ชื่อเรื่อง	การพัฒนาเซลล์ไข่กลุ่มปลา Catfish ในห้องทดลอง
ชื่อผู้เขียน	นางสาวจริยา เทพณรงค์
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.จิราพร โรจน์ทินกร

บทคัดย่อ

การเจริญพันธุ์ของปลาเพศเมียในกลุ่ม Catfish เช่น ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ใช้ระยะเวลาค่อนข้างนาน (ประมาณ 13-17 ปี) และ การเพาะพันธุ์ที่สามารถทำได้ปีละครั้งเท่านั้น อีกทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และการผันแปรของฤดูกาล ทำให้ได้ผลไม่แน่นอน คาดว่าเทคนิคการเลี้ยงโอโอไซท์ให้สุกในห้องทดลอง จะช่วยแก้ไขปัญหานี้ได้ และยังทำให้เข้าใจถึงปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการพัฒนาของโอโอไซท์ของปลากลุ่มนี้ด้วย ในการศึกษานี้ ได้ทดลองในปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) และ ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ซึ่งจัดว่าเป็นปลาในกลุ่ม Catfish โดยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อดูระยะการพัฒนาของโอโอไซท์ในตัวแม่ปลา ศึกษาการใช้น้ำยาดองใสเพื่อทำให้โอโอไซท์ใส และมองเห็นนิวเคลียสภายในเซลล์ได้ชัดเจน และ การเลี้ยงโอโอไซท์ในห้องทดลองโดยแปรผันปัจจัยของสารอาหาร สารชีวเคมี และ อุณหภูมิ

ศึกษาระยะการพัฒนาของโอโอไซท์ด้วยวิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) พบโอโอไซท์ของปลาดุกรัสเซีย และ ปลาสวายที่ระยะต่างๆ ดังนี้ ระยะที่ 1 และ 2 (primary growth phase), ระยะที่ 3 (early-vitellogenic stage:central germinal vesicle; CGV), ระยะที่ 4 (vitellogenic stage:migrating germinal vesicle; MGV), ระยะที่ 5 (peripheral germinal vesicle; PGV) และ ระยะที่ 6 (maturation:germinal vesicle breakdown; GVBD)

การทดสอบดองใสโอโอไซท์ในปลาดุกรัสเซีย โดยใช้ clearing solution 4 สูตร ได้แก่ สูตร 1 ประกอบด้วย 50 ml formalin, 40 ml acetic acid, 60 ml ethanol, 9g NaCl) สูตรที่ 2 ประกอบด้วย 4% formaldehyde และ 1% glutaraldehyde สูตรที่ 3 ประกอบด้วย ethanol:formalin:acetic acid= 6:3:1 และ สูตรที่ 4 ประกอบด้วย 5% formalin, 4% acetic acid และ Ringer's solution เพื่อศึกษาความแตกต่างของระยะโอโอไซท์ และ สารดองใสที่เหมาะสมในการตรวจสอบระยะโอโอไซท์ พบว่า clearing solution สูตรที่ 3 มีประสิทธิภาพดีที่สุด

การทดลองเลี้ยงโอโอไซท์ปลาดุกรัสเซีย และ ปลาสวาย โดยเทคนิค IVM (*in vitro maturation*) เพื่อศึกษาถึงปัจจัย และสิ่งแวดล้อม ที่มีผลต่อการพัฒนาระยะของโอโอไซท์ โดยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ Leibovitz's L-15, Dulbecco's Modified Eagle Medium

(DMEM) และ M-199 medium ที่อุณหภูมิ 23, 25 และ 28 °C และ ใช้ฮอร์โมนเสริมการพัฒนาของโอโอไซท์ 7 ชนิด ได้แก่ human chorionic gonadotropin (hCG), luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), estradiol-17β (E_2), fetal bovine serum (FBS), Insulin และ Insulin like growth factor-I (IGF-I) พบว่าการเลี้ยงโอโอไซท์ปลาดุกรัสเซีย และปลาสวายด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 medium และ M-199 medium มีแนวโน้มให้ผลทางสภาพเซลล์ และอัตรารอดของโอโอไซท์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ DMEM medium และ การเลี้ยงโอโอไซท์โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ที่อุณหภูมิ 23 และ 25 °C ให้ผลอัตราการรอดของโอโอไซท์ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 28 °C ส่วนการใช้ฮอร์โมนเสริมในปลาดุกรัสเซีย พบว่าการเลี้ยงใน L-15 medium ที่มี insulin 6 μM ที่อุณหภูมิ 23 °C มีการพัฒนาของโอโอไซท์จากระยะ MGV ไปเป็น PGV มากที่สุด (17±2%) และ การใช้ฮอร์โมนเสริมในปลาสวาย พบว่าการเลี้ยงใน L-15 medium ที่มี IGF-I 50 ng ที่อุณหภูมิ 23 °C มีการพัฒนาของโอโอไซท์จากระยะ MGV ไปเป็น PGV มากที่สุด (24±2%) ผลความแตกต่างทั้งหมดได้เปรียบเทียบด้วยโดยวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบแฟกทอเรียล (ชนิดฮอร์โมน X ความเข้มข้นของฮอร์โมน X อุณหภูมิ) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$

