



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: The Analysis of Muscle Proteins, Plasma
Proteins, and VNTR Specific for
Apolipoprotein in Diploid and Triploid
Asian Catfish *Clarias macrocephalus*

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ผิวนิม

มีนาคม ๒๕๕๒

สัญญาเลขที่ RSA3980010

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: The Analysis of Muscle Proteins, Plasma
Proteins, and VNTR Specific for Apolipoprotein
in Diploid and Triploid Asian Catfish *Clarias
macrocephalus*

ผู้วิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร. ธนิต ผิวใหม่

สังกัด: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์
นครปฐม

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Acknowledgement

We greatly appreciate financial support provided for this research by Thailand Research Fund (TRF). We are particularly thankful to Dr Vichai Boonsaeng and Khun Chonnapa Arnkaew at the Thailand Research Fund for their continual supports and encouragements, particularly for the many friendly reminders. We do also appreciate their great patience in working with us.

Many students and support staff at Silpakorn University also contributed to this work. We would particularly like to thank Siriporn Patsuriyanan, Kanok-on Dokmaisrichan and Witoon Ngow for their technical assistance.

We also appreciated the assistance from staff members of Research Center for Art and Design Materials at Silpakorn University for providing the center's formulated inks in printing the color photographs used in this report.

รหัสโครงการ: **RSA3980010**

ชื่อโครงการ: The Analysis of Muscle Proteins, Plasma Proteins, and VNTR Specific for Apolipoprotein in Diploid and Triploid Asian Catfish *Clarias macrocephalus*

ผู้ดำเนินการวิจัย: นายธนิต ผิวนิม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ อ. เมือง นครปฐม ๗๓๐๐๐

Email address: thanit@su.ac.th, thanit@UNSWalumni.com

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาเชิงเปรียบเทียบระหว่างปลาดุกอุยดิพลอยด์ (โครโมโซม 2 ชุด) และปลาดุกอุยทริพลอยด์ (โครโมโซม 3 ชุด) เริ่มด้วยการศึกษาลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสีขาวย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงและนิวเคลียสของปลาดุกอุยทริพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่าของปลาดุกอุยดิพลอยด์อย่างชัดเจน แต่ว่าเลือดของปลาดุกอุยทริพลอยด์มีความหนาแน่นของเม็ดเลือดน้อยกว่าเลือดของปลาดุกอุยดิพลอยด์ ($1.03 \pm 0.04 \times 10^7$ และ $1.57 \pm 0.05 \times 10^7$ cells/ml ตามลำดับ)

จากนั้นพบว่าเนื้อปลาดุกอุยทริพลอยด์มีปริมาณของไขมันสูงกว่าปลาดุกอุยดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (6.26 ± 0.52 และ 5.37 ± 0.47 g lipid/100g tissue ตามลำดับ, $p < 0.01$) ในขณะที่ปริมาณของโปรตีนนั้นไม่แตกต่างกัน (18.93 ± 0.88 และ 18.58 ± 0.31 g protein/100g tissue ตามลำดับ, $p > 0.05$) ถ้าพิจารณาปริมาณเฉลี่ยต่อปลาหนึ่งตัวแล้ว พบว่าปลาดุกอุยทริพลอยด์มีไขมันและโปรตีน สูงกว่าปลาดุกอุยดิพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เป็นเพราะว่าปลาดุกอุยทริพลอยด์มีขนาดใหญ่กว่าปลาดุกอุยดิพลอยด์ การศึกษาชนิดและรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าปลาทั้งสองกลุ่มมีชนิดและรูปแบบของโปรตีนเหมือนกัน โดยมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 18.6 – 120.2 kD อีกทั้งยังไม่พบโปรตีนขนาด 12.5 kD ซึ่งเป็นขนาดของโปรตีนชื่อ Gad cl ซึ่งพบในปลาคอดที่ทำให้ผู้บริโภคบางกลุ่มมีอาการแพ้ปลาบางชนิดของปลากลุ่มนี้ ดังนั้นปลาดุกอุยจึงเป็นปลาที่ผู้บริโภคสามารถวางใจได้ ซึ่งสอดคล้องกับความจริงที่ว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการแพ้ในหมู่ผู้บริโภคปลาดุกอุยเลย

