ยีน *vasa* มีการศึกษาอย่างแพร่หลายทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังและในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เนื่องจาก ยีน *vasa* มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์สืบพันธุ์

เป็นยีนที่มีการแสดงออกที่อวัยวะสืบพันธุ์ และไม่แสดงออกหรือมีการแสดงออกน้อยมากที่เซลล์ชนิดอื่น ๆ ยีน *vasa* จึงถูกนำไปพัฒนาในการใช้เป็นยีนเครื่องหมาย (Gene marker) ในการติดตามและจำแนกการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ ยีน *vasa* จัดอยู่ในกลุ่มของยีน DEAD box family protein of ATP-dependent RNA helicase พบครั้งแรกในแมลงหวี่ (Hay et al., 1988; Schupbach and Wieschaus, 1986; Liang et al., 1994) ต่อมา มีการศึกษาและโคลนยีน *vasa* ในสัตว์หลายชนิดรวมทั้งในปลา และได้มีการพัฒนาใช้ยีน *vasa* เป็นยีนเครื่องหมายในการติดตาม และศึกษาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ต่าง ๆ รวมทั้งในปลา

การศึกษา ยีน *vasa* ในปลานิลพบว่ามียีน *vasa* 2 isoform ได้แก่ ยีน *vas-s* และยีน *vas* โดยที่ยีน *vas-s* จะมีส่วนของยีนบางส่วนที่บริเวณ N-terminal ลดหายไป ยีน *vasa* ทั้ง 2 isoforms มีการแสดงออกในรังไข่และอัมชะ และพบการแสดงออกที่ Primordial germ cell และมีรายงานว่ายีน *vasa* ทั้ง 2 isoforms มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันขึ้นกับระยะการพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ (Kobayashi et al., 2002) การศึกษาในปลา *Solea senegalensis* พบการแสดงออกของยีน *vasa* 4 isoforms ได้แก่ ยีน *Svasa1*, ยีน *Svasa2*, ยีน *Svasa3* และ ยีน *Svasa4* โดยพบว่ายีน *vasa* ทั้ง 4 isoforms แสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ และ ยีน *Svasa3* และ ยีน *Svasa4* จะแสดงออกเฉพาะในรังไข่ (Pacchiarini et al., 2013) รายงานการศึกษาในปลา Half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*) พบว่ายีน *vasa* มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ โดยในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนปลา ยีน *vasa* จะแสดงออกมากขึ้นในระยะที่ Primordial germ cell มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อปลาเจริญเติบโตขึ้นยีน *vasa* มีระดับการแสดงออกลดลง นอกจากนี้เมื่อนำส่วนของอาร์เอ็นเอในส่วนของ 3'-untranslated region ของยีน *vasa* มาต่อเชื่อมกับอาร์เอ็นเอของยีนเรืองแสงสีเขียว แล้วฉีดเข้าสู่ลูกปลาวัยอ่อน จะทำให้เห็น Primordial germ cell เป็นสีเขียวได้ ผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *vasa* สามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการนำไปใช้ในการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ของปลาชนิดนี้ (Huang et al., 2014) การศึกษาในปลา European sea bass พบว่ายีน *vasa* มีการแสดงออกสูงในไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม (Unfertilized eggs) และจะมีระดับการแสดงออกลดลงในระหว่างการพัฒนาการของตัวอ่อนปลา และพบว่ายีน *vasa* มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นอีกครั้งในกระบวนการที่ Primordial germ cell มีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการแสดงออกของยีน *vasa* (Blazquez et al., 2011)

ยีน *vasa* มีการแสดงออกในเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ตั้งแต่ Metazoan ไฮดรา จนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Raz, 2000) และการแสดงออกของยีน *vasa* จัดเป็น Maternal expression gene เนื่องจากพบการแสดงออกของ mRNA ของยีนชนิดนี้ตั้งแต่ช่วงการพัฒนาของเอ็มบริโอ (Yoshizaki et al., 2000) ซึ่งยีน *vasa* มีบทบาทหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของ PGC (Primordial germ cell formation) และการเปลี่ยนแปลงลักษณะเฉพาะของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อทำหน้าที่เฉพาะอย่าง (Germ cell differentiation) (Hay et al., 1988; Liu et al., 2009) รายงานการศึกษาในหนูพบว่ายีน *vasa* ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนเซลล์

สืบพันธุ์ และ Germ cell differentiation ในหนูเพศผู้ (Tanaka et al., 2000) รายงานในปลาข้าวสารญี่ปุ่น (Japanese rice fish) พบว่ายีน *vasa* ไม่ได้มีบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการเพิ่มจำนวนของ PGC ในปลาชนิดนี้ แต่มีบทบาทสำคัญในการเคลื่อนที่ของ PGC (Li et al., 2010) ดังนั้นบทบาทหน้าที่ของยีน *vasa* ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ ได้มีรายงานการศึกษาที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด แต่รายงานการศึกษายีน *vasa* ในสัตว์ต่าง ๆ พบว่ายีน *vasa* มีการแสดงออกอย่างจำเพาะเจาะจงในอวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้น การศึกษาในปลาพบรายงานการแสดงออกของยีนชนิดนี้อย่างจำเพาะเจาะจงต่ออวัยวะสืบพันธุ์ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาเรนโบว์เทร้า (Yoshizaki et al., 2000) ปลาเมดากะ (Shinomiya et al., 2000) ปลานิล (Kobayashi et al., 2002) ปลา Gibel carp (Xu et al., 2005) ปลาไหล (Ye et al., 2007) ปลา Pacific Bluefin tuna (Nagasawa et al., 2009) ปลาไน (Li et al., 2010) ปลาชุก (Raghuveer et al., 2010) ปลา European sea bass (Blazquez et al., 2011) ปลา Rare minnow (Cao et al., 2012) ปลา *Solea senegalensis* (Pacchiarini et al., 2013) ปลา Toadfish (Ubeda-Manzanaro et al., 2014) ปลาฟลาวเดอร์ญี่ปุ่น (Wu et al., 2014) ปลา Half-smooth tongue sole (Huang et al., 2014) และการศึกษาในสัตว์อื่น ๆ ได้แก่ ในแมลงหวี่ (Hay et al., 1988) คน (Fujiwara et al., 1994) ก็พบผลไปในทางเดียวกันคือ ยีน *vasa* จะแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้น

ได้มีรายงานการศึกษานำยีน *vasa* มาประยุกต์ใช้ในด้านชีววิทยาและเทคโนโลยีทางด้านเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ในงานของ Yoshizaki และคณะ (2000) ได้รายงานการศึกษาโดยใช้เทคนิค Whole mount *in situ* hybridization จะทำให้สามารถบ่งชี้ Primordial germ cell ของลูกปลาได้ และได้สร้างปลาเรนโบว์เทร้าตัดแปลงพันธุกรรม (Genetically modified fish) โดยตัดต่อยีนเรืองแสงสีเขียว (Green fluorescent protein; GFP) เข้ากับโปรโมเตอร์ของยีน *vasa* (*vasa-GFP*) เนื่องจากยีน *vasa* จะแสดงออกเฉพาะที่บริเวณเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นปลาเรนโบว์เทร้าตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับยีน *vasa-GFP* จึงมีการแสดงออกของยีนเรืองแสงสีเขียวที่ Primordial germ cell และรายงานการศึกษานำยีน *vasa* ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาการเคลื่อนตัวของเซลล์ Primordial germ cell ในปลาม้าลายอีกด้วย (Krovel and Olsen, 2014)

การจำแนกเซลล์สืบพันธุ์นิยมใช้เทคนิคการศึกษานี้อีกเพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ เช่น Primordial germ cell จะเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และมีนิวเคลียสใหญ่ จึงทำให้มีสัดส่วนนิวเคลียสต่อไซโตพลาสซึมน้อย (Nucleocytoplasmic) สามารถสังเกตเห็นเซลล์และนิวเคลียสได้ชัดเจน (van Winkoop et al. 1992; Patino and Takashima 1995) ซึ่งการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นของการพัฒนาการทำได้ยากต้องใช้ความชำนาญ การใช้ยีนเครื่องหมายเข้ามาช่วยในการศึกษาร่วมกับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อจึงช่วยให้สามารถจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ได้แม่นยำยิ่งขึ้น โดยยีน *vasa* เป็นยีนที่มีความนิยมนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการศึกษาจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นในการพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Nagasawa et al., 2009; Boonanuntasarn et al., 2016) จึงได้มีการโคลนและการศึกษาคุณลักษณะของยีน *vasa* เพื่อนำมาประยุกต์ใช้

เป็นยีนเครื่องหมาย เนื่องจากเทคนิคการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งในปลาผู้รับ (Recipient) และปลาผู้ให้ (Donor) เป็นเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ การใช้ยีนเครื่องหมาย (Gene marker) เพื่อจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ จะทำให้การจำแนกเซลล์สืบพันธุ์มีความแม่นยำสูง การจำแนกเซลล์สืบพันธุ์เป็นเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับปลาผู้ให้และปลาผู้รับ ในปลาผู้ให้ (Donor fish) การใช้ยีนเครื่องหมายเพื่อจำแนกระยะการพัฒนากาของชนิดเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ เซลล์ Oogonia และ Spermatogonia เพื่อหาระยะของปลาผู้ให้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บตัวอย่างไข่ หรือ อัมตะที่มีสัดส่วนของ เซลล์ Oogonia และ Spermatogonia สูง เพื่อให้ประสิทธิภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์สูงขึ้นเช่นเดียวกัน

สำหรับในปลาผู้รับ (Recipient fish) ต้องมีการศึกษาระยะการพัฒนากาของปลาวัยอ่อน ซึ่งต้องใช้ยีนเครื่องหมายในการนำมาใช้จำแนกเซลล์ต้นตอของเซลล์สืบพันธุ์ Primordial germ cell เพื่อศึกษาระยะการพัฒนากาของปลาวัยอ่อน โดยเฉพาะระยะพัฒนากาที่ Primordial germ cell กำลังเคลื่อนตัวเข้ามาที่บริเวณ Genital ridge ของปลาวัยอ่อน เพื่อหาระยะการพัฒนากาที่เหมาะสมสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ได้มีการศึกษาการใช้ยีนเครื่องหมายในการศึกษาการพัฒนากาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาสาวยวัยอ่อน เพื่อใช้เป็นปลาผู้รับ โดยการโคลนยีน *vasa* และใช้ยีน *vasa* ในการสร้างโพรบ Antisense เพื่อทำการวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อวิทยา และ in situ hybridization เพื่อศึกษาการเคลื่อนตัวของเซลล์ Primordial germ cell ในปลาสาวยวัยอ่อน และใช้ในการศึกษาระยะที่เหมาะสมในการใช้ปลาสาวยเป็นปลาผู้รับในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ และผลการศึกษาพบว่า กระบวนการเคลื่อนย้ายของเซลล์ต้นกำเนิด Primordial germ cell เกิดขึ้นในปลาวัยอ่อนที่อายุ 2 - 10 วันนับจากวันหลังผสม (days post fertilization; dpf) และในลูกปลาที่อายุ 10 - 20 วันนับจากวันหลังผสม พบว่า Primordial germ cell ในอวัยวะสืบพันธุ์เริ่มมีเซลล์โซมาติก (Somatic cell) มาเจริญล้อมรอบ และกระบวนการการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนของ Primordial germ cell เริ่มเกิดขึ้นในปลาอายุ 30 วันนับจากวันหลังผสม ดังนั้นระยะที่เหมาะสมสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาสาวยอยู่ในช่วง 2 - 10 วันนับจากวันหลังผสม (Duangkaew et al., 2019)

การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation)

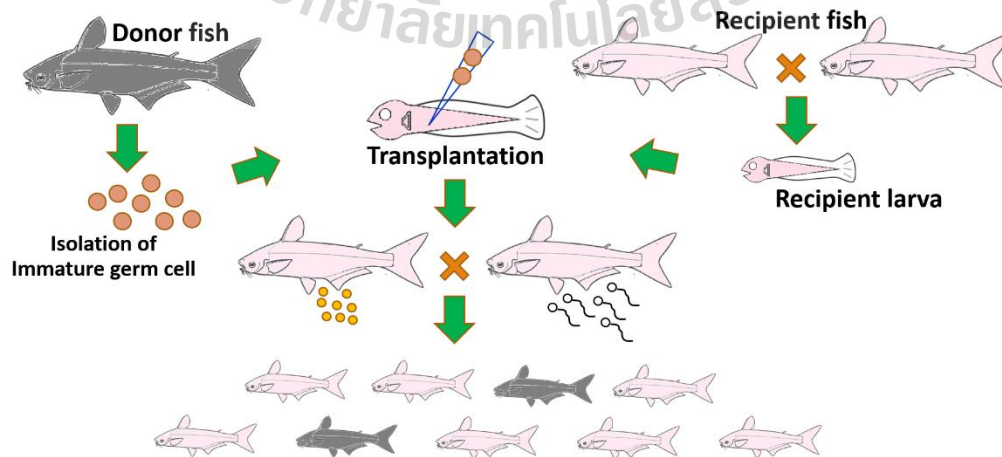
สิ่งมีชีวิตที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นประกอบไปด้วยเซลล์พื้นฐาน 2 ชนิด คือ เซลล์ร่างกาย (Somatic cells) และเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cells) (Lacerda et al., 2013) ซึ่ง Primordial germ cells (PGCs) หรือเซลล์ตั้งต้นก่อนการพัฒนากาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นบริเวณใดบริเวณหนึ่งของตัวอ่อน (Embryo) และเมื่อตัวอ่อนมีการเจริญเติบโต PGCs จะเคลื่อนที่ (Migration) ไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ที่ยังไม่พัฒนากา (Genital ridges) แล้วมีการพัฒนากาไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ (Mature germ cells) ซึ่งถ้าเป็นเพศผู้จะพัฒนากาไปเป็นอสุจิ (Sperm)

และเพศเมียจะพัฒนาไปเป็นไข่ (Egg) ดังนั้นการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantaion) เป็นวิธีการปลูกถ่ายเซลล์จากปลาชนิดหนึ่งไปยังปลาอีกชนิดหนึ่งที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน โดยการใช้ PGCs ของปลาผู้ให้ (Donor fish) ปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับ (Recipient fish) โดยมีการคัดเลือก PGCs จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ทำการปลูกถ่ายเข้าสู่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Peritoneal cavities) ของปลาผู้รับ ซึ่งเรียกเทคนิคนี้ว่า การผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอุ้มบุญ (Surrogate broodstock) เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์มีการนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านชีววิทยา และด้านการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์รวมไปถึงการศึกษาด้านกระบวนการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ จึงมีการนำเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ มาเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์ปลา และยังสามารถช่วยลดความเสี่ยงให้ปลาบางชนิดที่ใกล้สูญพันธุ์ได้โดยการสร้างปลาพ่อแม่พันธุ์อุ้มบุญ โดยการศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้นเริ่มต้นทำครั้งแรกในไก่ โดยใช้ PGCs ที่เป็นเซลล์ Spermatogonia ฝากเข้าไปในตัวอ่อนของไก่พบว่าไก่ตัวดังกล่าวเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์แล้วสามารถผลิตลูกออกมาเป็นไก่ตัวผู้ (Tajima et al., 1993) และต่อมาได้มีการศึกษาในหนู โดยใช้เซลล์ Spermatogonia มาทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Brinster and Zimmermann, 1994) และได้มีการพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ มาใช้กับสัตว์ในกลุ่ม Lower Vertebrate โดยการใช้ทั้ง PGCs และ เซลล์ Spermatogonia ของปลาในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ อีกทั้งยังมีการศึกษาในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยใช้เซลล์ Spermatogonia ของสัตว์ผู้ให้ (Donor animal) ปลูกถ่ายเข้าไปในท่อสร้างตัวอสุจิ (Seminiferous tubules) ที่อยู่ในอัณฑะ (Testis) ของสัตว์ผู้รับ (Recipient animal) ที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งพบว่าเซลล์ Spermatogonia ของสัตว์ผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยและมีการแบ่งเซลล์ในตัวของผู้รับได้ (Brinster and Zimmermann, 1994) ซึ่งจากการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นนี้มีความแตกต่างกับกระบวนการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาที่เซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้ นั้นจะถูกปลูกถ่ายเข้าไปในช่องว่างกลางลำตัวของลูกปลาผู้รับวัยอ่อน โดยที่เซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้มีการเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ และเซลล์สืบพันธุ์มีการเข้าอาศัย (Colonization) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับตามลำดับ ซึ่งในบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ ของปลาผู้รับที่เป็นระยะปลาวัยอ่อนนั้นระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้นเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้จึงสามารถเข้าไปมีชีวิตอยู่ได้ในปลาผู้รับวัยอ่อนและสามารถมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ได้ขึ้นอยู่กับเพศของปลาผู้รับ (Okutsu et al., 2006)

เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ณ ปัจจุบันมีการพัฒนาอยู่หลายประเทศทั่วโลก เทคโนโลยีนี้ได้พัฒนาในปลา Rainbow trout (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010) จนใช้เป็นตัวแบบสำหรับการฝึกฝนและการพัฒนาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาอื่น ๆ ได้แก่ ปลา Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*) (Takeuchi et al., 2009) และปลา Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) (Morita et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีการวิจัยเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่ระยะเวลาที่ปลาจะเจริญเติบโตจนถึงระยะสืบพันธุ์ได้ใช้เวลานานมาก และมีข้อจำกัดในการเพาะพันธุ์ปลา เช่น ในปลาสเตอร์เจียน

(Sturgeon) ซึ่งเป็นพันธุ์ปลาที่ใช้ในการผลิตไข่ปลาคาร์เวีย โดยทั่วไปปลาปลาสเตอร์เจียนโตจนถึงระยะโตเต็มวัยใช้เวลานาน เช่น ปลาสเตอร์เจียน ชนิด Beluga (*Huso huso*) เพศผู้ใช้เวลา 10 - 16 ปี จึงจะสมบูรณ์พันธุ์ และปลาสเตอร์เจียนเพศเมียใช้เวลา 14 - 20 ปีจึงจะสมบูรณ์พันธุ์ ดังนั้นนักวิจัยอาหารจึงกำลังพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาชนิดนี้ เพื่อมุ่งหวังหาปลาพันธุ์อื่น ๆ ที่สามารถสมบูรณ์พันธุ์ในระยะเวลาอันสั้นกว่า เป็นพ่อแม่ปลาอ้อมบุญสำหรับปลาสเตอร์เจียนดังกล่าว ประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงปลาที่สำคัญประเทศหนึ่งของโลก การศึกษาวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงปลา โดยเฉพาะด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการสืบพันธุ์ปลายังมีอยู่น้อย จึงควรมีการสนับสนุนการวิจัยนี้ เพื่อเป็นการพัฒนาเทคโนโลยีในระยะยาวต่อไป

เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา ในช่วงระยะเริ่มต้นของอวัยวะสืบพันธุ์จะถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ร่างกาย และเซลล์ต้นกำเนิด (PGCs) ที่มีการพัฒนาขึ้นนอกอวัยวะสืบพันธุ์ต่อมา PGCs จะเคลื่อนที่โดยเท้าเทียม (Pseudopodia) ด้วยกระบวนการ Chemotaxis เพื่อเข้าไปสู่อวัยวะสืบพันธุ์ (Raz, 2004) และหลังจากที่ PGCs เคลื่อนที่เข้าไปสู่อวัยวะสืบพันธุ์แล้วนั้นจะถูกเซลล์ร่างกายเข้ามาล้อมรอบ PGCs และเริ่มทำการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวน (Yoshizaki et al., 2002) เทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เป็นการนำ PGCs ของปลาผู้ให้ปลูกถ่ายเข้าไปในช่องท้อง ของปลาผู้รับวัยอ่อนต่อมา PGCs ของปลาผู้ให้จะเคลื่อนที่ และเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ จากนั้นเมื่อ PGCs ของปลาผู้ให้เข้ามาอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์แล้ว เซลล์ร่างกายของปลาผู้รับจะเข้ามาจับล้อมรอบแล้วทำการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน PGCs ของปลาผู้ให้ทำให้ PGCs มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ขึ้นอยู่กับเพศของปลาผู้รับ โดยทั่วไปแล้วการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาที่มีสายพันธุ์หรือชนิดที่ใกล้เคียงกันจะมีโอกาสประสบความสำเร็จสูง และเมื่อปลาผู้รับสามารถผลิตลูกปลาที่เกิดจากการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ (Donor-derived offspring) ได้ จะเรียกเทคนิคนี้ว่า เทคนิคการผลิตพ่อแม่พันธุ์ปลาอ้อมบุญ (Surrogate broodstock technology) (ภาพที่ 1.3) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้ได้กับปลาหลายชนิดที่มีข้อจำกัดในการเลี้ยงหรือในการผสมเทียม เช่น ปลาที่มีขนาดโตเต็มวัยใหญ่เกินไป หรือปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ เป็นต้น



ภาพที่ 1.3 แผนภาพการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา

การศึกษาการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปัจจุบัน เช่น การศึกษาโดยใช้เซลล์ Spermatogonia ซึ่งสกัดจากอวัยวะของปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เป็นปลาผู้ให้โดยปลูกถ่ายเข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) วิทยอ่อนพบว่าเซลล์ Spermatogonia สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Kobayashi et al., 2007) ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) อีกเช่นเดียวกันทำการปลูกถ่ายปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่เป็นปลาหมัน (Triploid fish) พบว่าเซลล์ Spermatogonia สามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee et al., 2013) และจากการศึกษาในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) โดยใช้เซลล์ Spermatogonia ปลูกถ่ายเข้าสู่ปลา Manchurian trout (*B. lenok*) วิทยอ่อนเช่นเดียวกัน แต่เป็นปลาที่เป็นหมัน พบว่าเซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee and Yoshizaki, 2016) และในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ของปลาน้ำจืดอย่างปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ที่สกัดได้จากอวัยวะและรังไข่เข้าสู่ปลา Sterlet (*Acipenser ruthenus*) ที่เป็นหมัน พบว่าเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าไปอาศัยอยู่ในปลาผู้รับได้เช่นกัน (Psenicka et al., 2016) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia เข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่เป็นปลาหมันพบว่าเซลล์ Oogonia สามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Lee et al., 2016b) จากตัวอย่างที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาชนิดเดียวกันซึ่งเรียกว่า Allogeneic transplantation และการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาต่างชนิดกันนั้นก็คือ Xenogeneic transplantation การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาต่างชนิดกัน ยกตัวอย่างเช่น การปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ที่สกัดได้จากอวัยวะของปลา Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) ปลูกถ่ายในปลา Nibe croaker (*Nibea mitsukurii*) วิทยอ่อน พบว่าเซลล์ของปลาผู้ให้สามารถเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Higuchi et al., 2011) และในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia เข้าสู่ปลา Masu salmon (*Oncorhynchus mason*) พบว่าเซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้ (Yoshizaki et al., 2011 และ Lee et al., 2016a) ตามลำดับ และการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia ของปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) เข้าสู่ปลา Grass puffer (*Takifugu alboplumbeus*) วิทยอ่อนพบว่าเซลล์ Spermatogonia ของปลาผู้ให้สามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้เช่นกัน (Yoshokawa et al., 2018) (ตารางที่ 1.1)

ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระยะของปลาบึกที่เหมาะสมสำหรับเป็นปลาผู้ให้ และระยะของปลาสาวที่เหมาะสมสำหรับการเป็นปลาผู้รับ รวมถึงวิธีการสกัดเซลล์ Spermatogonia และเซลล์ Oogonia จากอวัยวะและรังไข่ของปลาบึกผู้ให้ จากนั้นนำเซลล์ที่สกัดได้มาทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ปลาผู้รับวิทยอ่อน

และขั้นตอนสุดท้ายคือทำการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ว่าสามารถเข้าอาศัยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับได้หรือไม่

ตารางที่ 1.1 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

Species fish		Type of cell	Colonization (%)	Reference
Donor	Recipient			
Yellowtail (<i>S. quinquerediata</i>)	Nibe croaker (<i>N. mitsukurii</i>)	Spermatogonia	63	Higuchi et al. (2011)
Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Newly hatched (32 - 34 dpf) of Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Spermatogonia	12.5 ± 4.8	Kobayashi et al. (2007)
Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Triploid hatchling of Masu salmon (<i>O. mason</i>)	Spermatogonia	43	Yoshizaki et al. (2011)
Manchurian trout (<i>B. lenok</i>)	Triploid hatchling of Manchurian trout (<i>B. lenok</i>)	Spermatogonia	89.0 ± 5.5	Lee and Yoshizaki. (2016)
Siberian sturgeon (<i>A. baerii</i>)	Triploid hatchling of Sterlet (<i>A. ruthenus</i>)	Spermatogonia	55	Psenicka et al. (2016)
Tiger puffer (<i>T. rubripe</i>)	Diploid and triploid hatchlings of Grass puffer (<i>T. alboplumbeus</i>)	Spermatogonia	39.1 ± 6.6	Yoshikawa et al. (2018)
Siberian sturgeon (<i>A. baerii</i>)	Triploid hatchling of Sterlet (<i>A. ruthenus</i>)	Oogonia	70	Psenicka et al. (2016)
Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Triploid hatchling of Rainbow trout (<i>O. mykiss</i>)	Oogonia	75	Lee et al. (2016b)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยของโครงการนี้ได้ประกอบด้วย การโคลนยีน *vasa* ของปลาบึก และวิเคราะห์ความจำเพาะของการแสดงออกของยีน *vasa* ต่อเซลล์สืบพันธุ์ และใช้ยีน *vasa* เป็นยีนเครื่องหมายในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึก เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์ผู้ให้ในการปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาสายวัยอ่อน (ปลาผู้รับ)

การทดลองที่ 1 การโคลนยีน *vasa* ในปลาบึกและการศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์ และการใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึก

1. ปลาบึกที่ใช้ในการศึกษา

ปลาบึกที่ใช้ในการศึกษานี้ (อายุ 1.5 ปี ขึ้นไป; น้ำหนักตัว 0.3 – 10 กิโลกรัม) เป็นพันธุ์ปลาบึกที่ได้รับจากฟาร์มปลาบึก และนำมาเลี้ยงในบ่อดินขนาด 1 งาน และในกระชัง (7 x 15 x 1.5 ลูกบาศก์เมตร) ในบ่อดิน (10 ไร่) ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยมีการให้อาหารสำเร็จรูปทางการค้าที่ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว (28 % โปรตีน, 4 % ไขมัน) วันละ 2 มื้อ

2. การออกแบบไพรเมอร์ และการโคลน cDNA เส้นสมบูรณ์ของยีน *vasa* ในปลาบึก

2.1 ทำการสืบค้นข้อมูลยีน *vasa* ของปลาต่าง ๆ เพื่อนำมาทำการ Alignment หาส่วนที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน *vasa* มีความคล้ายคลึงกันสูงที่สุด เพื่อใช้บริเวณนั้นในการออกแบบไพรเมอร์ (Degerate primers)

2.2 การสกัด Total RNA จากตัวอย่างอวัยวะของปลาบึก (น้ำหนักตัว 1 - 1.5 กิโลกรัม; อายุ 1.5 ปี; น้ำหนักอวัยวะ 0.32 – 0.7 กรัม; ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic index; GSI) เท่ากับ 0.05 %) โดยใช้สาร Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการย่อยดีเอ็นเอที่อาจเหลืออยู่ด้วย RNase free DNase I (Promega, Madison, WI, USA) ตามวิธีการของบริษัท และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Phenol/Chloroform (1:1) และตกตะกอน RNA ด้วยเอทานอล หลังจากนั้นทำการปั่นแยก

ตะกอนแล้วละลายในน้ำปราศจาก RNase (DEPC water) แล้ววัดค่าความเข้มข้นของ RNA เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ The first-strand cDNA โดยใช้ total RNA ปริมาณ 2 ไมโครกรัมมาแปลงเป็น cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา ImProm- II™ Reverse Transcription System Kit (Promega) ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต

2.3 การโคลน cDNA ของยีน *vasa* ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ cDNA ที่เตรียมจากอัมตะเป็น Template และไพรเมอร์ที่ออกแบบจากข้อที่ 2.1 โคลนยีนด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เตรียมปฏิกิริยาของ PCR ใช้ชุดน้ำยา LA Taq™ (Takara Shuzo, Shiga, Japan) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร นำผลผลิต PCR ที่มีขนาดที่คาดการณ์มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gelpure DNA Purification Kit (GeneMate, Kaysville, UT) และนำชิ้นยีนที่โคลนได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM® T-Easy (Promega Madison WI, USA) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนของ cDNA ที่โคลนได้

2.4 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากข้อ 2.3 มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *vasa* ในปลาบึก (*Phi-vasa*) และทำการโคลน *vasa* cDNA ด้านปลาย 3'RACE โดยวิธีการ nested PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Vasa-F1, Vasa-F2 ร่วมกับ Universal primer (UPM-L, UPM-S) และ *vasa* cDNA ด้านปลาย 5'RACE โดยใช้ไพรเมอร์ Vasa-R1, Vasa-R2 ร่วมกับ Universal primer (UPM-L, UPM-S) (ตารางที่ 2.1) สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR (Vasa-1) (ตารางที่ 2.2) เมื่อได้ผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะเป็ยชิ้นส่วนของยีน *vasa* มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gelpure DNA Purification Kit (GeneMate, Kaysville, UT) และนำชิ้นยีนที่โคลนได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM® T-Easy (Promega Madison WI, USA) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนของ cDNA ที่โคลนได้

2.5 ทำการวิเคราะห์โครงสร้างของยีน *vasa* โดยการเปรียบเทียบกับยีน *vasa* ในปลาชนิดอื่น โดยใช้โปรแกรม ClustalW 2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) การวิเคราะห์แผนภูมิ Phylogenetic ทำโดยวิธีการ Neighbor-joining method (Saito and Nei 1987) โดยการใช้โปรแกรม MEGA5.2 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>)

2.6 ทำการโคลนชิ้นยีนของเบต้าแอกติน (β -actin) โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) ด้วยไพรเมอร์ β -actin-F และ β -actin-R (ตารางที่ 2.1) สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR (β -actin) (ตารางที่ 2.2) ทำการแยกผลผลิต PCR ที่คาดว่าจะเป็ยชิ้นส่วนของยีนเบต้าแอกติน มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Gelpure DNA Purification Kit (GeneMate, Kaysville, UT) และนำชิ้นยีนที่โคลนได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pGEM® T-Easy (Promega Madison WI, USA) และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนของ cDNA ที่โคลนได้

ตารางที่ 2.2 สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction

โปรแกรม PCR	
Vasa-1	<ul style="list-style-type: none"> - 95 องศาเซลเซียส 3 นาที - 35 รอบประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 62 องศาเซลเซียส 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1.5 นาที - 72 องศาเซลเซียส 5 นาที
β -actin	<ul style="list-style-type: none"> - 95 องศาเซลเซียส 3 นาที - 35 รอบประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 62 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที - 72 องศาเซลเซียส 5 นาที
Vasa-RT β -actin-RT	<ul style="list-style-type: none"> - 95 องศาเซลเซียส 3 นาที - 35 รอบประกอบด้วย <ul style="list-style-type: none"> 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 62 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที - 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

3. การวิเคราะห์การแสดงออกของ mRNA ของยีน *Phi-vasa* ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาบึก ด้วยวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR)

นำปลาบึกเพศผู้และปลาบึกเพศเมีย (น้ำหนักตัว 1.38 กิโลกรัม; อายุ 2 ปี; น้ำหนักรังไข่ 2.12 กรัม; ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic index; GSI) เท่ากับ 0.15%) มาทำการเก็บตัวอย่างจากอวัยวะต่าง ๆ ประกอบด้วย หัวใจ (Heart) ตับ (Liver) ไต (Kidney) กระเพาะ (Stomach) ลำไส้ (Intestine) รังไข่ (Ovary) และ อัณฑะ (Testis) และทำการสกัด Total RNA แล้วจึงนำ Total RNA ที่ได้ไปตั้งเครื่อง First stand cDNA ด้วยชุด

น้ำยาสำเร็จรูป ImProm-II™ Reverse Transcription system kit (Promega) โดยใช้ oligodT เป็นไพรเมอร์ ในการศึกษานี้ใช้ β -actin เป็นยีนอ้างอิง (internal reference) ในการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *Pgi-vasa* ในปลาบึก ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ RT-PCR ในยีน *Pgi-vasa* (Vasa-RT-F, Vasa-RT-R) และ ในยีน β -actin (β -actin-F และ β -actin-R) (ตารางที่ 2.1) ชุดสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR คือ ชุดสารละลาย GoTaq® (Promega) และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิต PCR (Vasa-RT และ β -actin-RT) (ตารางที่ 2.2) หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 2 % Agarose gel electrophoresis

4. การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและ in situ hybridization

การเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาบึก ในปลาบึกเพศเมีย (น้ำหนัก 1.4 กิโลกรัม; รั้งไข่น้ำหนัก 2.51 กรัม; ค่า Gonadosomatic index (GSI) เท่ากับ 0.16%) และปลาบึกเพศผู้ (น้ำหนัก 1.86 กิโลกรัม; อายุ 2.4 ปี; อวัยวะสืบพันธุ์น้ำหนัก 3.25 กรัม; ค่า Gonadosomatic index (GSI) เท่ากับ 0.17%) โดยการดองในน้ำยา Bouin เป็นระยะเวลา 6 - 8 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการเปลี่ยนเป็นแช่ใน เอทานอล 75 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส บรรจุลงในกล่องใส่ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทำการดึ่งน้ำออก โดยใช้ Ethyl alcohol จากนั้นใช้ Xylene มาดึงแอลกอฮอล์ออก ทำการแทรกซึมโดยใช้พาราฟิน นำตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ Microtome โดยทำการตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 4 - 6 ไมโครเมตร นำเอา Section มาวางบนกระจกสไลด์

5. การพัฒนาการใช้ยีน *vasa* เป็นยีนเครื่องหมายในการจำแนกเพศปลาสืบพันธุ์ในปลาบึก โดยการใช้เทคนิค in situ hybridization

5.1 การสังเคราะห์ Antisense probe ของยีน *vasa*

นำพลาสมิดที่ได้จากการโคลนยีน *vasa* ของปลาบึก ในข้อที่ 2.4 มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้ได้เป็น Linearized plasmid DNA เพื่อใช้เป็น Template สำหรับการทำ *in vitro* transcription

การทำ *in vitro* transcription โดยใช้ส่วนผสมของ ATP, CTP, GTP, UTP และ Digoxigenin-UTP เอนไซม์ T7 RNA polymerase หรือ SP6 RNA polymerase ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการย่อย Linearized plasmid DNA และเติม tRNA และตกตะกอน RNA probe ด้วย Absolute ethanol ในปริมาตร 3 เท่า ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง จึงทำการปั่นแยกตะกอน และล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจาก RNase แล้วจึงละลาย RNA probe ด้วยน้ำปราศจาก RNase เก็บ RNA probe ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

5.2 การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่ออัมตะและรังไข่ บรรจุลงในกล่องใส่ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาทำการดึงน้ำออก โดยใช้ Ethyl alcohol ที่ปราศจาก RNase จากนั้นใช้ Xylene มาดึงแอลกอฮอล์ออก ทำการแทรกซึมโดยใช้ พาราฟฟิน นำตัวอย่างมาตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ Microtome ให้มีความหนาประมาณ 4 - 6 ไมโครเมตร สไลด์ส่วนหนึ่งที่ใช้ในการเปรียบเทียบ จะย้อมตัวอย่างด้วยสี H&E แล้วนำสไลด์ไปส่องกล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา ตัวอย่างเนื้อเยื่ออีก 1 ชุด จัดเตรียมเพื่อทำ in situ hybridization

5.3 การทำ in situ hybridization

นำเนื้อเยื่อจากข้อ 5.2 มาทำการแช่สารละลาย Xylene เพื่อดึงพาราฟฟินออก จากนั้นทำการตรึง RNA โดยการแช่ในสารละลายพาราฟอร์มัลดีไฮด์ 4 เปอร์เซ็นต์ และทำการย่อยโปรตีนด้วยเอ็นไซม์โปรตีนเนสเค (Proteinase K) และทำการปรับ pH ด้วยกรดอะซิติก จากนั้นนำ RNA probe ที่ต้มแล้วมาหยดบนสไลด์ ปิดสไลด์ด้วยกระจก Cover slip แล้วทำการอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จึงนำสไลด์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง ทำการล้าง RNA probe ออก ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium citrate แล้วทำการปรับ pH ให้เป็น 9.5 จึงนำสไลด์ไปแช่ใน nitro-blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt (NBT/BCIP) และทำการตรวจหา RNA probe ที่บริเวณเนื้อเยื่อรังไข่และอัมตะ ด้วยการส่องกล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 2.1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer	Sequence (5' – 3')	PCR
vasa-f1	GAYGABATMHTKGTVGAGTBAGYGG	3' RACE PCR
vasa-f2	AAGCCBACYCCDGTVCAGAARYAYGG	3' RACE PCR
vasa-r1	CCABKWVGGMACYTCCTGYTG RGC	5' RACE PCR
vasa-r2	TTHCCRCAKCGDCCDGTKCKBCCRA	5' RACE PCR
UPM-L	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTG GTATCAACGCAGAGT	3' and 5' RACE PCR
UPM-S	CTAATACGACTCACTATAGGGC	3' and 5' RACE PCR
vasa-RT-F	CGGCAAACCCTTATGTTCAG	RT-PCR
vasa-RT-R	CATTGTTCTCTGCGTACCTG	RT-PCR
β -actin-F	ACTACCTCATCAAGATCCTG	RT-PCR
β -actin-R	TTGCTGATCCACATCTGCTG	RT-PCR

การทดลองที่ 2 การพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ และใช้ปลาชวาวยวัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ

1. การเก็บตัวอย่างอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก

ปลาบึก (Mekong giant catfish) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pangasianodon gigas* ซึ่งปลาบึกที่ใช้ในการทดลองเป็นปลาบึกที่ซื้อจากฟาร์มเกษตรกรและนำมาเลี้ยงที่บ่อดินขนาด 10 x 40 เมตร ณ ฟาร์มประมงฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งใช้ปลาบึกระยะวัยรุ่น (Juvenile stage) โดยเก็บอวัยวะจากปลาบึกเพศผู้ น้ำหนัก 5.7 ± 1.0 กิโลกรัม ความยาว 83.2 ± 4.3 เซนติเมตร น้ำหนักอวัยวะ 1.3 ± 0.4 กรัม และค่าดัชนีความสัมพันธ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic index, GSI) 0.0215 ± 0.0049 % และเก็บรังไข่จากปลาเพศเมีย น้ำหนัก 5.3 ± 1.0 กิโลกรัม ความยาว 78.2 ± 3.3 เซนติเมตร น้ำหนักรังไข่ 21.3 ± 9.6 กรัม และ GSI เท่ากับ 0.3926 ± 0.1113 % ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างนั้นนำปลาบึกขึ้นมาสลบโดยใช้ 10 % น้ำมันกานพลู (Clove oil) อัตราส่วน 40 มิลลิกรัม/ลิตร จากนั้นทำการตัดก้านเหงือกเพื่อหยุดการทำงานของเลือดไม่ให้ไหลไปส่วนที่เป็นบริเวณช่องท้อง จากนั้นทำการเปิดช่องท้องเพื่อเก็บอวัยวะและรังไข่ ใส่งในสารละลาย Leibovitz's L-15 (L-15) และวางบนน้ำแข็งสำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดเซลล์ Spermatozoa หรือ Oogonia (Dissociation method)

การตรวจสอบจำนวนเซลล์และการคัดเลือกเซลล์เพื่อนำเซลล์ไปปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับ Dissociation enzyme ที่ใช้ในการสกัดคัดเลือกเซลล์ ซึ่งทำการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ Spermatozoa หรือ Oogonia โดยใช้การสกัดเซลล์ตัดแปลงจากวิธีการของ Morita et al. (2012) ในการสกัดเซลล์สืบพันธุ์ออกจากอวัยวะและรังไข่ โดยใช้ตัวอย่างอวัยวะหรือรังไข่น้ำหนัก 0.2 กรัม/Dissociation enzyme 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่ง Dissociation enzyme ที่เหมาะสมในการศึกษาครั้งนี้ คือ 0.4 % Collagenase IV (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.03 % Dispase II (Sanko Junyaku Co., Ltd., Tokyo, Japan), 10 % Fetal bovine serum (FBS; Gibco Invitrogen Co.) และ 900 U/ml DNase I (Roche Diagnostics) ในสารละลาย L-15 (pH 7.8, Gibco Invitrogen Co., Grand Island NY, USA) จากนั้นตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ และ Incubate กับ Dissociation enzyme เพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 180 นาที โดยทำการผสมด้วย Pipet ทุก ๆ 30 นาที เพื่อให้ Dissociation enzyme ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างได้อย่างทั่วถึง จากนั้นกรองเซลล์โดยใช้ผ้ากรองขนาด 50 ไมโครเมตร (Tokyo Screen Co., Ltd.) กรองเพื่อให้ได้เฉพาะเซลล์ที่ต้องการ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อดึง Dissociation enzyme ออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย L-15 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากล้างเซลล์รอบสุดท้ายทำการพักเซลล์โดยใช้สารละลาย L-15 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS และ 900 U/ml DNase I เพื่อพักเซลล์สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป (ภาพที่ 2.1)

3. การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Germ cell transplantation)

3.1 การผลิตลูกปลาผู้รับวัยอ่อน (Production of recipient larvae)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ปลาสาวยเผือก (Striped catfish) โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Pangasianodon hypophthalmus* ที่เลี้ยง ณ ฟาร์มประมง ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา โดยที่พ่อแม่พันธุ์ปลาจะให้อาหารทางการค้าที่ 28 % โปรตีน และให้อาหารจำนวน 2 มื้อ คือเวลา 09.30 และ 16.30 นาฬิกาทุกวัน ที่อัตราการให้อาหาร 3 % ต่อน้ำหนักตัวปลา โดยขั้นตอนในการผลิตลูกปลาผู้รับจะใช้ปลาพ่อแม่พันธุ์จำนวน 1 คู่ น้ำหนัก 2 - 4 กิโลกรัม โดยวิธีการฉีด Hormone เพื่อเป็นการผสมเทียมในปลาสาวย ซึ่งจะฉีด Hormone ในปลาสาวยเพศเมีย จำนวน 2 เข็ม เข็มแรก ทำการฉีดโดยใช้อัตราส่วนต่อมได้สมองของปลาสาวย (Fish's pituitary extract; PE) 2 โดส (Dose) และ Human chorionic gonadotropin (HCG) 200 IU/kg หลังจากนั้น 12 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สองโดยใช้อัตราส่วนเป็น 2 เท่าของเข็มแรก คือ PE 4 โดส และ HCG

400 IU/ kg หลังจากฉีดเข็มที่ 2 เป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมง ทำการรีดไข่จากปลาเพศเมียและรีดน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ผสมกันในถังเพาะปลาและรอลูกปลาแรกฟักภายในเวลา 24 - 36 ชั่วโมง

3.2 ย้อมสีเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ด้วย Fluorescence dye PKH26

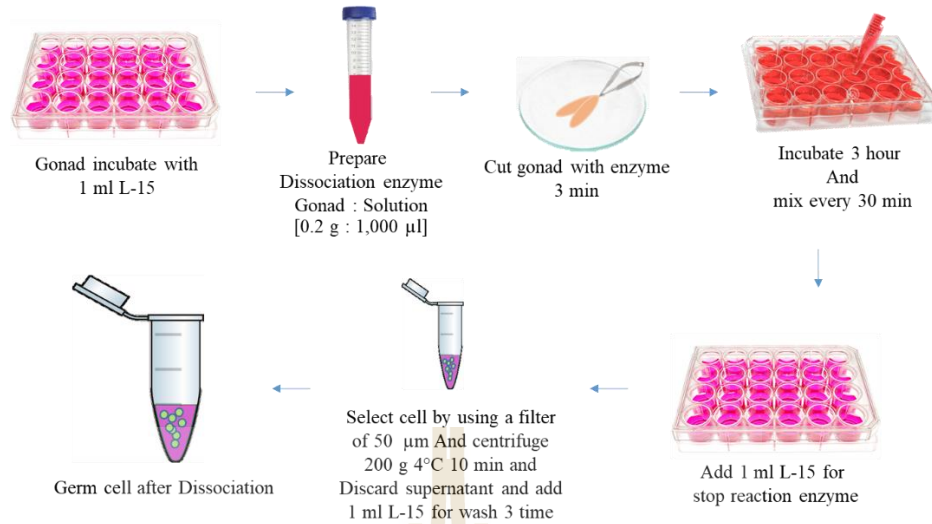
นำเซลล์ Spermatogonia และ Oogonia ที่ผ่านการสกัดเซลล์ด้วย Dissociation enzyme คือ Collagenase IV และ Dispase II แล้วนำมาทำการย้อมด้วยสี Fluorescence dye PKH26 ที่อัตราส่วน 20 ล้านเซลล์/ 1 reaction (ภาพที่ 2.2) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 200 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อล้างสารละลายสีส่วนเกินออกจากเซลล์ด้วยสารละลาย L-15 จำนวน 3 ครั้ง หลังจากล้างเซลล์รอบสุดท้ายทำการพักเซลล์โดยใช้สารละลาย L-15 ที่มีส่วนผสมของ 10 % FBS และ 900 U/ml DNase I เพื่อพักเซลล์สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วยสี PKH26 แล้วนั้นเมื่อนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent microscope) จะเห็นสีแดงติดบริเวณผนังเซลล์ (ภาพที่ 2.3)

3.3 การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Microinjection)

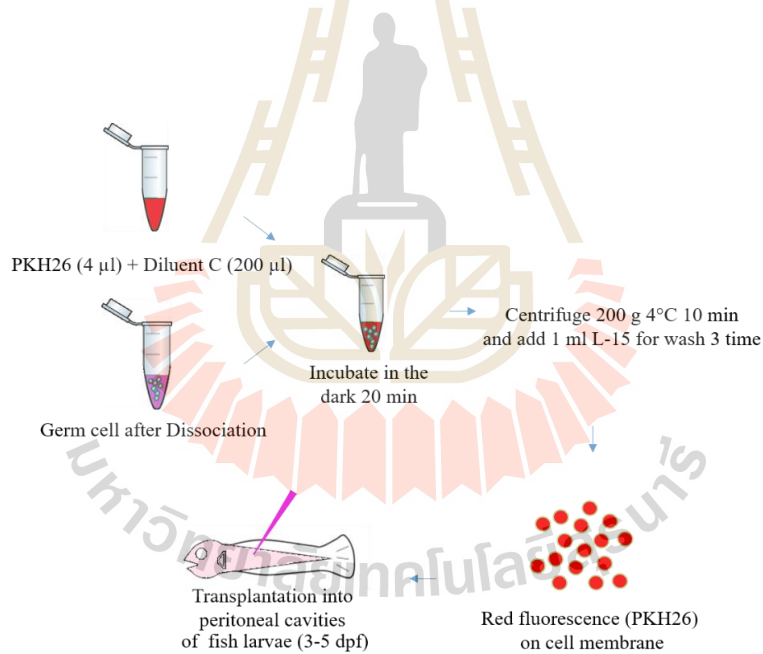
นำเซลล์ที่ผ่านการย้อมด้วยสี Fluorescence dye PKH26 ทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Transplantation หรือ Microinjection) เข้าสู่ลูกปลาตัวผู้รับวัยอ่อนที่อายุ 4 วันหลังจากที่ลูกปลาฟักเป็นตัวแล้ว (ภาพที่ 2.4) โดยใช้เครื่อง Microinjector ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ เข้าสู่บริเวณช่องว่างกลางลำตัว (Peritoneal cavities) และนำไปอนุบาลจนครบเวลา 21 วันเพื่อทำการตรวจการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาบิกินในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาตัวผู้รับ

4. การตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์ (Colonization)

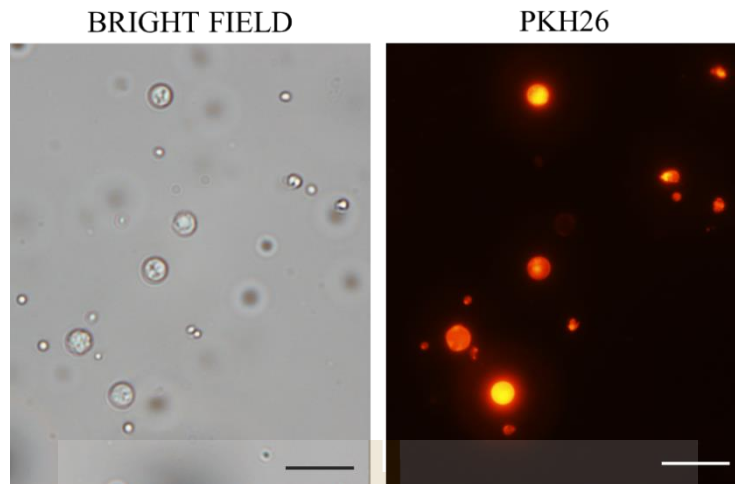
หลังจากปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ปลาผู้รับวัยอ่อนเป็นระยะเวลา 21 วัน นำปลามาทำการเก็บอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) เพื่อติดตามผลการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope) ในการตรวจสอบผลว่าพบเซลล์สืบพันธุ์ที่ถูกย้อมด้วยสี Fluorescence dye PKH26 (สีแดง) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับหรือไม่ เนื่องจากเมื่อปลาอายุครบ 30 วัน เป็นระยะที่ Primordial germ cells หรือ PGCs เคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณ Genital ridges หรือ Gonad เรียบร้อยแล้วและสามารถเก็บเส้น Gonad มาทำการตรวจสอบหาเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาบิกินที่ทำการปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาผู้รับได้



ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการสกัดเซลล์ Spermatozoa หรือ Oogonia ออกจากอวัยวะหรือรังไข่ของปลาบึก



ภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการย้อมสี Fluorescence dye PKH26 และ การ Microinjection



ภาพที่ 2.3 เซลล์สืบพันธุ์หลังผ่านการย้อมสี Fluorescence dye PKH26



ภาพที่ 2.4 ลูกปลาสาวยเพือกผู้รับอายุ 4 วันหลังจากฟักเป็นตัว (N = Needle)

บทที่ 3

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การโคลนยีน *vasa* จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก และการวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงต่อการแสดงออกในอวัยวะสืบพันธุ์

ยีนเครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลา เป็นเครื่องมือที่สำคัญอันหนึ่งในการนำไปใช้ในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ และระยะการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เป็นข้อมูลทางวิชาการที่สำคัญสำหรับนำไปใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ การศึกษานี้ได้ทำการโคลนยีน *vasa* ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึก โดยให้ชื่อว่า *Pgi-vasa* (ภาพที่ 3.1) ยีน *Pgi-vasa* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ มีความยาว 2,713 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ 5'-untranslated region (5'UTR) 154 นิวคลีโอไทด์ ส่วนที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (Coding sequence; CDS) 2,040 นิวคลีโอไทด์ และส่วนที่เป็น 3'-untranslated region (5'UTR) 519 นิวคลีโอไทด์ และ ปลาย poly A โดยในส่วนของ CDS เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วจะประกอบด้วยกรดอะมิโน 680 กรดอะมิโน สามารถคำนวณน้ำหนักโมเลกุลได้ 73.56 กิโลดาลตัน (kDa) และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.64

ยีน *Pgi-vasa* ที่บริเวณ CDS เมื่อแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน จะมีองค์ประกอบสำคัญของยีน *vasa* หรือโปรตีนในกลุ่ม DEAD (DEAD-box helicase proteins) 9 กลุ่มดังนี้ บริเวณระหว่าง N-terminus ของโปรตีนจนถึงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 168 จะมีกรดอะมิโนไกลซีน (Glycine) จำนวนมาก ซึ่งในโปรตีน PGI-VASA จะมีไกลซีน 28 % (กรดอะมิโนลำดับที่ 1 – 168) มีคู่กรดอะมิโนอาร์จินิน-ไกลซีน (arginine-glycine; RG) 5 ชุดซ้ำ และมีกลุ่มของกรดอะมิโนอาร์จินิน-ไกลซีน-ไกลซีน (arginine-glycine-glycine; RGG) 7 ชุดซ้ำ และที่บริเวณ N-terminus และ C-terminus ของโปรตีน PGI-VASA มีกลุ่มกรดอะมิโนทริปโตฟาน และกลุ่มกรดอะมิโนชนิดกรด (Acidic amino acid) ได้แก่ Glutamic acid และ Aspartic acid โปรตีน PGI-VASA มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ตรงกับโปรตีน VASA ของปลาอื่น ๆ ในฐานข้อมูลของ NCBI 70 - 97 % ภาพที่ 3.2 แสดงความตรงกันและเปอร์เซ็นต์ความตรงกันของโปรตีน PGI-VASA กับโปรตีน VASA ในปลาอื่น ๆ และโปรตีน VASA ของแมลงหวี โดยส่วนที่กรดอะมิโนที่มีความตรงกันกับโปรตีน VASA อื่น ๆ จะพบที่ บริเวณกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะสำคัญของโปรตีนในกลุ่ม DEAD-box helicase ได้แก่ RG และ RGG ตรงโปรตีนที่ใกล้กับ N-terminus กรดอะมิโนชนิดกรด (Acidic amino acid) ร่วมกับ Tryptophan ที่บริเวณ N-terminus และ C-terminus จะพบโมทีฟ (Motif) ต่าง ๆ ได้แก่ Motifs I, Ia, Ib, II, III, IV, V, และ VI (ภาพที่ 3.2) ภาพที่ 3.3 ซึ่งแสดงการ

วิเคราะห์ในแผนภาพ Phylogenetic ระหว่างโปรตีน PGI-VASA ร่วมกับ โปรตีน VASA ของปลาอื่น ๆ และ โปรตีน PL10 ซึ่งจากแผนภาพจะเห็นได้ว่าโปรตีน VASA แยกจากโปรตีน PL10 อย่างชัดเจน และ โปรตีน PGI-VASA จัดอยู่ในกลุ่มโปรตีน VASA ร่วมกับปลาอื่น ๆ

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Pgi-vasa* ที่อวัยวะต่าง ๆ ของปลาบึกเพศผู้ (ค่าดัชนีอวัยวะ สืบพันธุ์ 0.0240 ± 0.0025 %) และปลาบึกเพศเมีย (ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ 0.4521 ± 0.0757 %) ด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) ในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ หัวใจ ตับ ไต กระเพาะ ลำไส้ อังทะ และรังไข่ และทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนแอกติน (*Pgi-actin*) ในอวัยวะชุดเดียวกัน ผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 3.4 พบว่ายีน *Pgi-actin* แสดงออกทุกอวัยวะที่ได้ทำการวิเคราะห์ ในขณะที่ยีน *Pgi-vasa* จะแสดงออกเฉพาะอังทะและรังไข่เท่านั้น ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเพาะของยีน *Pgi-vasa* ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งสามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาบึกได้

การวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อและ in situ hybridization ของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *Pgi-vasa* ได้ทำร่วมกับการวิเคราะห์ทางเนื้อเยื่อและ in situ hybridization ของอังทะและรังไข่ของปลาบึก (ภาพที่ 3.5) โดยในขั้นแรกได้ทำการวิเคราะห์เนื้อเยื่อวิทยาในปลาบึกเพศผู้และปลาบึกเพศเมียที่ขนาดน้ำหนักตัว 300 กรัม 1 กิโลกรัม และ 10 กิโลกรัม โดยในอังทะของปลาบึกเพศผู้ที่ขนาดน้ำหนักตัว 300 กรัม 1 กิโลกรัม และ 10 กิโลกรัม จะประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะ Type A spermatogonia (ภาพที่ 3.6) และในรังไข่ของปลาบึกเพศเมียที่ขนาดน้ำหนักตัว 300 กรัม ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ที่ยังไม่พัฒนาถึงระยะ Vitellogenic oocyte (ภาพที่ 3.6) ในขณะที่รังไข่ของปลาบึกเพศเมียที่ขนาดน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม และ 10 กิโลกรัม ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาถึงระยะ Vitellogenic oocyte (ภาพที่ 3.6)

การวิเคราะห์เนื้อเยื่อวิทยาร่วมกับ in situ hybridization โดยใช้ Antisense probe ของยีน *Pgi-vasa* ถ้ายีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออกจะสามารถสังเกตน้ำเงินในเนื้อเยื่อได้ ผลการศึกษาพบว่า ในปลาบึกขนาด 10 กิโลกรัม พบความเข้มของสีน้ำเงินที่เกิดขึ้นในส่วน of Type A spermatogonia แต่ไม่พบในสีน้ำเงินในเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Somatic cell ในอังทะปลา สำหรับปลาบึกเพศเมียขนาด 1 กิโลกรัม พบสีน้ำเงินในเซลล์สืบพันธุ์ของรังไข่ทุกระยะ แต่ไม่พบในสีน้ำเงินในเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ Somatic cell ในรังไข่ปลา (ภาพที่ 3.7) ภาพที่ 3.8 แสดงการวิเคราะห์เนื้อเยื่อวิทยาร่วมกับ in situ hybridization โดยใช้ Sense probe ของยีน *Pgi-vasa* โดยเซลล์จะไม่มีสีน้ำเงินเกิดขึ้น ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นถึงความจำเพาะของยีน *Pgi-vasa* ต่อเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งสามารถใช้เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับจำแนกชนิดเซลล์สืบพันธุ์ในปลาบึกได้ นอกจากนี้เมื่อนำ Antisense

probe ของยีน *Pgi-vasa* ไปใช้ในการศึกษาจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ของอวัยวะของปลาทราย พบว่า Antisense probe ของยีน *Pgi-vasa* สามารถนำไปศึกษาจำแนกระยะเซลล์สืบพันธุ์ในปลาทรายได้ด้วยเช่นกัน