คำสำคัญ: ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*), ปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*), ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*), oocyte stage, clearing solution, in vitro maturation (IVM), Leibovitz's L-15, Dulbecco's Modified Eagle Medium, M-199 medium, human chorionic gonadotropin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), estradiol-17β (E_2), Fetal bovine serum (FBS), insulin และ Insulin like growth factor-I (IGF-I)

Title	*In vitro* maturation of oocyte in Catfish
Author	Miss Jariya Thepnarong
Degree of	Master of Science in Fisheries Technology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Jiraporn Rojtinnakorn

ABSTRACT

Maturation of reproductive system in female catfishes especially Mekong Giant catfish (*Pangasianodon gigas*) takes a long time (approximately 13-17 years) and breeding can be performed only once a year. Unfortunately, sometime the breeding is not successful because of environmental and seasonal fluctuations. *In vitro* maturation technique is expected to solve this problem. Furthermore it will give understanding of chemicals and physical factors that affect to ovulation of catfish. In this study oocytes of American catfish (*Clarias gariepinus*) and Asian catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) which are classified as Catfish were inquired. The experiments were study of oocyte histology from *in vivo* female fish, test of clearing solutions for transparent and obvious nuclear oocytes, and study of *in vitro* maturation (IVM) by variation of medium, biochemical factors and temperature.

Study of appropriate techniques of histology found that oocyte stage of both fishes has identified in to 6 stages is stage I and II (primary growth phase), stage III (early-vitellogenesis: central germinal vesicle; CGV), stage IV (vitellogenic stage: migrating germinal vesicle; MGV), stage V (peripheral germinal vesicle; PGV) and stage VI (maturation: germinal vesicle breakdown; GVBD).

Clearing solution was used to obvious oocytes and observable nucleaus. Different 4 formulae were tested; clearing 1 (50 ml formalin, 40 ml acetic acid, 60 ml ethanol, 9 g NaCl), clearing 2 (4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde), clearing 3 (ethanol:formalin:acetic acid = 6:3:1 v/v/v) and clearing 4 (5% formalin, 4% acetic acid and Ringer's solution) It is revealed that clearing 3 showed the best morphology and clear cell for both catfishes.

IVM of American and Asian catfish oocytes were studied by using 3 culture media (Leibovitz's L-15, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and M-199 medium, at 3 temperatures (23, 25 and 28 $^{\circ}$C), and 7 oocyte maturation hormones (human chorionic

gonadotropin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), estradiol-17β (E_2), Fetal bovine serum (FBS), insulin and Insulin like growth factor-I (IGF-I)). The results showed that L-15 and M-199 media at 23 and 25°C showed satisfactory oocyte form and high survival rate when compared with DMEM medium for both catfish oocytes. For temperatures test all media at 23 and 25°C showed satisfactory oocyte and high survival rate when compared with culture at 28°C for both catfish oocytes. For supplement hormone experiment, development of oocyte from central germinal vesicle (CGV) stage to peripheral germinal vesicle (PGV) stage was observed. In American catfish oocytes cultured in L-15 medium with 6 μM insulin at 23°C showed the best development (17±2% of PGV stage oocytes). In Asian catfish cultured in L-15 medium with 50 ng IGF-I at 23°C revealed the highest percentage of PGV stage oocyte (24±2%). The differences were analyzed by factorial statistic method (hormone x hormone's concentrate x temperature) with significance at $P<0.05$.

Keywords: Mekong Giant catfish (*Pangasianodon gigas*), American catfish (*Clarias gariepinus*), Asian catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), oocyte stage, clearing solution, *in vitro* maturation (IVM), Leibovitz's L-15, Dulbecco's Modified Eagle Medium, M-199 medium, human chorionic gonadotropin (hCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP), estradiol-17β (E_2), Fetal bovine serum (FBS), insulin and Insulin like growth factor-I (IGF-I)