เมื่อศึกษา omega-3 fatty acids ชนิด eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) พบว่าเนื้อปลาดุกอุยดิพลอยด์มีปริมาณ EPA และ DHA เท่ากับ 14.5 ± 4.5 and 130.5 ± 48.2 mg/100g tissue ในขณะที่ปลาดุกอุยทริพลอยด์มีปริมาณ EPA และ DHA เท่ากับ 38.5 ± 12.4 and 134.8 ± 50.1 mg/100g tissue ตามลำดับ ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าและควรตระหนักว่าปลาดุกอุยควรเป็นปลาชนิดหนึ่งซึ่งผู้บริโภคควรพิจารณาปลาดุกอุยจึงมีคุณค่าเด่นทางโภชนาการ ด้าน omega-3 fatty acids นี้ด้วย

เมื่อทำการศึกษากัมมันตภาพของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ในเนื้อปลา ปริมาณโคเอนไซม์ในเลือดปลา และ variable number tandem repeat (VNTR) ของอะโปไลโปโปรตีนบีที่ดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากเม็ดเลือด ไม่พบความแตกต่างของสิ่งทั้งสามนี้ในปลาดุกอุยดิพลอยด์ และ ปลาดุกอุยทริพลอยด์

คำหลัก (keywords): Diploid, Triploid, Catfish, Proteins, Lipids, VNTR

Project Code: RSA3980010

Project Title: The Analysis of Muscle Proteins, Plasma Proteins, and VNTR Specific for Apolipoprotein in Diploid and Triploid Asian Catfish *Clarias macrocephalus*.

Investigator: Dr Thanit Pewnim, Department of Chemistry at Silpakorn University, Sanamchandra Palace Campus, Nakorn Pathom 73000, Thailand

Email address: thanit@su.ac.th, thanit@UNSWalumni.com

Abstract

Diploid (2n) and cold-shocked triploid (3n) Asian catfish *Clarias macrocephalus* at eight months of age were comparatively studied by initially examining the cytological appearances of erythrocytes under a light microscope, an Epifluorescence microscope, and a scanning electron microscope (SEM). It was found that while the size of erythrocytes from triploids including their nuclei were larger than the diploids, cell density in the triploids was lower than cell density in diploids having the values of $1.57 \pm 0.05 \times 10^7$ cells/ml blood and $1.03 \pm 0.04 \times 10^7$ cells/ml blood, respectively.

When lipid contents were assessed it was found that flesh of triploids contained 6.26 ± 0.52 g lipid/100g tissue which was significantly higher than the value of 5.37 ± 0.47 g lipid/100g tissue in diploids ($p < 0.01$). Analysis of protein content showed that triploid catfish contained 18.93 ± 0.88 g protein/100g tissue which was about the same level as the value of 18.58 ± 0.31 g protein/100g tissue in diploid catfish ($p > 0.05$). When the average amount of lipid and protein were considered per individual fish it was evident that triploids had significantly more lipid, as well as more protein than diploids. This was in agreement with the fact that the triploid fish were significantly bigger than the diploid fish. Analysis of proteins by SDS-PAGE revealed that triploids and diploids contained the same pattern of proteins, having molecular weights ranging from 18.6 – 120.2 kD. Also, both triploid and diploid Asian catfish did not exhibit the 12.5 kD protein band, the well-known Gad cI allergen protein of codfish. This finding would assure consumer confidence in taking Asian catfish as part of the protein source.

Detailed investigation of fatty acid composition showed that both diploids and triploids contained substantial amount of the two important omega-3 fatty acids, the eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). The values for EPA and DHA were 14.5 ± 4.5 and 130.5 ± 48.2 mg/100g tissue in diploids, and 38.5 ± 12.4 and 134.8 ± 50.1 mg/100g tissue in triploids, respectively. These finding implicates the Asian catfish as an important and economical source for omega-3 fatty acids.

When lactate dehydrogenase (LDH) activities in fillet, kynurenine (a tryptophan metabolite) in plasma, and variable number tandem repeat (VNTR) specific for apolipoprotein B in DNA isolated from nuclei of blood cells were analyzed, it was found that there were no differences in those parameters between diploid and triploid Asian catfish.