ในการเตรียมเซลล์เพื่อใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ ได้ทำการย่อยรังไข่และอวัยวะปลาบึก เพื่อสกัดนำเซลล์สืบพันธุ์ออกจากรังไข่และอวัยวะปลาบึก และนำมาทำการศึกษา in situ hybridization โดยใช้ Antisense probe ของยีน *Pgi-vasa* พบว่า เซลล์สืบพันธุ์ที่สกัดได้จากรังไข่และอวัยวะของปลาบึกติดสีน้ำเงินจากการวิเคราะห์ in situ hybridization โดยใช้ Antisense probe ของยีน *Pgi-vasa* (ภาพที่ 3.8)

การศึกษาการพัฒนารวมของอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก

ความสำเร็จสำหรับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ซึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากประการหนึ่ง คือ สัดส่วนของ Undifferentiated germ cells ได้แก่ Primordial germ cells, Spermatogonia หรือ Oogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้ให้ (Donor fish) โดยทำการศึกษารวมของอวัยวะสืบพันธุ์ ทั้งอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก (Histological analysis) เพื่อให้ทราบถึงระยะที่เหมาะสมของปลาผู้ให้ที่มีสัดส่วนของ Undifferentiated germ cells สูงที่สุด ซึ่งพบว่าในอวัยวะของปลาบึกประกอบไปด้วย Spermatogonia (SG) และ Primary spermatocyte (PSC) และในรังไข่ของปลาทรายประกอบไปด้วย Oogonia (OG), Primary oocyte (PO) และ Previtellogenic oocyte (PVO) และจากผลการศึกษาอวัยวะและรังไข่ของปลาบึกในครั้งนี้พบว่า ปลาบึกระยะ Immature หรือระยะที่ปลายังไม่สร้างอสุจิและไข่ ซึ่งทั้งเพศผู้และเพศเมีย น้ำหนักตั้งแต่ 1 ถึง 10 กิโลกรัม นั้นพบจำนวน Undifferentiated germ cells สูงที่สุด

การทดสอบหาระยะที่เหมาะสมของปลาทรายผู้รับวัยอ่อนต่ออัตราการรอดและอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาบึกผู้ให้

การทดสอบหาระยะที่เหมาะสมของปลาทรายผู้รับวัยอ่อนต่ออัตราการรอดและอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาบึก โดยทำการศึกษาทั้งหมด 3 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์พันธุ์) กลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ Spermatogonia และกลุ่มที่ปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ศึกษาถึงอัตราการรอด และอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ปลูกปลาวัยอ่อนระยะ 4, 6 และ 8 dph พบว่าลูกปลาที่อายุ 4 dpf มีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia และเซลล์ Oogonia เท่ากับ 83 % และ 72 % ตามลำดับ ซึ่งสูงที่สุดจากระยะอื่นๆ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับลูกปลาที่ระยะอื่นๆ และที่ระยะเดียวกันพบว่าอัตราการรอดชีวิตของลูกปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3.1) (ภาพที่ 3.9 และ 3.10)

ตารางที่ 3.1 ผลของอายุลูกปลาผู้รับที่ระยะต่าง ๆ ต่ออัตราการรอดและอัตราการเข้าไปอาศัย (Colonization rate) ของเซลล์ Spermatogonia หรือ Oogonia ของปลาผู้ให้ (Donor fish) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)

อายุลูกปลาผู้รับ (dpf)	อัตราการรอด (%)	อัตราการเข้าไปอาศัย (%)
กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับการฉีด)		
4 dpf	28.5 ± 7.1	-
6 dpf	34.0 ± 5.8	-
8 dpf	38.0 ± 5.1	-
เซลล์ Spermatogonia		
4 dpf	23.5 ± 6.4	83.9 ± 17.7^c
6 dpf	30.8 ± 5.7	29.0 ± 4.8^b
8 dpf	36.8 ± 4.6	0^a
เซลล์ Oogonia		
4 dpf	26.8 ± 4.9	72.2 ± 8.5^c
6 dpf	31.0 ± 7.4	27.1 ± 3.2^b
8 dpf	36.0 ± 8.8	0^a

อัตราการรอด และอัตราการเข้าอาศัยของการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatozoa ของปลาบึกในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาทรายผู้รับวัยอ่อน

ในการวิจัยครั้งนี้ทำการทดสอบเอ็นไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเซลล์ Spermatozoa และเซลล์ Oogonia จากอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก โดยใช้เอ็นไซม์ 3 ชนิดได้แก่ 0.4 % Collagenase H + 0.03 % Dispase II, 0.4 % Collagenase IV + 0.03 % Dispase II และ 0.25 % Trypsin ผลการศึกษาพบว่า 0.4 % Collagenase IV + 0.03 % Dispase II (1.4×10^6 เซลล์ต่อ 100 มิลลิกรัมอวัยวะ) เหมาะสมที่สุดในการเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสกัดเซลล์จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก ดังนั้นตลอดการศึกษานี้จึงใช้เอ็นไซม์ 0.4 % Collagenase IV + 0.03 % Dispase II ในการสกัดเซลล์เพื่อทำการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ในการเตรียมเซลล์เพื่อปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาผู้รับนั้น ได้นำเซลล์ Spermatozoa ที่สกัดได้จากอวัยวะของปลาบึก มาปลูกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาทรายวัยอ่อน โดยเซลล์ Spermatozoa ที่สกัดมาได้จะนำไปย้อมสารเรืองแสงสีเขียว (PKH26) และนำไปใช้ในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ช่องท้องลูกปลาทรายผู้รับวัยอ่อน โดยมีการตรวจสอบการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ (Donor fish) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ (Recipient fish) ซึ่งเป็นค่าดัชนีเบื้องต้นที่สำคัญที่ใช้ในการตรวจสอบความสำเร็จของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งในการศึกษานี้จึงได้ทำการตรวจสอบการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ โดยพบว่าเซลล์ Spermatozoa ที่สกัดจากได้จากอวัยวะของปลาบึกสามารถปลูกถ่ายเข้าสู่ปลาทรายผู้รับวัยอ่อน (ภาพที่ 3.11) ที่มีค่าอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 80 % และปลาทรายผู้รับวัยอ่อนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ มีอัตราการรอดเท่ากับ 26 % ซึ่งอัตราการรอดของลูกปลาทรายไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 อัตราการรอดของลูกปลาผู้รับ (Survival rate) ที่ปลูกถ่ายโดยเซลล์ Spermatogonia ซึ่งสกัดได้จากอวัยวะของปลาผู้ให้ (Donor testis) ที่เข้าไปอาศัย (Colonization rate) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)

Replication	No. of transplanted	No. of survived	Survival rate (%)	No. of colonized	Colonization rate (%)
Transplantation					
Transplanted 1	97	20	20.62	4/5	80
Transplanted 2	105	21	20.00	5/5	100
Transplanted 3	114	38	33.33	4/5	80
Transplanted 4	86	27	31.40	3/5	60
Average			26.34 ± 7.01		80.00 ± 16.33
Non-transplanted					
Control 1	97	25	25.77	-	-
Control 2	105	24	22.86	-	-
Control 3	114	36	31.58	-	-
Control 4	86	25	29.07	-	-
Average			27.32 ± 3.81		-

อัตราการรอด และอัตราการเข้าอาศัยของการปลุกถ่ายเซลล์ Oogonia ของปลาบึกเข้าสู่ปลาสวายผู้รับวัยอ่อน

สำหรับการปลุกถ่ายเซลล์ Oogonia เข้าสู่ลูกปลาสวายผู้รับวัยอ่อน ได้มีการศึกษาเพื่อทดสอบเอ็นไซม์ที่เหมาะสมต่อการสกัดเซลล์ออกจากอวัยวะสืบพันธุ์เช่นเดียวกับการสกัดเซลล์ Spermatogonia ซึ่งผลการศึกษาพบว่า 0.4 % Collagenase IV + 0.03 % Dispase II (5.3×10^5 เซลล์ต่อ 100 มิลลิกรัมเนื้อเยื่อ) เหมาะสมที่สุดในการเป็นเอ็นไซม์ที่ใช้ในการสกัดเซลล์ Oogonia จากรังไข่ของปลาบึก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้เอ็นไซม์ 0.4 % Collagenase IV + 0.03 % Dispase II ในการสกัดเซลล์เพื่อทำการปลุกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ได้นำเซลล์ Oogonia ข้อมสารเรืองแสงสีเขียว (PKH26) และนำไปใช้ในการปลุกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ช่องท้องลูกปลาสวายผู้รับวัยอ่อน และตรวจสอบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับพบว่าเซลล์ Oogonia สามารถเข้าไปอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสวายผู้รับได้ (ภาพที่ 3.12) โดยมีอัตราการเข้าอาศัยเท่ากับ 90 % และมีอัตราการรอดชีวิตของลูกปลาผู้รับวัยอ่อนหลังผ่านการปลุกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เท่ากับ 26 % ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 3.3)



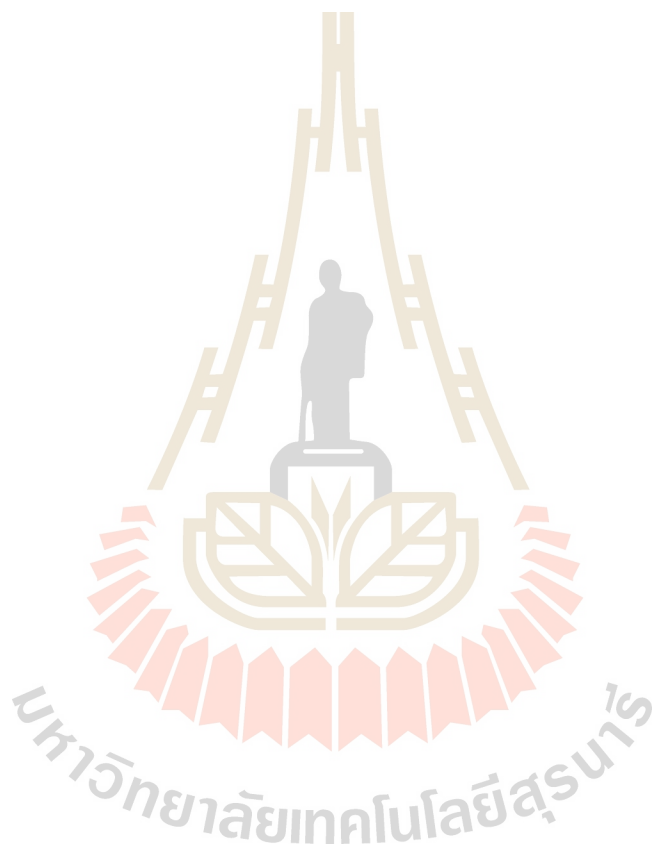
ตารางที่ 3.3 อัตราการรอดของลูกปลาผู้รับ (Survival rate) อัตราของเซลล์ Oogonia ที่สกัดได้จากอวัยวะของปลาผู้ให้ (Donor testis) ที่เข้าไปอาศัย (Colonization rate) ในอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาผู้รับ (Recipient larvae)

Replication	No. of transplanted	No. of survived	Survival rate (%)	No. of colonized	Colonization rate (%)
Transplantation					
Transplanted 1	116	30	25.86	5/5	100
Transplanted 2	100	20	20.00	5/5	100
Transplanted 3	96	22	22.92	3/5	60
Transplanted 4	89	34	38.20	5/5	100
Average			26.75 ± 8.00		90.00 ± 20.00
Non-transplanted					
Control 1	116	39	33.62	-	-
Control 2	100	40	40.00	-	-
Control 3	96	37	38.54	-	-
Control 4	89	32	35.96	-	-
Average			37.03 ± 2.82		-

Fig. 1

acatggggactccggctctctctctctctctcc 34
 tcccttccatcgatccgctctttagagtttaaggtcacagtcgagattaatcgtaagtgtttaggcagatgtttttattaataaaocgatacctctccatcaactatcttcaact 154
 ATGGAGGACTGGGAAGATGATCAGAGCCCTGCGTGAGCAACATGACATTTGGGAGTGTGGAACTTGTGGAACAGTGGGAGCCAAACAAACAGCATCAAATGCATCACCACAGATAAT 274
M E D W E D Q S P V V S N M T F G S A G N L W N S G S Q Q N S I K C I T T D N 40
 GAGGAAAGTTCTTGGAAAAGTGGCAGCCATGGTTTTGGGACTCAAGGGGAAACAGGGTGGAGCTGTAGGGAGGAGGTGGCTCAAGAGCTCAGTTCAGGAAATGATGGAAT 394
 E E S S W K S G S H G F G T Q G G N R G R S C R G G G G G F K S F S S G N D G N 80
 GGAAACGAAGAAGTTGATGGTGGCAGCCCTGGAATGGTGGTGAGACGGATTCAGGGGAAGAGGAGGAGCCGAAGAGGAGGCTTTAGAAATCCTTCAACTCTGACGGT 514
 G N E E V D G G S P W N G G G D G F R G R G G R G R R G R G G F R N S F N S D G 120
 GATGAAATGGCAATGATGAAGTTTCAGAAGTGACTTTGGTGGCAGAGGTGGCGTGGGGGAAGAGGAGGCGTGGAGCTTCCGACAGGGTGGTGTGAGAAAGGCAACAGCGCTT 634
 D E N G N D E G F R S D F G G R G G R G G R G G R G A F R Q G G D G E G T R R F 160
 GGCAGAGGTGGAGATATAGAGGACGGATGAGGAGTGTCTAAGGTTAATTTTTAGGATCACAGAAGGATGATGAGGAAAAGGAGATAGTGGGACTGCAAGGCGCAAGGTCGAC 754
 G R G G G Y R G R D E E V F S K V N F L G S Q K D D E G K G D S G T A G P K V D 200
 TATGTACCCCTCCACCACCCGAAGAAGAGAATCCATCTTTGCGCACTATGCGACAGGCATCACTTTGACAAGTATGATGACATCCTTGTGGATGAAGCGGAAGCAACCCGCCAAC 874
 Y V P P P P P E E E N S I F A H Y A T G I N F D K Y D D I L V D V S G S N P P N 240
 GCAATCATGACGTTTGAAGAAGCAACTCTGTGAGACTCTAAACAGAAATGTTGCCAAGTCAGGATACAGAAAGCCTACTCCTGTTGAGAAGCATGGTATCCCATCATATCTGCCGA 994
 A I M T F E E A Q L C E T L N R N V A K S **G Y T K P T P V Q** K H G I P I I S A G 280
 AGGGATCTTATGGCTTGTGCCAGACTGGATCCGAAAAACGGCCGCTTCTGTTGCTATTCTGCGAGCTCTCATGAGCGATGGTGAACAGCCAGAAAGTTCAGTGAAGTGCAGGAG 1114
 R D L M A C **A Q T G S G K T** A A F L L P I L Q R L M S D G A T A S K F S E V Q E 320
 CCCGAAGTAATCATCGTGGCTCTACCAGGAACTCATAAATCAGATTTACCTGGAGGCCCGCAAGTTTGCTTATGGCACTTGTGTGGCCCTGTGCTGTTTATGGAAGCACAAGCACT 1234
 P E V I I V A **P T R E L I** N Q I Y L E A R K F A Y G T C V R P V V V Y **G G** T S T 360
 GGATTTACAATCCGAGAAGTGTGAAGGGTGTAAAGCTGTTGATGGGACCCCTGGAAGACTGCTCGACATTATTGGTGGTGGAAAAGTTGGACTGAGTAAAGTTCGTTATTTGGTGTG 1354
 G F T I R E V L K G C N V L Y G **T P G R** L L D I I G R G K V G L S K V R Y L V L 400
 GATGAAGTGAACGATGTTGGACATGGGCTTTGAGCCAGATATGCGAAGCTGGTGAATCTCCGGGAATGCCTCCTAAAGAAAGAGCGCAAAACCTTATGTTCAAGTCCACCTATCCA 1474
D E A D R M L D M G F E P D M R K L V N S P G M P P K E E R Q T L M F **S A T** Y P 440
 GAGGATATCAAAGGCTGGCAGCTGATTTCTAAAGTGGATTATCTGTTCTGGCTGTGGAGTGGTGGGAGGAGCCTGCAATGACATAGAGCAGCATATCATCAAAGTACTCAGTAC 1594
 E D I Q R L A A D F L K V D Y L F L A V G V V G G A C S D I E Q H I I Q V T Q Y 480
 TCGAAGAGAGAGCAGCTGTGGAGCTCTAAAGACCAGGTAAGCAGAGAAACAATGGCTTTGTTGAAACAAAAGAGTGCAGATTTTATTGCAACATTCCTCTGTGAGGAAAAGT 1714
 S K R E Q L L E L L K T T G T Q R T **N V F V E T K R** S A D F I A T F L C Q E K V 520
 CCAACTACTAGCATCCATGGCAGTCCGGAACAGCAGAGCGGGAGAAAGCTCTCAGTACTCCGACAGGTCATGTCTGTGCTGGTAGCTACTCTGTGCTGCTAGGGACTAGAC 1834
 P T T S I H G D R E Q R E R E K A L S D F R T G Q C P V L V A T S V A **A R G L D** 560
 ATGAGCATGTCAGCATGGTGAACTTTGACCTACCAAAAAGACATGATGATGATGTGACCCGATGGGAGAACAGCCGATGTGAAACACAGGAAGAGCCGTGCTTTTTTGAC 1954
 I E H V Q H V V N F D L P K D I D E Y V **H R I G R T G R** C G N T G R A V S F F D 600
 CCCGACTGTATACGCTCTAGCCGCTCTCTGGTCAAAGTCTCTCGGGGCCAGCAGGAAGTTCCTCATGGCTGGAGGAAATGCATTGAGTGTGATGACACCACAGGGTCAAC 2074
 P D S D T P L A R S L V K V L S G A Q Q E V P S W L E E I A F S A H G T T G F N 640
 CCAGTGGGAAGGTGTTGCCTCACTGACACTGACAGGGTGGATCCTTCTGAAAGACCAGCACCACAACAGCTGCACAGAGCACTGCTGAGGAGCTGATGATGAGACTGGAA 2194
 P R G K V F A S T D T R R G G S F L K N Q P P Q P A A Q S T A A G A **D D E D W E** 680
 TAGatttacttttagttctctttttgtcaatattctgtgtctgttttatattttatgtttaaaagaaagcctatggcctacagagatttgcagagaaagtatagaatggc 2314
 *
 aggccttgagcctaagcgcgtaaaaaagcgtacaggttcaacctgaagtttaagcttcaaatattatgtcaggaatttggatggatcaacttaactgctcatgttcaacttaattgtttc 2434
 tttctttttgtttccagtagaattgctaattagtagatttcaactgtgtgattattcagtaacaaaaattactgatttttagaagccttcagctgaaggttgcattctgcoctctt 2554
 tcaacgaatagctctttctgccaattgtccaggttgcattttgatcaatattgtgaaagcatttggctgtggggaaaaaaacgtgtttttgcaatgggcatgcaaaaaattccc 2674
 cccccgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

