

สืบพันธุ์ ที่จะนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวางแผนผสมพันธุ์ของปลาดุกอุยและบิกอุยได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของยีน Gonadotropin releasing hormone (GnRH) ในปลาดุกอุยทุกรูปแบบ

2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน GnRH ในอวัยวะต่างๆ ของปลาดุกอุย ได้แก่ สมอง ต่อมใต้สมอง และ รังไข่ ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ ช่วงก่อนและหลังฤดูผสมพันธุ์

### บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปลาดุกอุย (walking catfish, *Clarias macrocephalus*) ถูกจัดอยู่ในอันดับ Siluriformes เป็นปลาไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว ด้านข้างแบน หัวแบนลง กะโหลกท้ายทอยป้านและโค้งมน เียงที่ครีบทูมีฟันเลื่อยด้านนอกและ ด้านในครีบทู ครีบทู ครีบทูหางแยกจากกัน ปลาครีบทูหางกลมมน มีหนวด 4 คู่ มีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจอยู่บริเวณช่องเหงือก ปลาดุกอุยจัดเป็นที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยถูกนำมาเป็นแม่พันธุ์ เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์กับปลาดุกเทศเพศผู้ (*C. gariepinus*) จะได้ลูกปลาดุกอุย-เทศหรือบิกอุย ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาดุกอุย และยังคงคุณภาพเนื้อที่ดีของปลาดุกอุยไว้ได้ (สุจินต์ และคณะ, 2533)

ในการผสมเทียม พ่อและแม่พันธุ์ปลาจะถูกกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ และมีการสร้างสเตอรอยด์ฮอร์โมน โดยการฉีดฮอร์โมนในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ ฮอร์โมน GTH ที่สกัดจากปลาไน (carp pituitary extract) ซึ่งอาจจะให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร (Drori และคณะ, 1994) หรือฮอร์โมน GnRHa (GnRH agonists) ที่กระตุ้นให้มีการหลั่ง GTH (Zohar and Mylonas, 2001) ร่วมกับ สารโดมเพอริโดน (domperidone) จากผลการศึกษาของ Heyrati และคณะ (2007) พบว่า การใช้ GnRHa จะให้ประสิทธิภาพในการวางไข่ของแม่ปลาดุกดีกว่าการใช้ฮอร์โมน GTH ที่สกัดจากปลาไน นอกจากนี้ในปลา grouper เพศเมียที่ถูกเลี้ยงในบ่อคอนกรีตจะมีเพียงการสะสมของสาร vitellogenin แต่ไม่พบการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ระยะสุดท้าย การตกไข่ และการวางไข่ จนกระทั่งมีการฉีด GnRHa (Hassin และคณะ, 1997)

Gonadotropin releasing hormone (GnRH=LHRH) เป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั้งหมด โดยการกระตุ้นการหลั่งของฮอร์โมน Gonadotropin จากต่อมพิทูอิทารี (Pituitary gland) (Millar, 2003) GnRH จะเป็นเปปไทด์ (peptide) ที่มีลักษณะที่บางส่วนจะเหมือนกัน (conserved peptide) และบางส่วนของที่แตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด (Gopinath และคณะ, 2004) รูปแบบของ GnRH ทั้งหมดที่พบ จะมี 16 ชนิด จะพบได้ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง 14 ชนิด และ



โปรโตคอร์เดท (protochordate) 2 ชนิด (Samoza และคณะ, 2002) ในกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลัง จะพบว่า ปลากระดูกแข็งจะเป็นตัวแทนของกลุ่มที่มีความหลากหลายของ GnRH ที่มากที่สุด รูปแบบที่พบ ได้แก่ mammalian, chicken, catfish, pejerrey, seabream, salmon, herring, medaka และ whitefish GnRH (Lethimonier และคณะ, 2004) โดยบางชนิดอาจพบได้ 2 หรือ 3 ชนิด (Zmora และคณะ, 2002) ชนิดปลาที่พบได้ 2 ชนิด ได้แก่ goldfish (*Carassius auratus*) (Klausen และคณะ, 2001) ชนิดปลาที่พบได้ 3 ชนิด ได้แก่ tilapia (*Oreochromis mossambicus*), sockeye (*Oncorhynchus nerka*), turbot (*Scophthalmus maximus*) และ barfin flounder (*Verasper moseri*) (Parhar et al., 1996; Andersson และคณะ, 2001; Amano และคณะ, 2002)

ตารางที่ 1 ลำดับกรดอะมิโนของ GnRH (Dubois และคณะ, 2002)

| GnRH        | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10                  |                        |
|-------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------|------------------------|
| Mammalian   | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Arg | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Baba และคณะ, 1971      |
| Chicken II  | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Tyr | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Miyamoto และคณะ, 1984  |
| Rana        | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Trp | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Yoo และคณะ, 2000       |
| Catfish     | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Asn | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Bogerd และคณะ, 1994    |
| Salmon      | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Sherwood และคณะ, 1986  |
| Herring     | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Carosfeld และคณะ, 2000 |
| Medaka      | pGlu | His | Trp | Ser | Phe | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Okubo และคณะ, 2000     |
| Seabream    | pGlu | His | Trp | Ser | Tyr | Gly | Leu | Ser | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Powell และคณะ, 1994    |
| Dogfish     | pGlu | His | Trp | Ser | His | Gly | Trp | Leu | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Lovejoy และคณะ, 1992   |
| Lamprey I   | pGlu | His | Tyr | Ser | Leu | Glu | Trp | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Sower และคณะ, 1993     |
| Lamprey III | pGlu | His | Trp | Ser | His | Asp | Trp | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Sower และคณะ, 1993     |
| Tunicate I  | pGlu | His | Trp | Ser | Asp | Tyr | Phe | Lys | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Di Fiore และคณะ, 2000  |
| Tunicate II | pGlu | His | Trp | Ser | Leu | Cys | His | Ala | Pro | Gly-NH <sub>2</sub> | Di Fiore และคณะ, 2000  |

โครงสร้างของ GnRH ประกอบด้วย 1) signal peptide ที่ N-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 23 ตัว 2) GnRH decapeptide จะเป็นบริเวณ bioactive peptide ที่จะถูกตัดด้วย cleavage site (Gly-Lys-Arg) และ 3) GnRH associated peptide (GAP) ที่ C-terminal ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 60 ตัว (Zmora และคณะ, 2002) บริเวณ amide-donating site และ processing site ของ GnRH จัดเป็น conserved peptide (Bogerd และคณะ, 1994) ความหลากหลายของ GnRH แต่ละรูปแบบ จะมีโครงสร้างพื้นฐานที่เหมือนกัน คือจะประกอบด้วย intron 3 ตำแหน่ง และ exon 4 ตำแหน่ง โดยที่ exon แรกจะเป็นบริเวณ 5'-UTR region exon ที่ 2 เป็น signal peptide (GnRH peptide) cleavage site และ N-terminal ของ GAP และ exon สุดท้าย จะเป็น C-terminus ของ GAP และ UTR region (Suzuki และคณะ, 2000)