Keywords: Diploid, Triploid, Catfish, Proteins, Lipids, VNTR

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการวิจัยสำหรับทุนพัฒนานักวิจัย

1. ชื่อโครงการ: The Analysis of Muscle Proteins, Plasma Proteins, and VNTR Specific for Apolipoprotein in Diploid and Triploid Asian Catfish *Clarias macrocephalus*

2. ผู้ดำเนินการวิจัย:

2.1 ชื่อ-นามสกุล	นายธนิต ผิว نیم
2.2 คุณวุฒิ	ปริญญาเอก
2.3 ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์
2.4 โทรศัพท์	034-255797
2.5 โทรสาร	034-255820
2.6 Email	thanit@su.ac.th , thanit@unswalumni.com

3. สาขาวิชาที่ทำการวิจัย: ชีวเคมีของสัตว์น้ำ เน้นเอนไซม์โปรตีนและการดัดแปลงยีน

4. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย:

การวิจัยเพื่อดัดแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมในปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*, Gunther) ทำให้เราสามารถสร้างปลาดุกอูยที่ทุก ๆ เซลล์ของปลาโครโมโซม 3 ชุด (Triploid) ขึ้นมาได้สำเร็จ (Vejaratpimol & Pewnim, 1990) เมื่อทำ karyotyping เปรียบเทียบระหว่างปลาโครโมโซม 2 ชุด (Diploid) และปลาทรูปพลอยด์ แล้วพบว่ามีความถี่โครโมโซมเท่ากับ 52 และ 78 ตามลำดับ ($n=26$) เมื่อพิจารณาโดยทั่วไปแล้วเห็นได้ว่าปลาทรูปพลอยด์ ($2n$) และปลาทรูปพลอยด์ ($3n$) มีลักษณะภายนอกคล้ายกันมาก นอกจากนั้นปลาทรูปพลอยด์ยังสามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้เหมือนปลาดิพลอยด์ด้วย การศึกษาในช่วงต่อมาเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของปลาดิพลอยด์และปลาทรูปพลอยด์ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์พบว่า อัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมากแต่เมื่ออายุถึงเวลาที่ปลาดิพลอยด์มี gonads สมบูรณ์นั้น ปลาทรูปพลอยด์จะไม่มีการพัฒนาดังกล่าว และในช่วงเวลานี้ปลาทรูปพลอยด์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ขณะที่ปลาดิพลอยด์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและต่างจากปลาทรูปพลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ (Fast et al, 1995)

เป็นที่น่าสังเกตว่าการมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาในสัตว์ชั้นสูงเช่นมนุษย์นั้น แม้แต่เพิ่มมาเพียง 1 โครโมโซมดังในกรณีของ Down's syndrome จะมีผลกระทบเด่นชัดในหลายๆด้าน

นอกจากนั้นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่เป็นทริปพลอยด์มักจะเสียชีวิตหลังจากเกิด แต่ในกรณีของปลาทริปพลอยด์ซึ่งมีโครโมโซมเพิ่มขึ้นมาถึง 27 โครโมโซม นั้น กลับยังมีชีวิต "ดู" เหมือนเกือบปกติยกเว้นการเป็นหมัน เมื่อพิจารณาในแง่ของวิทยาศาสตร์พื้นฐาน แล้วเป็นสิ่งที่น่าสนใจและสมควรอย่างยิ่งที่จะศึกษาและวิเคราะห์ลึกลงไป ในระดับโมเลกุลของปลาทริปพลอยด์ ซึ่งน่าที่จะก่อให้เกิดความรู้ใหม่ ที่สามารถช่วยอธิบายลักษณะของการเป็นทริปพลอยด์ในปลาได้ชัดเจนเพิ่มขึ้น

5. วัตถุประสงค์ของโครงการ:

เพื่อศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบระดับชีวโมเลกุลของปลาดุกอุยดิพลอยด์ และปลาดุกอุยทริปพลอยด์ โดยต้องการได้รับข้อมูลดังต่อไปนี้