ภาพที่ 3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA (ด้านบน) และลำดับกรดอะมิโน (ด้านล่าง) ของยีน *vasa* ในปลาบึก (*Pgi-vasa*) กรอบสี่เหลี่ยมสีเทาแสดงหมู่อนุรักษ์กรดแอสพาทิก (aspartic acid; D) กรดกลูตามิก (glutamic acid; E) และ ทริปโตฟาน tryptophan (W) ที่อยู่ใกล้ Start และ Stop codons หมู่อาร์จินีน-ไกลซีน (Arginine-glycine; RG) แสดงโดยการขีดเส้นใต้ หมู่อาร์จินีน-ไกลซีน-ไกลซีน (arginine-glycine-glycine; RGG) แสดงโดยการขีดเส้นใต้สองเส้น กรอบสีดำแสดงตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์ DEAD box protein family จำนวน 8 Domain กรอบสี่เหลี่ยมแสดง หมู่ไกลซีน-ไกลซีน (glycine-glycine; GG)



P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

Q motif Motif I Motif Ia P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

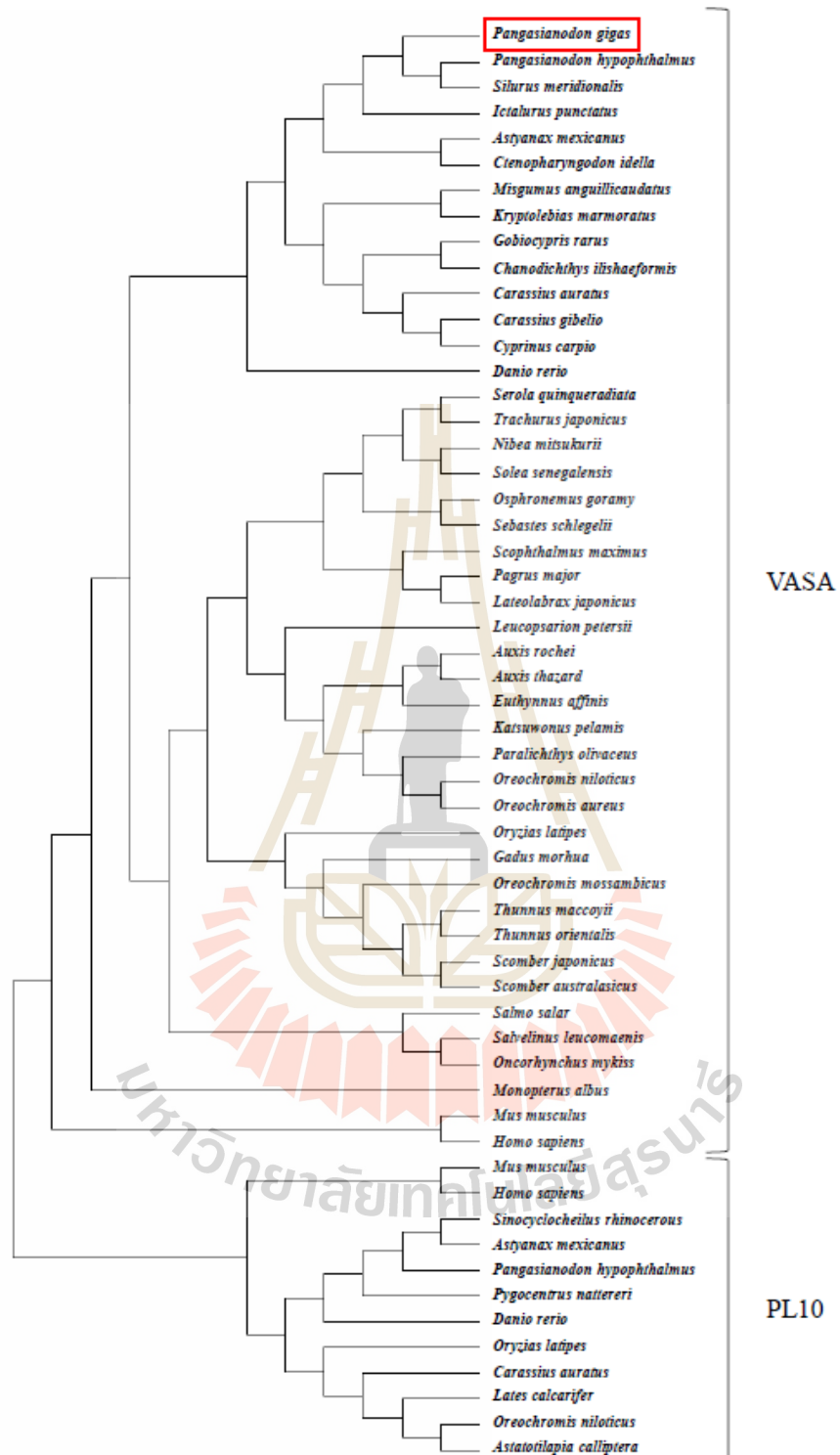
Motif Ib Motif II Motif III P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

Motif IV Motif V Motif VI P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

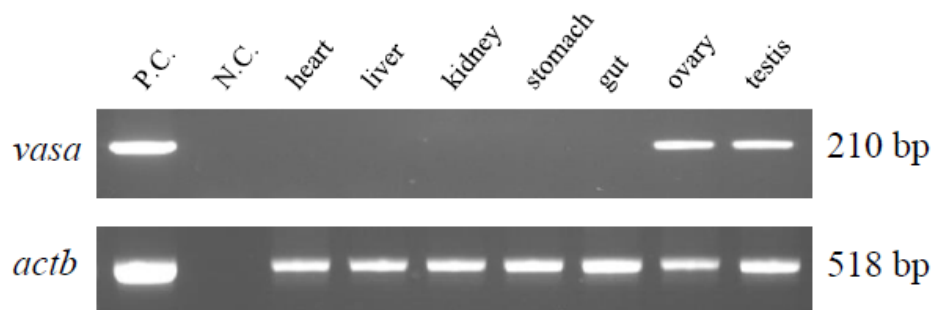
P. giga... P. hypophthalmus... S. meridionalis... C. gibello... D. zwilio... T. orientalis... A. thazard... L. japonicus... O. mossambicus... O. latipua... S. Salar... D. melanogaster

ภาพที่ 3.2 Multiple alignment เปรียบเทียบหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่แสดงโครงสร้างอนุรักษ์ในยีน *vasa* ของปลาบึกกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ลำดับของกรดอะมิโนแสดงใน NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.libproxy1.nus.edu.sg/protein/?term=Vasa>). หัวลูกศรดำแสดง Arginine-glycine (RG) หัวลูกศรขาวแสดง arginine-glycine-glycine (RGG) กรอบสี่ดำแสดงตำแหน่งกรดอะมิโนอนุรักษ์ DEAD box protein family จำนวน 8 Domain

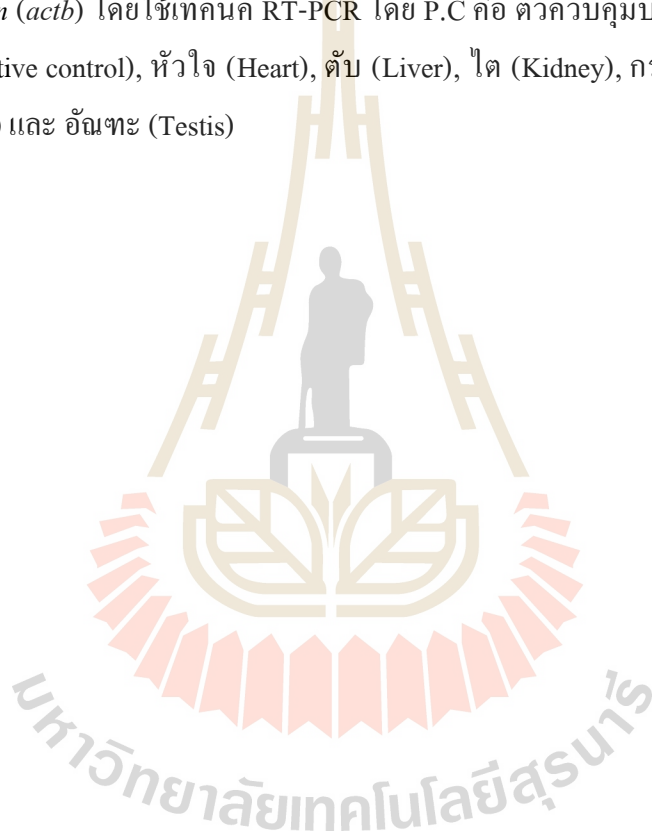


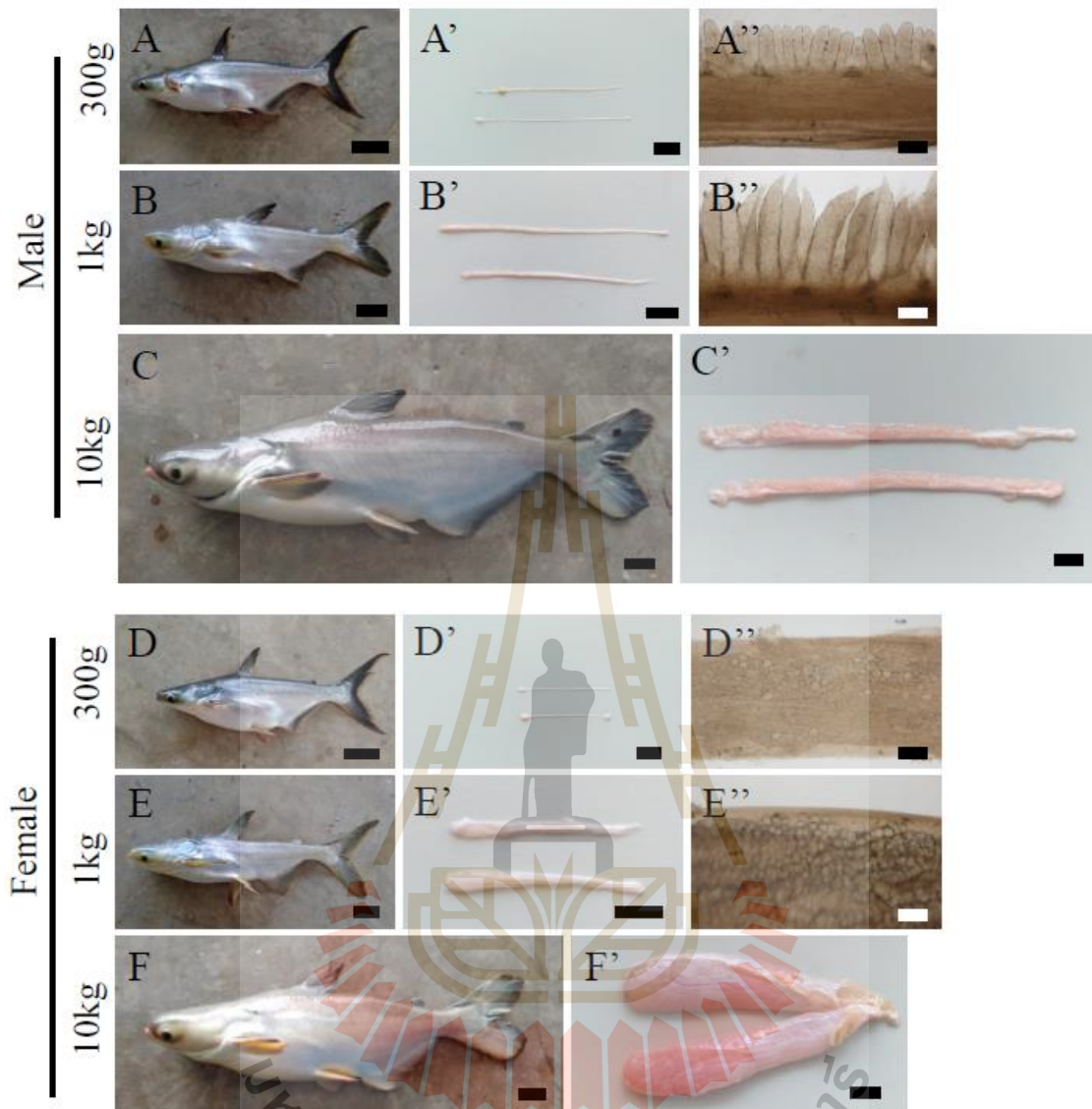


ภาพที่ 3.3 การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับกรดอะมิโนของยีน *vasa* จากการสร้าง Phylogenetic tree ตามวิธี UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) โดยการใช้โปรแกรม MEGA version 6 (Tamura et al., 2013) เปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *vasa* ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ซึ่งประกอบด้วยปลากระดูกแข็งอื่น ๆ จำนวน 44 ชนิด และโปรตีน PL10 ในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ อีก 7 ชนิด จากการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโปรตีนชนิดนี้ในปลาได้ 2 กลุ่มใหญ่ โดย *Phy-vasa* มีความใกล้ชิดกับปลา *Silurus meridionalis* มากที่สุดและนอกจากนี้ยังพบว่าสามารถแยกกลุ่มของโปรตีน *vasa* รวมถึง *Phy-vasa* ออกจากกลุ่มของโปรตีน PL10 ได้อย่างชัดเจน เลข GenBank accession numbers คือ *Pangasianodon gigas*; *Pangasianodon hypophthalmus*, MK134711.1; *Silurus meridionalis*, ACD62525; *Ictalurus punctatus*, AJE26193.1; *Astyanax mexicanus*, XP_007255341; *Ctenopharyngodon idella*, ACR61400; *Misgurnus anguillicaudatus*, BAJ19133; *Kryptolebias marmoratus*, AGA16734; *Gobiocypris rarus*, AFA45124; *Chanodichthys ilishaeformis*, AGG53839.1; *Carassius auratus*, AAX22126; *Carassius gibelio*, AAV70960; *Cyprinus carpio*, AAL87139; *Danio rerio*, CAA72735; *Seriola quinqueradiata*, ADD91316; *Trachurus japonicus*, BAG72093; *Nibea mitsukurii*, ACV32355; *Solea senegalensis*, AFN89211; *Osphronemus goramy*, ACV69940; *Sebastes schlegelii*, AEP68013; *Scophthalmus maximus*, AFQ38974; *Pagrus major*, BAJ25759; *Lateolabrax japonicus*, AFI61840; *Leucopsarion petersii*, BAD04052; *Auxis rochei*, ADD81193; *Auxis thazard*, ADD81194; *Euthynnus affinis*, ADD81191; *Katsuwonus pelamis*, ADD81192; *Paralichthys olivaceus*, AEY68604; *Oreochromis niloticus*, BAL43034; *Oreochromis aureus*, AEO36953; *Oryzias latipes*, NP_001098146; *Gadus morhua*, ADV36250; *Oreochromis mossambicus*, ALM89053.1; *Thunnus maccoyii*; AKA59814.1; *Thunnus orientalis*, ABY77970; *Scomber japonicus*, ACV32356; *Scomber australasicus*, ADD81190; *Salmo salar*, NP_001266058; *Salvelinus leucomaenis*, ACA33927; *Oncorhynchus mykiss*, NP_001117665; *Monopterus albus*, ABA54551; *Mus musculus*, BC144760.1, and; *Homo sapiens*, AY004154.1. The amino acid sequences of the PL10 homologs included in the phylogenetic analysis (with GenBank accession numbers) were: *Mus musculus*, AAA39942.1; *Homo sapiens*, AF061337.1; *Sinocyclocheilus rhinoceros*, XM_016566372.1; *Astyanax mexicanus*, XP_007227913; *Pangasianodon hypophthalmus*, XM_026945667.2; *Pygocentrus nattereri*, XM_017684441.1; *Danio rerio*, BC059794; *Oryzias latipes*, XP_011487782; *Carassius auratus*, XM_026271044.1; *Lates calcarifer*, XM_018697328.1, and; *Oreochromis niloticus*, XP_003449556.1.

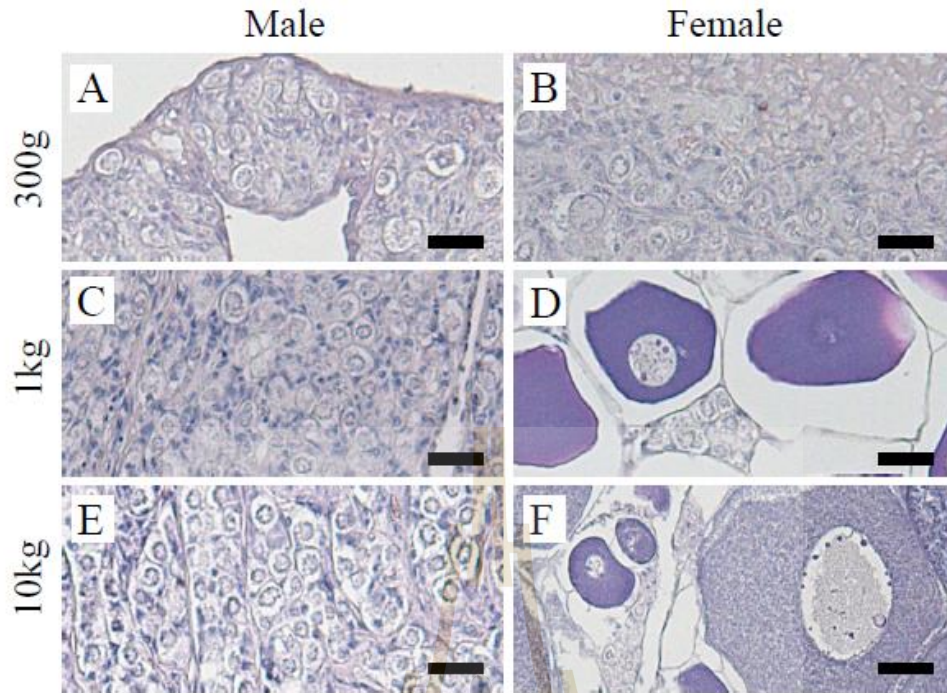


ภาพที่ 3.4 การแสดงออกของ mRNA ของยีน *vasa* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลาบึก (*P. gigas*) เปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน β -actin (*actb*) โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย P.C คือ ตัวควบคุมบวก (Positive control), N.C คือ ตัวควบคุมลบ (Negative control), หัวใจ (Heart), ตับ (Liver), ไต (Kidney), กระเพาะอาหาร (Stomach), ลำไส้ (gut), รังไข่ (Ovary) และ อัณฑะ (Testis)

