

บทคัดย่อ

การพัฒนารังไข่ของปลาดุกอยู่ในรอบปีจะมีช่วงเวลาที่ยังไข่พักตัวเช่นเดียวกับในปลาดุกชนิดอื่นๆ ในการศึกษาที่ผู้วิจัยได้ตรวจสอบพัฒนาการรังไข่และการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีการเจริญพันธุ์ (GSI) แต่ละเดือนของแม่ปลาดุกที่อยู่ในบ่อดินเป็นเวลา 1 ปี (เมษายน 2551 ถึงมีนาคม 2552) ในเดือนตุลาคม 2551 เมื่อปลามีอายุ 14 เดือน ได้สุ่มตัวอย่างปลาจากบ่อดินและนำมาเลี้ยงในตู้กระจกที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C และ 35°C นาน 6 สัปดาห์ และตรวจรังไข่ปลาทุก 2 สัปดาห์ พบว่าแม่ปลาที่เลี้ยงในบ่อดินมีค่า GSI สูงสุดในเดือนกรกฎาคม ($13.91 \pm 3.63\%$) ส่วนแม่ปลาที่เลี้ยงในตู้กระจกควบคุมอุณหภูมิปรากฏว่าพัฒนาการของไข่ระยะ 4 และ 5 เพิ่มขึ้นจาก 0.5% และ 4.7% ในสัปดาห์ที่ 2 เป็น 4.6% และ 19.7% ในสัปดาห์ที่ 6 และการตรวจแม่ปลาในบ่อดินในเวลาเดียวกันนั้นพบว่ารังไข่ยังอยู่ในระยะพักมีเฉพาะไข่ระยะ 2 และ 3 แม้ว่าในการทดลองไม่สามารถทำให้ไข่ปลาพัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 6 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายเนื่องจากปลาเกิดความเครียด แต่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มอุณหภูมิเป็นวิธีการที่ง่ายในการกระตุ้นให้รังไข่ปลาดุกมีพัฒนาการนอกฤดูการเพาะพันธุ์

การโคลน cDNA ของยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* พบว่าทั้งสองยีนมีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากัน (2,278 คู่เบส) ประกอบด้วย Open reading frame (ORF) จำนวน 1,950 คู่เบสซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 649 หน่วย ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองมีความเหมือนกัน 94% มีกรดอะมิโนต่างกัน 38 หน่วย และโปรตีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* มีความเหมือนกับปลาระดุกแฉ่งและสัตว์บกอื่นๆ ประมาณ 82-95% ภายใต้สภาวะปกติยีน *HSC70-1* และ *HSC70-2* มีการแสดงออกในระดับเท่าๆ กันในเนื้อเยื่อตับ เหนือก สมองและกล้ามเนื้อสันหลังของปลาดุก เมื่อปลาได้รับการฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ยีนทั้งสองมีการแสดงออกที่แตกต่างกันในเนื้อเยื่อและช่วงเวลาทดสอบ 48 ชั่วโมง โดยพบว่ายีน *HSC70-1* มีการแสดงออกในระดับต่ำในทุกเนื้อเยื่อ ขณะที่ยีน *HSC70-2* มีการแสดงออกสูงกว่าในตับและกล้ามเนื้อ ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *HSC70-2* อาจมีความสัมพันธ์กับระบบภูมิคุ้มกันของปลาดุก