- 5.1 ทราบค่าปริมาณโปรตีนในเนื้อปลาแต่ละกลุ่มโดยทำการเปรียบเทียบกับปริมาณไขมันมีหน่วยเป็น g%/g body weight
- 5.2 ทราบชนิดของโปรตีนในเนื้อปลาและในพลาสมาหลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้น้ำหนักโมเลกุลและจำนวนแถบโปรตีนเป็นดัชนีเปรียบเทียบ
- 5.3 ทราบระดับกัมมันตภาพของ lactate dehydrogenase
- 5.4 ทราบการสั่นของปลาสองกลุ่มในการสร้างพลาสมาโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide
- 5.5 ทราบระดับของไคนูเริน ในปลาดิพลอยด์และปลาทริปพลอยด์ เพื่อเป็นดัชนีบ่งถึงเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโนจำเป็นตัวหนึ่งคือ tryptophan
- 5.6 ทราบลักษณะ VNTR (Variable Number Tandem Repeat) จำเพาะสำหรับ Apolipoprotein ในปลาดิพลอยด์และปลาทริปพลอยด์

6. คำหลัก (keywords): Diploid, Triploid, Catfish, Plasma, Proteins, Lipids, VNTR

7. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องและเอกสารอ้างอิง:

การชักนำให้ปลามีโครโมโซม 3 ชุด เป็นวิธีหนึ่งที่น่ามาใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงปลา เช่น ปลาเทราท์ (*Salmo gairdneri*) ปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) และปลานิล (*Tilapia aureus*) ปลาทริปพลอยด์เหล่านี้เป็นหมัน จึงมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดิพลอยด์ เพราะไม่มีการสูญเสียพลังงานและสารอาหารไปในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ รวมทั้งกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (Thorgaard, 1986; Wolters *et al*, 1982; Valenti, 1975) สำหรับปลาดุกอุยนั้นได้มีการทดลองได้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือปลาทริปพลอยด์ เมื่อเข้าถึงวัยที่ควรจะมีพันธุ์แล้วนั้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดุกดิพลอยด์ (Fast *et al*,

1995) สำหรับข้อดีในแง่มุมอื่นนั้นมียางานว่าการสร้างปลาเทราท์ทริปลอยด์และปลาแซลมอนทริปลอยด์นั้น ยังเป็นวิธีที่ช่วยลดอัตราการตายของปลาด้วย (Rafstie *et al*, 1977; Solar *et al*; 1984) ทั้งนี้เป็นเพราะธรรมชาติของปลาเหล่านี้ที่ เมื่อถึงฤดูวางไข่จะอพยพจากทะเลไปยังแหล่งน้ำจืดเพื่อวางไข่ การเดินทางทวนกระแสน้ำทำให้บอบช้ำและเมื่อวางไข่แล้วปลาก็จะตาย เมื่อมีการเพาะเลี้ยงปลาเทราท์ในบ่อเพาะเลี้ยงนั้น ปลาเพศเมียก็ยังคงแสดงพฤติกรรมคล้ายธรรมชาติ คือปลาใช้ลำตัวถูกับกรวดหินกันบ่อเกิดบาดแผลและมีอัตราการตายสูง การชักนำให้ปลาเทราท์มีโครโมโซม 3 ชุด ทำให้ปลาลดพฤติกรรมดังกล่าวลงส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงมีอัตราการรอดสูงเพิ่มขึ้นด้วย