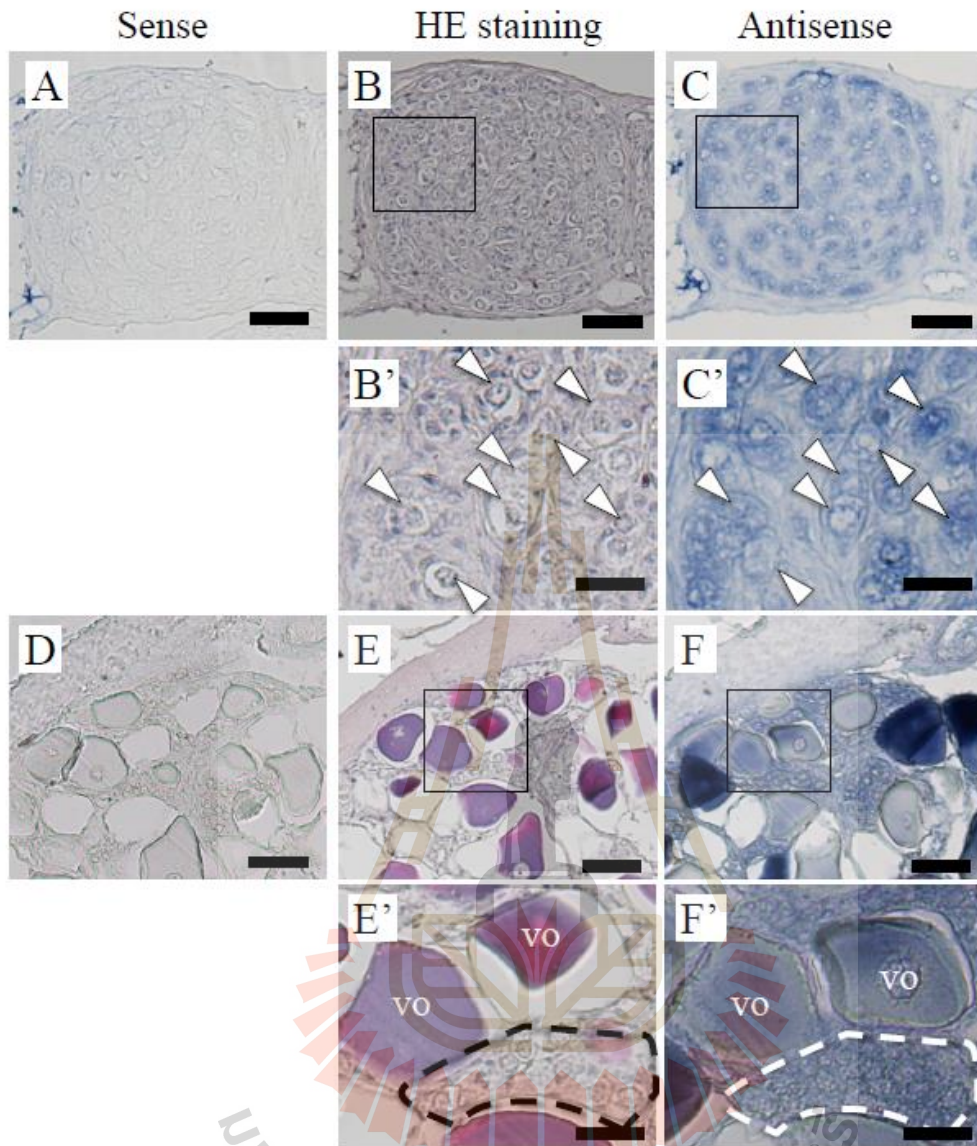




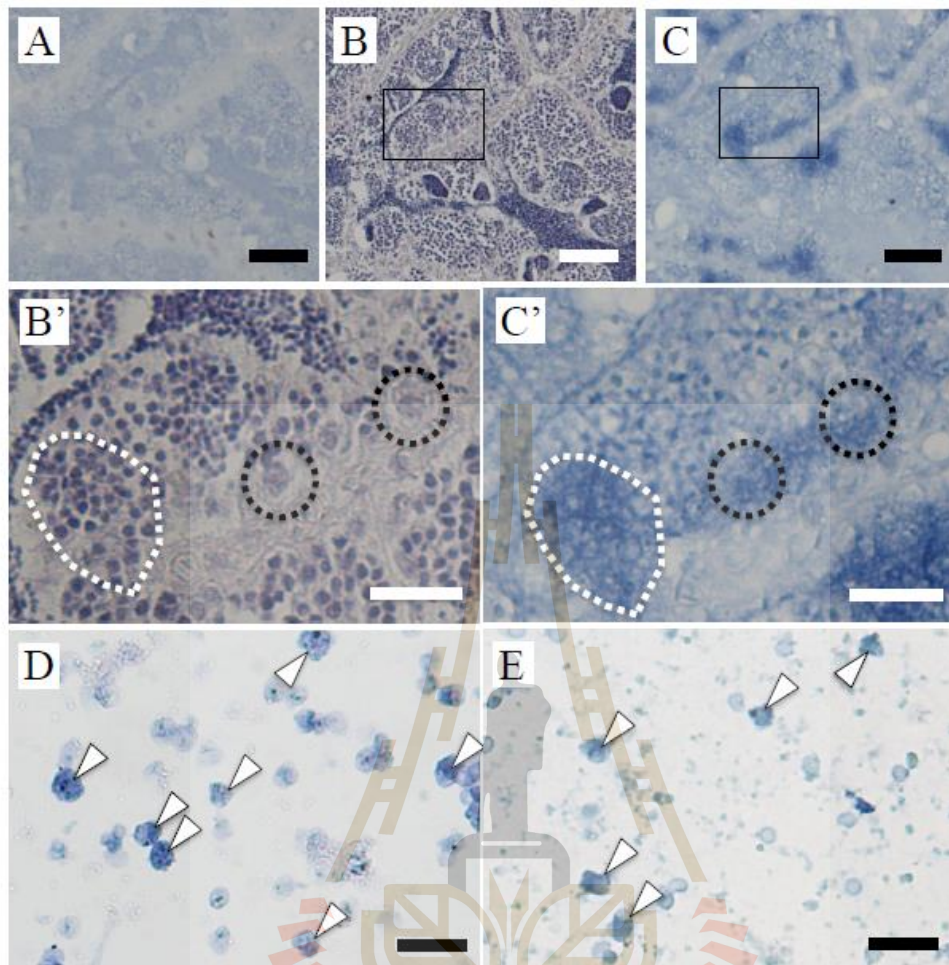
ภาพที่ 3.5 ปลาบึกและอวัยวะสืบพันธุ์ ปลาเพศผู้ (ภาพ A-C) และปลาเพศเมีย (ภาพ D-F) น้ำหนักของปลา 300 กรัม (A-A'' และ D-D''), 1 กิโลกรัม (B-B'' และ E-E''), และ 10 กิโลกรัม (C-C'' และ F-F'') ในภาพปลา Scale bars ขนาด 5 เซนติเมตร (A-F) ในภาพอวัยวะสืบพันธุ์ Scale bars ขนาด 1 เซนติเมตร (A'-F') และขนาด 200 μm (A''-F'')



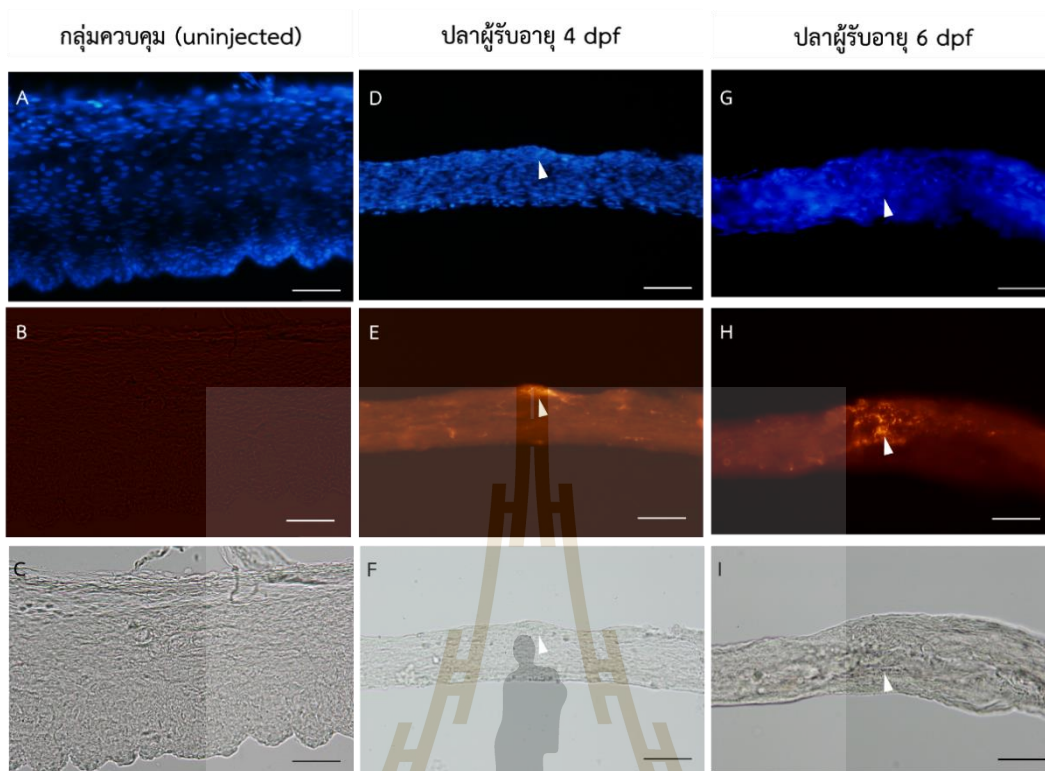
ภาพที่ 3.6 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อวิทยาของปลาบึกเพศผู้ (A-C) และปลาบึกเพศเมีย (D-E) น้ำหนักของปลาที่ศึกษา 300 g (A-A'' และ D-D''), 1 กิโลกรัม (B-B'' และ E-E''), และ 10 กิโลกรัม (C-C'' และ F-F'') Scale bars แสดงขนาด 20 ไมโครเมตร



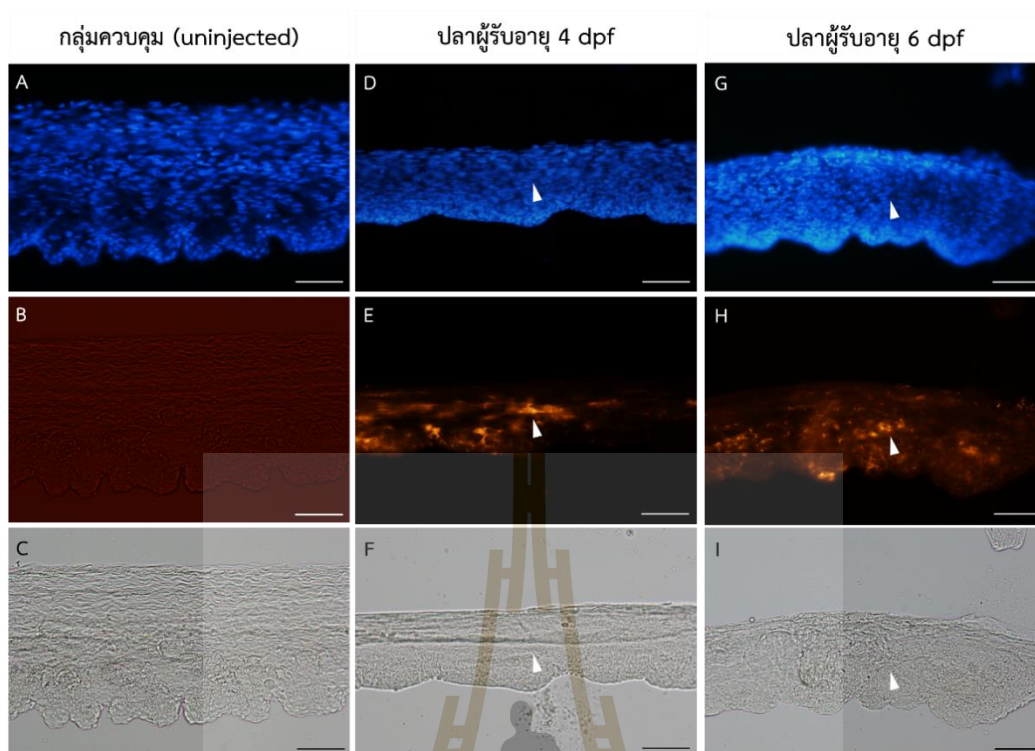
ภาพที่ 3.7 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและ in situ hybridization ในอัณฑะ (A-C) และรังไข่ (D-F) ขึ้นเนื้อเยื่อที่วิเคราะห์ in situ hybridization ด้วย Sense *vasa* probe (A และ D) ขึ้นเนื้อเยื่อที่ย้อมสี Haematoxylin และ Eosin (B และ E) และขึ้นเนื้อเยื่อที่วิเคราะห์ in situ hybridization ด้วย Antisense *vasa* probe (C และ F) ภาพกำลังขยายของ B, C, E, และ F แสดงดังภาพ B', C', E', และ F' ตามลำดับ โดยสีน้ำเงินที่ตรวจพบแสดงบริเวณที่ *Pgi-vasa* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อ ลูกศรสีขาวแสดง Type A Spermatogonia อักษรย่อ VO แสดง Vitellogenic oocytes เส้นประแสดง Oogonia และ Primary oocytes Scale bars แสดงขนาด 50 (B, C, E, และ F) และ 20 ไมโครเมตร (B', C', E', และ F')



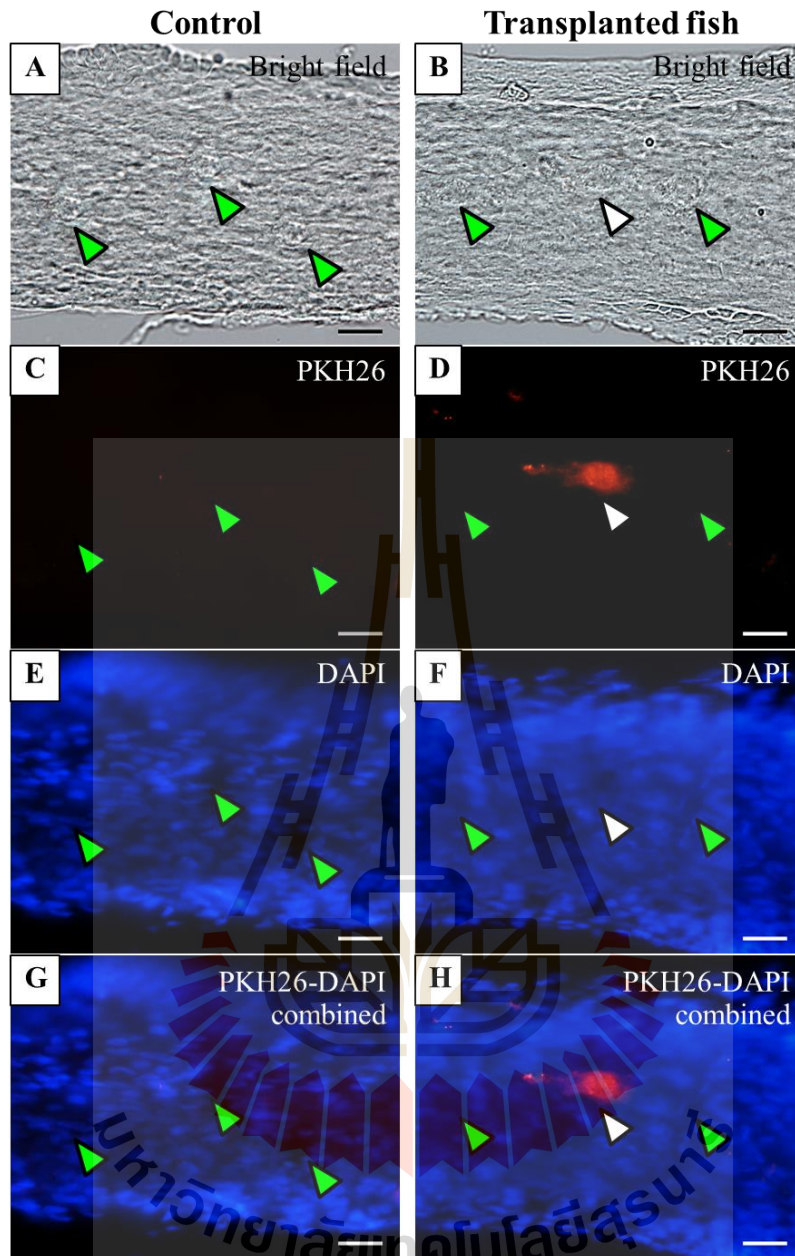
ภาพที่ 3.8 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อและ in situ hybridization ในปลาอินท๊ะของปลาสาวยโตเต็มวัยและเซลล์สืบพันธุ์ที่ผ่านการสลับเซลล์ของปลาบึก เนื้อเยื่ออินท๊ะของปลาสาวยโตเต็มวัยที่ผ่านการวิเคราะห์เนื้อเยื่อ และ in situ hybridization ด้วย Sense *Pgi-vasa* probes (A) ย้อมสี Haematoxylin และ Eosin (B) หรือ in situ hybridization ด้วย Antisense *Pgi-vasa* probes (C) ภาพกำลังขยายของ B และ C แสดงถึง B' และ C', ตามลำดับ เส้นประสีดำแสดง Type A Spermatogonia เส้นประสีขาวแสดง Spermatocytes การวิเคราะห์ in situ hybridization ด้วย Antisense *Pgi-vasa* probes ในเซลล์ที่ข้อยจากอินท๊ะ (E) และ รังไข่ (F) ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินอันเนื่องมาจากยีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออก Scale bars แสดงขนาด 50 (B' , C' , D, E) และ 20 ไมโครเมตร (A,B,C)



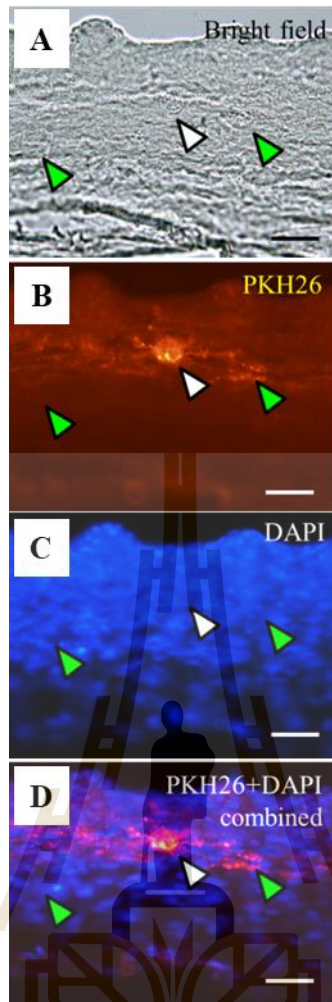
ภาพที่ 3.9 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Spermatogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสาวยุติรับที่ระยะต่าง ๆ ภาพ A,B และ C คือเส้นอวัยวะสืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์ ภาพ D,E และ F ลูกปลาอายุ 4 dpf ภาพ G,H และ I ลูกปลาอายุ 6 dpf ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ Spermatogonia ของปลาบีก ที่เข้าไปอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาสาวยุติรับ ภาพ C,F และ I อวัยวะสืบพันธุ์ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง Bright field และ อวัยวะสืบพันธุ์ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (A,B,D,E,G และ I) Scale bars แสดงขนาด 50 (D,E,F,G,H และ I) และ 20 ไมโครเมตร (A,B และ C)