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ (cDNA) ของยีน *MSTN* ในปลาดุกมีจำนวน 1,784 คู่เบส ประกอบด้วยปลาย 5' ที่ไม่ได้แปลรหัส 147 คู่เบส ส่วนของ Open reading frame (ORF) จำนวน 1,191 คู่เบสซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโน 396 หน่วย ปลาย 3' ที่ไม่ได้แปลรหัส 446 คู่เบส และ poly(A) tail จำนวน 27 คู่เบส ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *MSTN* ของปลาดุกมีความเหมือนกับปลาระดุกแฉ่งอื่นๆ เช่น ปลา channel catfish 94% ปลา common carp 78% ปลาเรนโบว์เทรา 75% และสัตว์บกชั้นสูง 60% ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *MSTN* ในปลามีความหลากหลายมากกว่าในสัตว์บกชั้นสูง และการแสดงออกของยีน *MSTN* ในสัตว์บกชั้นสูงจะพบเฉพาะในกล้ามเนื้อสันหลัง แต่ในปลาดุกยีน *MSTN* มีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆ ด้วย เช่น สมอง เหนือก กระเพาะอาหาร และหนังปลา ในระหว่างพัฒนาการของปลาดุกพบว่าในลูกปลาอายุ 1-3 สัปดาห์ยีน *MSTN* มีการแสดงออกมากที่สุด และที่อายุ 3 เดือน ยีนมีการแสดงออกต่ำสุดและการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงอายุ 3-6 เดือน

ABSTRACT

Reproductive cycle of female walking catfish, *Clarias macrocephalus* is normally interrupted by the presence of a resting phase as observed in other catfish species. Ovarian development and monthly change in GSI of females held under pond conditions was monitored over a 1-year period from April 2008 to March 2009. In October, fourteen-month old female fish were randomly collected from earthen pond and exposed to elevated temperatures at 30°C and 35°C under hatchery conditions for six weeks. Ovarian growth was determined at a 2-week interval. Significant variation of mean GSI values ($P<0.05$) was observed among months with the highest value ($13.91\pm3.63\%$) in July. Histological examination of ovaries revealed that in females held under 30°C and 35°C, the number of vitellogenic oocytes progressively increased from 0.5 and 4.7% at week 2 to 4.6 and 19.7% at week 6, whereas in the earthen pond, ovaries remained in resting stage. Although fully matured females could not be obtained, the present study suggested that temperature manipulation was probably the practical way to increase the number of maturing females outside the reproductive season for walking catfish.

Two different cDNAs encoding heat shock cognate protein 70 genes were isolated from liver of walking catfish. The length of complete cDNA sequences for walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* were identical (2,278 bp), with the open reading frame of 1,950 bp and a predicted 649 amino acid protein. Amino acid sequences of both proteins shared 94% similarity with 38 substitutions. The walking catfish *HSC70-1* and *HSC70-2* proteins shared 82-95% identity of amino acids with other teleosts, chicken and human. Under normal conditions, *HSC70-1* and *HSC70-2* transcripts were expressed at similar levels in liver, gills, brain, and skeletal muscle of walking catfish. Bacterial infection by *Aeromonas hydrophila* differentially induced the expression of *HSC70s* in these tissues during 48 h. The *HSC70-1* was constitutively expressed at low levels in most tissues, whereas, the *HSC70-2* was up-regulated at moderate and high levels in liver and skeletal muscle respectively. The significant increase in the expression of *HSC70-2* in these tissues may relate with the role of *HSC70-2* in immune response of walking catfish.

The complete cDNA sequence of walking catfish myostatin (*MSTN*) (1,784 bp) contained 147 bases of 5'-untranslated region, an open reading frame of 1,191 bp encoding 396 amino acids, 446 bases of 3'-untranslated region, and a poly(A) tail of 27 nucleotides. The deduced amino acid sequence of walking catfish *MSTN* shared 94%, 78%, 75%, and 60% identity with *MSTNs* of channel catfish, common carp, rainbow trout and higher vertebrates, including avians and mammals, respectively. Results indicated that nucleotide and amino acid sequence of fish were more variable than those in higher vertebrates. Unlike terrestrial animals in which *MSTN* transcripts were expressed only in skeletal muscle, walking catfish *MSTN* mRNA was detected in other tissues, including brain, gills, stomach and skin. Temporal expression of *MSTN* was determined in whole fish during one to three weeks post hatch and from skeletal muscle from one to six months. The *MSTN* mRNA showed highest levels of expression at 3 weeks and the expression was lowest in 3-month old fish.