ภาพที่ 3.10 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์ Oogonia ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาซาวายผู้รับที่ระยะต่าง ๆ ภาพ A,B และ C คือเส้นอวัยวะสืบพันธุ์ที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์ ภาพ D,E และ F ลูกปลาอายุ 4 dpf ภาพ G,H และ I ลูกปลาอายุ 6 dpf ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ลูกศรสีขาวแสดงเซลล์ Oogonia ของปลาบิก ที่เข้าไปอาศัยในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาซาวาย ภาพ C,F และ I อวัยวะสืบพันธุ์ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง Bright field และ ภาพ A,B,D,E,G และ I อวัยวะสืบพันธุ์ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ Scale bars แสดงขนาด 50 (D,E,F,G,H และ I) และ 20 ไมโครเมตร (A,B และ C)



ภาพที่ 3.11 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สีบพันธุ์ที่สกัดจากอันตรายของปลาบึก และปลุกถ่ายเข้าสู่ลูกปลาสาวยเพือกวัยอ่อน ภาพ A,B Genital ridge ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง Bright field และ Genital ridge ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (C,D,E,F,G,H) โดยจะเห็นเซลล์ที่ได้รับการย้อมสีเรืองแสง PKH 26 ของปลาบึกใน Genital ridge ของปลาสาวยเพือก (D) Scale bar แสดงขนาด 20 ไมโครเมตร



ภาพที่ 3.12 การตรวจผลการเข้าอาศัย (Colonization) ของเซลล์สีบพันธุ์ที่สกัดจากรังไข่ของปลาบึก และปลูกลงเข้าสู่ลูกปลาทรายเพื่อถ่วงน้ำหนัก ภาพ A Genital ridge ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ด้วยแสง Bright field และ Genital ridge ที่ถ่ายได้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (B,C,D) โดยจะเห็นเซลล์ที่ได้รับการย้อมสีเรืองแสง PKH 26 ของปลาบึกใน Genital ridge ของปลาทรายเพื่อถ่วงน้ำหนัก (B) Scale bar แสดงขนาด 20 ไมโครเมตร

อภิปรายผลการศึกษา

ในการประยุกต์ใช้การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาในบ่อเลี้ยงนั้น ข้อมูลทางชีววิทยาของการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่จะกำหนดความสำเร็จของการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ข้อมูลทางชีววิทยาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในปลาผู้ให้ (Donor fish) และปลาผู้รับ (Recipient fish) เป็นปัจจัยสำคัญ โดยข้อมูลการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้รับเป็นปัจจัยสำคัญที่จะใช้กำหนดระยะหรืออายุที่เหมาะสมสำหรับลูกปลาผู้รับ (Recipient fish) ที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ และการศึกษาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาผู้ให้เป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำการสกัดเซลล์ Spermatozoa หรือ Oogonia ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีระยะเหมาะสมในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์

การศึกษาครั้งนี้ใช้ปลาสาวยวัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ และใช้ปลาบึกเป็นปลาผู้ให้ การศึกษาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในปลาสาวยวัยอ่อน และผลการศึกษาพบว่าปลาสาวยวัยอ่อนที่อายุ 2 - 10 วัน ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ Primordial germ cell กำลังเคลื่อนเซลล์เข้าฝังตัวในบริเวณที่จะพัฒนาเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาวัยอ่อน ซึ่งระยะดังกล่าวจึงเป็นระยะที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นปลาผู้รับในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ (Duangkaew et al., 2019) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึก ซึ่งเป็นปลาผู้ให้ โดยการศึกษาจำเป็นต้องมีเครื่องหมาย (Gene marker) ที่มีความจำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์ โดยเฉพาะเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความสำคัญต่อการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นในการศึกษานี้ ได้ทำการโคลนยีนที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ ยีน *vasa* ในปลาบึก และศึกษาเทคนิคในการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ การสกัดเซลล์ การฉีดเซลล์เข้าสู่ปลาผู้รับ การเลี้ยงอนุบาลลูกปลาสาวยวัยอ่อนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ และการตรวจการเข้าอาศัยของเซลล์ที่ได้รับการปลูกถ่ายจากปลาผู้ให้สู่ปลาผู้รับ

การโคลนยีน *vasa* ซึ่งเป็นยีนที่ได้มีรายงานว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อเซลล์สืบพันธุ์ พบว่ายีน *vasa* ที่โคลนได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก แสดงออกสร้างโปรตีนที่มีองค์ประกอบกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะที่สำคัญของยีน DEAD-box protein 8 กลุ่ม คือ ยีนในกลุ่ม DEAD-box protein ทำหน้าที่สำคัญในการจับกับ ATP และ RNA (binding ATP and RNA) ในกระบวนการ ATP hydrolysis for unwinding RNA (Linder et al., 1989; Schmid and Liner, 1992; Pause et al., 1993; Tanner et al., 2003; Rocak and Linder, 2004; Cordin et al., 2006) โปรตีนที่สร้างจากยีน *Pgi-vasa* ประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโน Q-motif ซึ่งเป็นกลุ่มของกรดอะมิโนที่พบในกลุ่มโปรตีน DEAD-box protein (Cordin et al., 2006) และพบกลุ่มกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arginine; R) และไกลซีน (Glycine; G) RGG RG ที่กระจายตัวจำนวนมากในบริเวณ N-terminal ซึ่งกลุ่มยีนเหล่านี้มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการจับกับ RNA (RNA binding) (Kiledjian and Dreyfuss, 1992; Liang et al., 1994) นอกจากนี้กลุ่มกรดอะมิโน กรดแอสพาทิก (Aspartic acid; D) กรดกลูตามิก

(Glutamic acid; E) ทริปโตฟาน (Tryptophan; W) เป็นหมู่กรดอะมิโนที่พบบริเวณปลายโปรตีน vasa ทั้งที่ปลาย N-terminus และ C-terminus โดยพบอยู่ใกล้กับ Start codon และ Stop codon ของยีน *Pgi-vasa* (Castrillon et al., 2000) โปรตีน PGI-VASA มีความคล้ายคลึงของกรดอะมิโนกับโปรตีน VASA ของปลากระดูกแข็งอื่น ๆ และการวิเคราะห์แผนภูมิ Phylogenetic พบว่า ยีน *Pgi-vasa* จัดอยู่ในกลุ่มของยีน vasa ซึ่งแยกจากครอบครัวของยีน *PL10* อย่างชัดเจน โดยสรุป ยีน *Pgi-vasa* ของปลาบึกซึ่งแสดงออกโปรตีน VASA ที่ประกอบด้วยกลุ่มของกรดอะมิโน หมู่ของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีน VASA และโปรตีน PGI-VASA มีหมู่อะมิโนดังกล่าวตรงกับโปรตีน VASA ที่พบในปลากระดูกแข็งหลายชนิด และแผนภาพ Phylogenetic ก็แสดงว่าโปรตีน PGI-VASA อยู่ในครอบครัว ยีน vasa ดังนั้นยีน *Pgi-vasa* ที่โคลนได้จากการศึกษาครั้งนี้จึงน่าจะเป็นยีนที่สร้างโปรตีน VASA ของปลาบึก

ผลการศึกษารายการแสดงออกของยีน *Pgi-vasa* โดยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะและรังไข่ของปลาบึก ซึ่งผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาเรนโบว์เทรา (Yoshizaki et al. 2000) ปลาเมดากะ (Shinomiya et al., 2000) ปลานิล (Kobayashi et al., 2002) ปลา Gibel carp (Xu et al., 2005) ปลาไหล (Rice field eel) (Ye et al., 2007) ปลาบลูฟินทูน่า (Pacific Bluefin tuna) (Nagasawa et al., 2009) ปลาไน (Li et al., 2010) ปลาตุ๊ก (Raghuveer and Senthilkumaran, 2010) ปลา European sea bass (Blazquez et al., 2011) ปลา Rare minnow (Cao et al., 2012) ปลา Solea senegalensis (Pacchiarini et al., 2013) ปลา Toadfish (Ubeda-Manzanaro et al., 2014) ปลา Japanese flounder (Wu et al., 2014) และปลา Half-smooth tongue sole (Huang et al., 2014) นอกจากนี้การวิเคราะห์ in situ hybridization ด้วยโพรบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *Pgi-vasa* พบว่ายีน *Pgi-vasa* แสดงออกเฉพาะในเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งในรังไข่และอวัยวะ และผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลากระดูกแข็งอื่น ๆ และในแมลงหวี่ และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hay et al., 1988; Fujiwara et al., 1994; Raz, 2000; Yoshizaki et al., 2002) ดังนั้น ยีน *Pgi-vasa* เป็นยีนที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการจำแนกเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึก เนื่องจากการหาตัวอย่างปลาบึกระยะสมบูรณ์พันธุ์ทำได้ยาก (เนื่องจากเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่มาก) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ in situ hybridization ด้วยโพรบที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน *Pgi-vasa* กับอวัยวะของปลาสาวย โดยพบว่ายีน *Pgi-vasa* สามารถนำมาใช้ในการศึกษาจำแนกชนิดของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาสาวยเพศผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ ควรมีการศึกษาต่อไปว่า ยีน *Pgi-vasa* จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับเซลล์สืบพันธุ์ในปลากลุ่ม Pangasiid อื่น ๆ หรือไม่

เอ็นไซม์ที่นำมาสกัดเซลล์ Spermatogonia จากอวัยวะ และสกัดเซลล์ Oogonia จากรังไข่มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ยกตัวอย่างเช่น ในปลา Yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) 0.4 % Collagenase H และ 0.03 % Dispase II สามารถสกัดเซลล์ Spermatogonia ได้เท่ากับ 10^7 เซลล์ จากอวัยวะที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์

(Immature testis) ของปลาเพศผู้ที่มีอวัยวะขนาด 100 มิลลิกรัม (Morita et al., 2012) ในปลา *Jundia catfish* (*Rhamdia quelen*) และ *Nibe croker* (*Nibe mitsukurii*) 0.25 % Trypsin เหมาะสมสำหรับการสกัดเซลล์ Spermatozoa เท่ากับ 22×10^7 เซลล์ต่ออวัยวะน้ำหนัก 8 กรัม และ 9.4×10^4 เซลล์ต่อ 1 มิลลิกรัมของอวัยวะ (Silva et al., 2016; Takeuchi et al., 2009) ปลา Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) เอ็นไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเซลล์ Spermatozoa และเซลล์ Oogonia คือ 0.3 % Trypsin (Psenicka et al., 2015) และในปลา *Tench* (*Tinca tinca*) ใช้เอ็นไซม์ 0.1 % Collagenase ในการสกัดเซลล์ Spermatozoa จากอวัยวะน้ำหนัก 0.18 กรัม เท่ากับ 2.06×10^6 เซลล์ (Linhartova et al., 2014) เป็นต้น

จากการศึกษาของ Duangkaew และคณะ (2019) ซึ่งทำการศึกษาการพัฒนาของเซลล์เริ่มต้นของเซลล์สืบพันธุ์ (Primordial germ cell ; PGC) ตั้งแต่ลูกปลาสายแรกฟักถึงระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์ (Genital ridge) พัฒนาเรียบร้อยแล้วพบว่า ในช่วงแรกเริ่มจะพบ PGC อยู่บริเวณในช่องท้องของปลา แต่ไม่ใช่บริเวณตำแหน่งที่เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ จากนั้นเมื่อปลาอายุ 5 - 9 วันหลังจากไข่และน้ำเชื้อได้รับการผสม (day post fertilization ; dpf) PGC จะเคลื่อนที่มาบริเวณที่เป็นตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยกระบวนการ Chemokine ที่จะหลั่งสาร SDF1 และ CXCR4 ที่เป็นตัวกลางสำคัญทำให้ PGC เคลื่อนที่เข้ามาที่อวัยวะสืบพันธุ์ (Doitsidou et al., 2002; Kurokawa et al., 2006) และเมื่อปลาอายุ 10 dpf เซลล์ร่างกาย (Somatic cells) จะเริ่มเข้ามาล้อมรอบ PGC เพื่อเตรียมความพร้อมในการแบ่งเซลล์ของ PGC และเมื่อปลาอายุ 15 dpf เซลล์อวัยวะสืบพันธุ์ได้รับการพัฒนาเรียบร้อยแล้วและ PGC ในอวัยวะสืบพันธุ์จะเริ่มทำการแบ่งเซลล์เมื่อปลาอายุครบ 25 dpf ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวนี้ได้สรุปว่า ระยะของลูกปลาสายวัยอ่อนที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นปลาผู้รับวัยอ่อน คือที่อายุ 2 - 10 dpf ดังนั้นในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เปรียบเทียบกันที่ระยะ 4, 6 และ 8 dpf

ในงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermatozoa ที่สกัดได้จากอวัยวะของปลาบึกเข้าสู่ลูกปลาสายวัยอ่อน พบอัตราการรอดของลูกปลาสาย หลังจากได้รับการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ เท่ากับ 26.34 % (กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์เท่ากับ 27.32 %) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาถึงอัตราการรอดของปลาที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ชนิดอื่น ๆ พบว่าเทคนิคการปลูกถ่ายเซลล์ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอดของลูกปลา เช่นการศึกษาในปลา *Manchurian trout* (*B. lenok*) ที่พบอัตราการรอดของปลาที่ได้รับการปลูกถ่ายเท่ากับ 98 % และกลุ่มควบคุมเท่ากับ 100 % (Lee and Yoshizaki, 2016) และงานวิจัยของ Yoshikawa et al. (2018) ที่พบอัตราการรอดของปลา *Grass puffer* (*T. alboplumbus*) เท่ากับ 21 % และกลุ่มควบคุมเท่ากับ 41 % โดยสรุปการพัฒนาเทคโนโลยีการอนุบาลลูกเป็นสิ่งจำเป็นในการพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์เช่นเดียวกัน

ผลการตรวจสอบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ Spermatozoa จากปลาผู้ให้ ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์เท่ากับ 80 % ซึ่งมีค่าใกล้เคียงเมื่อเปรียบเทียบกับ

ผลงานวิจัยการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลาชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในปลา Tiger puffer (*T. rubripe*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermogonia เข้าสู่ปลา Grass puffer (*T. alboplumbeus*) พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์เท่ากับ 39 % (Yoshikawa et al., 2018) ในปลา Manchurian trout (*B. lenok*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermogonia เข้าสู่ปลา Manchurian trout (*B. lenok*) ที่เป็นหมันพบอัตราการเข้าอาศัยที่ 89 % (Lee and Yoshizaki, 2016) และในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Spermogonia เข้าสู่ปลา Sterlet (*A. ruthenus*) พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์เท่ากับ 55 % ตามลำดับ (Psenicka et al., 2016) ทั้งนี้การพัฒนาเทคนิคการสกัดเซลล์ผู้ให้ หรือการเตรียมเซลล์ผู้ให้ เพื่อให้เซลล์ผู้ให้มีความสุขภาพดี น่าจะเป็นเทคนิคที่จำเป็นในการเพิ่มอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์จากปลาผู้ให้

งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia ที่สกัดได้จากรังไข่ของปลาบึกเข้าสู่ลูกปลา สวายวัยอ่อน พบอัตราการรอดของลูกปลาสวายเท่ากับ 26.75 % (กลุ่มควบคุมเท่ากับ 37.03 %) และผลการตรวจสอบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์สืบพันธุ์ Oogonia จากปลาผู้ให้ ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาผู้รับ พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์เท่ากับ 90 % ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมาของ Psenicka et al. (2016) ในปลา Siberian sturgeon (*A. baerii*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia เข้าสู่ปลา Sterlet (*A. ruthenus*) ที่เป็นหมันพบอัตราการเข้าอาศัยที่ 70 % และในการศึกษาของ Lee et al. (2016a) ในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ทำการปลูกถ่ายเซลล์ Oogonia เข้าสู่ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) เช่นเดียวกันแต่เป็นปลาที่เป็นหมัน (Triploid) พบอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์เท่ากับ 75 %

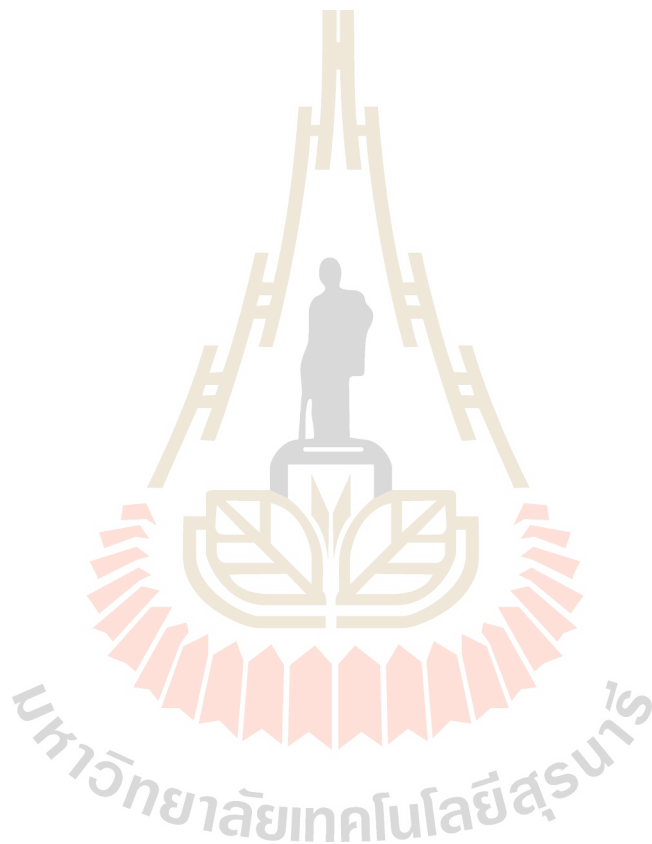
บทที่ 4

บทสรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ ในปลากลุ่ม Pangasiid โดยให้ปลาบึก (*P. gigas*) เป็นปลาผู้ให้ (Donor fish) และใช้ปลาสรวย (*P. hypophthalmus*) วัยอ่อนเป็นปลาผู้รับ (recipient larvae) เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ปลานั้น การศึกษานี้ได้ทำการพัฒนาเทคนิคและองค์ความรู้ ดังต่อไปนี้

1. การโคลนยีน *vasa* ของปลาบึก โดยให้ชื่อว่า *Pgi-vasa* เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายที่จำเพาะเจาะจงกับอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก หรือปลาผู้ให้ (Donor fish)
2. ผลการวิเคราะห์ลำดับเบส แสดงให้เห็นว่า *Pgi-vasa* มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่เป็นคุณลักษณะที่สำคัญของยีน *vasa* ดังนั้น *Pgi-vasa* จึงน่าจะเป็นยีน *vasa* ของปลาบึก
3. ผลการวิเคราะห์โครงสร้าง phylogenetic พบว่า *Pgi-vasa* จัดอยู่ในกลุ่มยีน *vasa*
4. ผลของ RT-PCR แสดงให้เห็นว่ายีน *Pgi-vasa* มีการแสดงออกเฉพาะในอวัยวะสืบพันธุ์ปลาบึกเท่านั้น ได้แก่ ที่อวัยวะ และรังไข่
5. ยีน *Pgi-vasa* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการจัดจำแนกชนิดเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ของปลาบึก โดยวิธี in situ hybridization
6. การศึกษาถึงระยะที่เหมาะสมของปลาบึกต่อการเป็นปลาผู้ให้ พบว่า ปลาบึกที่ระยะ Immature หรือที่น้ำหนักตัวตั้งแต่ 1 - 10 กิโลกรัม เหมาะสมที่จะเป็นปลาผู้ให้ เนื่องจากพบจำนวนของ spermatogonia หรือ oogonia สูงที่สุด
7. ระยะของลูกปลาสรวยวัยอ่อนที่เหมาะสมสำหรับเป็นปลาผู้รับ คือ ที่ระยะ 4 dph (day post hatching; dph)
8. เอนไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากอวัยวะปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II ให้จำนวนเซลล์ Spermatogonia 1.4×10^6 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่ออวัยวะ 100 มิลลิกรัม
9. เอนไซม์ (Dissociation enzyme) ที่เหมาะสมในการสกัดเซลล์จากรังไข่ปลาบึกคือ 0.4 % Collagenase IV และ 0.03 % Dispase II เช่นเดียวกัน ให้จำนวนเซลล์ Oogonia 5.3×10^5 เซลล์ ต่อเนื้อเยื่อรังไข่ 100 มิลลิกรัม

10. การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดได้จากอัมชะของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ Spermatogonia เท่ากับ 90 %
11. การปลูกถ่ายเซลล์ที่สกัดได้จากรังไข่ของปลาบึก เข้าสู่ลูกปลาสวายวัยอ่อน พบว่ามีอัตราการเข้าอาศัยของเซลล์ oogonia เท่ากับ 80 %
12. ปลาสวายผู้รับวัยอ่อนที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์ มีอัตราการรอดเท่ากับ 26 % ซึ่งอัตราการรอดของลูกปลาสวายไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์



บรรณานุกรม

- ไทยเกษตรศาสตร์. 2013. การเพาะเลี้ยงปลาสาวย. สืบค้นจาก www.thaikasetsart.com/การเพาะเลี้ยงปลาสาวย/.
วันที่ 9 เมษายน 2562.
- กรมประมง. 2549. การเลี้ยงปลาสาวย. *สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ, กรมประมง*.
- ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. 2555. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2553. *กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์* เอกสารฉบับที่ 12/2555.
- Blázquez, M., González, A., Mylonas, C.C., Piferrer, F. 2011. Cloning and sequence analysis of a vasa homolog in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Tissue distribution and mRNA expression levels during early development and sex differentiation. *Gen Comp Endocrinol* 170:322-333.
- Boonanuntanasarn, S., Bunlipatanon, P., Ichida, K., Yoohat, K., Mengyu, O., Detsathit, S., Yazawa, R., Yoshizaki, G. 2016. Characterization of a vasa homolog in the brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) and its expression in gonad and germ cells during larval development. *Fish physiology and biochemistry*, 42(6), 1621-1636.
- Braat, A. K., Zandbergen, T., Van de Water, S., Goos, H. J. T., and Zivkovic, D. 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics*. 216(2), 153-167.
- Cao, M., Yang, Y., Xu, H., Duan, J., Cheng, N., Wang, J., Hu, W., Zhao, H. 2012. Germ cell specific expression of Vasa in rare minnow, *Gobiocypris rarus*. *Comp Biochem Physiol A* 162:163-170.
- Carl, J., and Ferraris, JR. 2007. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. *Zootaxa* 1418: 1-628.
- Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP (2000) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 9585– 9590. doi:10.1073/pnas.160274797
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367:17–37. doi:10.1016/j.gene.2005.10.019

- Duangkaew, R., Jangprai, A., Ichida, K., Yoshizaki, G., & Boonanuntasarn, S. (2019). Characterization and expression of a vasa homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Theriogenology*, 131, 61-71.
- Fujiwara, Y., Komiya, T., Kawabata, H., Sato, M., Fujimoto, H., Furusawa, M., Noce, T. 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12258-12262.
- Hay, B., Jan, L.Y., Jan, Y.N. 1988. A protein component of *Drosophila* polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases. *Cell* 55:577-587.
- Higuchi, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Yamamoto, Y., Tsunemoto, K., Yoshizaki, G. 2011. Colonization, proliferation and survival of intraperitoneally transplanted yellow tail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukarii* recipient. *Fish Sci.* 77: 69-77.
- Huang, J., Chen, S., Liu, Y., Shao, C., Lin, F., Wang, N., Hu, Q. 2014. Molecular characterization, sexually dimorphic expression, and functional analysis of 3' -untranslated region of vasa gene in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*). *Theriogenology* 82:213-224.
- IUCN Red List of Threatened Species. 2017. สืบค้นจาก www.iucnredlist.org. วันที่ 14 เมษายน 2562.
- Kiledjian M, Dreyfuss G (1992) Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11:2655–2664
- Kobayashi, T., Kajiura-Kobayashi, H., Nagahama, Y. 2002. Two isoforms of vasa homologs in a teleost fish: their differential expression during germ cell differentiation. *Mech Dev* 111:167-171.
- Kobayashi, T., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., and Yoshizaki, G. 2007. Generation of Viable Fish From Cryopreserved Primordial Germ Cells. *Molecular Reproduction and Development*. 74 : 207–213.
- Krovel, A., Olsen, L. 2014. Exual dimorphic expression pattern of a splice variant of zebrafish vasa during gonadal development. *Dev. Biol.* 271: 190-197.
- Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Junior, P.H.A.C., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., and Franca, L.R. 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol Biochem.* 39: 3–11.

- Lee, S. and Yoshizaki, G. 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology* 72 : 165-168.
- Lee, S., Iwasaki, Y., and Yoshizaki, G. 2016b. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. *Cryobiology*. 73 : 286-290.
- Lee, S., Iwasaki, Y., Shikina, S., and Yoshizaki, G. 2013. Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 : 1640-1645.
- Lee, S., Katayama, N., and Yoshizaki, G. 2016. Generation of juvenile rainbow trout derived from cryopreserved whole ovaries by intraperitoneal transplantation of ovarian germ cells.
- Li, C.-J., Liu, L., Chen, X.-H., Zhang, T., Gan, F., Cheng, B.-L. 2010. Identification of a vasa homologue gene in grass carp and its expression pattern in tissues and during embryogenesis. *Comp Biochem Physiol B* 157:159-166.
- Liang, L., Diehl-Jones, W., Lasko, P. 1994. Localization of vasa protein to the Drosophila pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development* 120:1201-1211.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337:121-122
- Linhartová, Z., Rodina, M., Guralp, H., Gazo, I., Saito, T., and Pšenička, M. 2014. Isolation and cryopreservation of early stages of germ cells of tench (*Tinca tinca*). *Czech J. Anim. Sci.* 59 (8) : 381-390.
- Liu N, Han H, Lasko P (2009) Vasa promotes Drosophila germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3'UTR. *Gene Dev* 23:2742-2752. doi:10.1101/gad.1820709
- Marck, W.V.D. 1876. Fossile fische von Sumatra. In: H.B. Geinitz & W. von der Marck, Zur Geologie von Sumatra. *Palaeontographica* 22 : 405-414
- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., & Higuchi, K. (2012). Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of reproduction*, 86(6), 176, 171-111.

- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., Takeuchi, Y., and Yoshizaki, G. 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). **Biol. Reprod** 86 : 1–11.
- Nagasawa, K., Takeuchi, Y., Miwa, M., Higuchi, K., Morita, T., Mitsuboshi, T., Miyaki, K., Kadomura, K., Yoshizaki, G. 2009. cDNA cloning and expression analysis of a vasa-like gene in Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. **Fisheries Science** 75:71-79.
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., & Yoshizaki, G. 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103(8), 2725-2729.
- Pacchiarini, T., Cross, I., Leite, R.B., Gavaia, P., Ortiz-Delgado, J.B., Pousão-Ferreira, P., Rebordinos, L., Sarasquete, C, Cabrita, E. 2013. *Solea senegalensis* vasa transcripts: molecular characterisation, tissue distribution and developmental expression profiles. **Rep Fertil Dev** 25:646-660.
- Patino, R., Takashima, F. 1995. Gonads. In An Atlas of Fish Histology: Normal and pathological features (Ed. F. Takashima and T. Hibiya). Kodansha, Tokyo, pp.128-153.
- Pause A, Me'thot N, Sonenberg N (1993) The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. **Mol Cel Biol** 13:6789–6798. doi:10.1128/MCB.13.11.6789
- Psenicka, M., Saito, T., Rodina, M., and Dzyuba, B. 2016. Cryopreservation of early stage Siberian sturgeon *Acipenser baerii* germ cells, comparison of whole tissue and dissociated cells. **Cryology** 72 : 119-122.
- Raghuveer, K., Senthilkumaran, B. 2010. Cloning and differential expression pattern of vasa in the developing and recrudescing gonads of catfish, *Clarias gariepinus*. **Comp Biochem Physiol A** 157:79-85.
- Raz, E. 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. **Genome Biol** 1: reviews1017.1011-reviews1017.1016.
- Raz, E., 2004. Guidance of primordial germ cell migration. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 16: 169-173.

- Roberts, T.R., and Jumnonthai, J. 1999. Miocene fishes from Lake Phetchabun in north central Thailand, with descriptions of new taxa of Cyprinidae, Pangasiidae, and Chandidae. *Natural History Bulletin of the Siam Society* 47 : 153– 189.
- Rocak S, Linder P (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:232–241. doi:10.1038/nrm1335
- Schmid SR, Linder P (1992) D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol Microbiol* 6:283–292
- Schupbach, T., Wieschaus, E. 1986. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol* 113:443-448.
- Shinomiya, A., Tanaka, M., Kobayashi, T., Nagahama, Y., Hamaguchi, S. 2000. The vasa-like gene, olvas, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ* 42:317-326.
- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., and Kuwana, T. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40 : 509– 519.
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., & Yoshizaki, G. (2009). Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of reproduction*, 81(6), 1055-1063.
- Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T (2000) The most homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Gene Dev* 14:841–853. doi:10.1101/gad.14.7.841
- Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doe' re M, Linder P (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* 11: 127– 138. doi:10.1016/S1097-2765(03)00006-6
- Úbeda-Manzanaro, M., Rebordinos, L., Sarasquete, C. 2014. Cloning and characterization of Vasa gene expression pattern in adults of the Lusitanian toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Aquatic Biol* 21:37-46.
- van Winkoop, A., Booms, G.H.R., Dulos, G.J., Timmermans, L.P.M. 1992. Ultrastructural changes in primordial germ cells during early gonadal development of the common carp (*Cyprinus carpio*

- L., teleostei). *Cell Tissue Res* 267:337-346.
- Wu, X., Wang, Z., Jiang, J., Gao, J., Wang, J., Zhou, X., Zhang, Q. 2014. Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp Biochem Physiol B* 167:41-50.
- Xu, H., Gui, J., Hong, Y. 2005. Differential expression of vasa RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev Dyn* 233:872-882.
- Ye, D., Li, D., Song, P., Peng, M., Chen, Y., Guo, M., Yang, Q., Hu, Y. 2007. Cloning and Characterization of a Rice Field Eel vasa-Like Gene cDNA and Its Expression in Gonads During Natural Sex Transformation. *Biochem Genet* 45:211-224.
- Yoshikawa, H., Ino, Y., Shigenaga, K., Katayama, T., Kuroyanagi, M., and Yoshiura, Y. 2018. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology. *Aquaculture*. 493 : 302–313.
- Yoshikawa, H., Ino, Y., Shigenaga, K., Katayama, T., Kuroyanagi, M., and Yoshiura, Y. 2018. Production of tiger puffer *Takifugu rubripes* from cryopreserved testicular germ cells using surrogate broodstock technology. *Aquaculture*. 493 : 302–313.
- Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., and Takeuchi, Y. 2011. Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*. 6 : 56-61.
- Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., & Okutsu, T. (2010b). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*, 137(8), 1227-1230.
- Yoshizaki, G., Okutsu, T., Ichikawa, M., Hayashi, M., Takeuchi, Y. 2010a. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim. Reprod.* 7: 187-196.
- Yoshizaki, G., Takeuchi Y., Sakatani, S., Takeuchi, T. 2000. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout *vasa*-like gene promoter. *International Journal of Dev. Biol.* 44: 323-326.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Ihara, S., Takeuchi, T. 2002. Primordial germ cells: the blue print for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 3-12.



ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวสุรินทร์ บุญอนันตนาสาร
(ภาษาอังกฤษ) Ms. Surintorn Boonanuntasarn
2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2097 00017 95 1
3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อ

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224371, 224378

โทรสาร 044-224150

Email : surinton@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D.	Aquatic Biosciences	Tokyo University of Fisheries

6. ผลงานตีพิมพ์

Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides.

Mar. Biotechnol. 4: 256-266

Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095

Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G., Iwai, K. and Takeuchi T. 2004. Molecular cloning, expression in albino mutants, and gene knockdown studies of two types of tyrosinase mRNA in rainbow trout embryos. *Pigment Cell Res.* 17: 413-421

- Boonanuntasarn, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438-443
- Boonanuntasarn, S. 2008. Gene knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. *J. World Aquac. Soc.* 39: 311-323.
- Boonanuntasarn, S., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2008. Characterization and organization of the U6 snRNA gene in zebrafish and usage of their promoters to express short hairpin RNA. *Marine Genomics*, doi:10.1016/j.margen.2008.10.001 (available online)
- Boonanuntasarn, B., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2009. Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. *Transgenic Res.* In press
- Jangprai, A., Boonanuntasarn, S., Yoshizaki, G. 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in snakeskin gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 173:27-37.
- Vechklang, K., Boonanuntasarn, S. Ponchunchoovong, S., Pirarat, N., and Wanapu, C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aquac Nutri.* 17:385-694.
- Pitaksong, T. Kuppitayanan, P., Boonanuntasarn, S. 2013 Effects of vitamins C and E on growth, tissue accumulation, and prophylactic response upon thermal and acidic stress in hybrid catfish. *Aquac. Nutri.* 19: 148-162.
- Phymyu, N., Boonanuntasarn, S., Jangprai, A. Yoshizaki, G. Na-Nakorn, U. 2012. Pubertal effects of 17 α -methyltestosterone on GH-IGF-related genes of the hypothalamic-pituitary-liver-gonadal axis and other biological parameters in male, female and sex reversed Nile tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177: 278-292.
- Boonanuntasarn, S., Jangprai, A., Yoshizaki, G. 2012. Characterization of neuropeptide Y in snakeskin gourami and the change in its expression due to feeding status and melanocortin 4 receptor expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* 179: 184-195.
- Boonanantasarn, K., Janebodin, K., Suppakpatana, P., Arayapisit, T., Rodsutthi, J., Chunabundit, P., Boonanuntasarn, S., Sripairojthikoon, W. 2012. *Morinda citrifolia* leaf enhances osteogenic differentiation and mineralization by human periodontal ligament cells. *Dental material Journal.* 31(5): 1-9

- Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntasarn, S., Welker, T., Ponchunchoovong, S., Klesius, P.H., Wanapu, C. 2012. Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic-A and brewtech dried brewers yeast. *Journal of Applied Aquaculture*. 24:183-198.
- Tanomman, S., Ketudat-Cairns, K., Jangprai, A., Boonanuntasarn, S. 2013. Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. 166: 148-156.
- Boonanuntasarn, S., Khaomek, P., Pitaksong, T., Hua, Y. 2014. The effects of the supplementation of activated charcoal on the growth, health status and fillet composition-odor of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) before harvesting. *Aquaculture Internation*. 22:1417-1436.
- Boonanuntasarn S., Jangprai A., Yoshizaki, G. 2014. Characterization of proopiomelanocortin in the snakeskin gourami (*Trichopodus pectoralis*) and its expression in relation to feeding status. *Domestic Animal Endocrinology*. Accepted
- Wongsasak, U., Chaijamrus, S., Kumkhong, S., Boonanuntasarn, S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. *Aquaculture* 436:179-187.
- Boonanuntasarn, S., Wongsasak, U., Pitaksong, T., Chaijamrus, S. 2015. Effects of dietary supplementation with β -glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. *Aquaculture Nutrition* doi: 10.1111/anu.12302.
- Tientgam, N., Paengkum, P., Khampaka, S., Boonanuntasarn, S. 2015. Effects of inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) as prebiotic ingredients in the diet of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*. 207: 120-129.
- Tientgam, N., Paengkum, P., Sirivoharn, S., Phonsiri, K., **Boonanuntasarn, S.** 2017. The effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) tuber on the growth performance, haematological, blood chemical and immune parameters of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquaculture research*. 1-9.
- Boonanuntasarn S, Tientgam N, Pitaksong T, Piromyou P, Teaumroong N. Effects of dietary inulin and Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) on intestinal microbiota community and morphology of

- Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Aquacult Nutr.* 2017;00:1–11. <https://doi.org/10.1111/anu.12600>
- Boonanuntasarn, S., Kumkhong, S., Yoohat, K., Plagnes-Juan, E., Burel, C., Marandel, L., & Panserat, S. (2018). Molecular responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates. *Aquaculture*, 482, 117-123. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.032>
- Boonanuntasarn, S., Ditthab, K., Jangprai, A., Nakharuthai, C. 2018. Effects of microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* on growth, hematological indices, blood chemical, and immune parameters and intestinal morphology in Striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9404-0>
- Boonanuntasarn, S., Jangprai, A., Kumkhong, S., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Burel, C., . . . Panserat, S. (2018). Adaptation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to different levels of dietary carbohydrates: New insights from a long term nutritional study. *Aquaculture*, 496, 58-65. doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.011>
- Boonanuntasarn, S., Nakharuthai, C., Schrama, D., Duangkaew, R., & Rodrigues, P. M. (2018). Effects of dietary lipid sources on hepatic nutritive contents, fatty acid composition and proteome of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Proteomics*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.09.003>
- Duangkaew, R., Jangprai, A., Ichida, K., Yoshizaki, G., & Boonanuntasarn, S. (2019). Characterization and expression of a vasa homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Theriogenology*, 131, 61-71. doi:<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.022>
- Jangprai, A., Boonanuntasarn, S. (2018). Ubiquitous promoters direct the expression of fatty acid delta-6 desaturase from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 28(6): 281-292.
- Ichida K, Hayashi M, Miwa M, Kitada R, Takahashi M, Fujihara R, Boonanuntasarn S, Yoshizaki G: (2019) Enrichment of transplantable germ cells in salmonids using a novel monoclonal antibody by magnetic-activated cell sorting. *Molecular Reproduction and Development*.
- Boonanuntasarn, S., Jangprai, A., & Na-Nakorn, U. (2020). Transcriptomic analysis of female and male gonads in juvenile snakeskin gourami (*Trichopodus pectoralis*). *Scientific Reports*, 10. doi:10.1038/s41598-020-61738-0

Kumkhong, S., Marandel, L., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Boonanuntasarn, S., & Panserat, S. (2020).

Glucose Injection Into Yolk Positively Modulates Intermediary Metabolism and Growth Performance in Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Frontiers in Physiology*, *11*, 286.

doi:10.3389/fphys.2020.00286

Kumkhong, S., Marandel, L., Plagnes-Juan, E., Veron, V., Panserat, S., & Boonanuntasarn, S. (2020). Early

feeding with hyperglucidic diet during fry stage exerts long-term positive effects on nutrient

metabolism and growth performance in adult tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Nutritional*

Science, *9*, E41. doi:10.1017/jns.2020.34

Nakharuthai C, Rodrigues PM, Schrama D, Kumkhong S, Boonanuntasarn S: Effects of Different Dietary

Vegetable Lipid Sources on Health Status in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*): Haematological

Indices, Immune Response Parameters and Plasma Proteome. *Animals* 2020, *10*(8):1377.