ในขณะที่มนุษย์ได้รู้จักใช้ประโยชน์จากการชักนำให้ปลามีโครโมโซม 3 ชุดมาโดยตลอดนั้น เรายังขาดความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับชีวเคมีของปลาทริปลอยด์อยู่มาก โดยเฉพาะความเข้าใจในระดับยีน โปรตีน และเอนไซม์ ในระดับโปรตีนโดยรวมนั้น Richter *et al* (1987) ได้ทำการศึกษาพบว่าปลาดุกแอฟริกาทริปลอยด์มีอัตราการสะสมไขมันสูงกว่าโปรตีน แต่ไม่ได้ศึกษาเปรียบเทียบกับปลาดุกแอฟริกาดิพลอยด์ สำหรับการศึกษาในระดับดีเอ็นเอนั้นยังไม่ปรากฏว่ามีรายงานใดๆ ออกมาเกี่ยวกับปลาทริปลอยด์ การวิเคราะห์หา VNTR (Variable Number Tandem Repeat) เป็นสิ่งที่น่าสนใจและควรจะนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของปลาได้ดี เพราะได้มีการใช้ genetic marker ดังกล่าวได้ผลดีแล้ว ในงานอื่นๆ โดยเฉพาะในส่วนที่เกี่ยวข้องกับดีเอ็นเอของมนุษย์ (Poremba *et al*, 1994; Rathjen & Robins, 1996) โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะแสวงหาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับปลาดุกอูยดิพลอยด์และปลาดุกอูยทริปลอยด์ในระดับโมเลกุล โดยใช้เทคนิคใหม่ๆ ทางชีวเคมีโมเลกุล (Molecular Biochemistry) ซึ่งได้มีการพัฒนาขึ้นมาอยู่ตลอดเวลา

8. การเชื่อมโยงกับนักวิจัยที่เป็นผู้เชี่ยวชาญในสาขาที่ทำการวิจัย:

ปัจจุบันผู้เสนอโครงการวิจัยได้ทำงานร่วมกับนักวิจัยชาวอเมริกา คือ Dr. Arlo Fast และ Dr. Josef Seifert อยู่ ดังผลงานวิจัยร่วมที่แสดงแล้ว ความร่วมมือจะขยายไปยัง Dr. Peter Rathjen ณ University of Adelaide, Australia เกี่ยวกับงานด้าน genetic markers ในโอกาสต่อไป และในระหว่างวันที่ 8-19 มกราคม พ.ศ. 2539 Dr. Rathjen และเพื่อนร่วมงานคือ Dr. Allan Robins ได้มาจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง "Production of Recombinant Mammalian Proteins" ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ผู้เชี่ยวชาญทั้งสองได้ปูพื้นฐานด้านเทคนิคในส่วนที่ดีเอ็นเอไว้ดีเยี่ยม

9. ระเบียบวิธีวิจัย:

- 9.1 ค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติม โดยเน้นแหล่งข้อมูลที่สามารถเชื่อมโยงผ่าน computer online และ CD-ROM เป็นหลัก
- 9.2 จัดซื้อวัสดุ สารเคมีและอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับงานวิจัย
- 9.3 ทำการผสมเทียมปลาดุกอุยและชักนำกลุ่มหนึ่งให้เป็นปลาทริปพลอยด์ตามวิธีของ Vejaratpimol & Pewnim (1990) ทำการเลี้ยงปลาดุกดิพลอยด์และทริปพลอยด์จนถึงวัยเจริญพันธุ์ โดยทำการเช็กการพัฒนาทางเพศเป็นระยะๆ จนปลามีอายุ 8 เดือน
- 9.4 สุ่มตัวอย่างปลาทั้งสองกลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว หาค่าโปรตีนทั้งหมดและไขมันทั้งหมดในปลาแต่ละตัวโดยวิธี Kjeldahl digestion-ammonia titration และ Soxhlet extraction ตามลำดับ
- 9.5 ศึกษาชนิดของโปรตีนในกล้ามเนื้อโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส
- 9.6 วิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของ Lactate dehydrogenase ในกล้ามเนื้อปลาโดยการทำ continuous assay โดยใช้ UV-Visible spectrophotometer ความยาวคลื่น 340 nm.
- 9.7 ศึกษาการตอบสนองของปลาดิพลอยด์และปลาทริปพลอยด์ต่อสารกระตุ้นคือ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดมาจากแบคทีเรียแกรมลบ
- 9.8 วัดหาระดับไคนูเรนิน (kynurenine) ในเลือดปลาดุกดิพลอยด์และปลาดุกทริปพลอยด์ โดยใช้ HPLC ทำการทดลองนี้ด้วยเหตุผลที่ว่าปลาดุกเป็นปลากินเนื้อและเนื่องจากทริปโตเฟนเป็นกรดอะมิโนจำเป็นตัวหนึ่ง การวัดหาระดับไคนูเรนินซึ่งเป็น metabolic product ของทริปโตเฟนย่อมเป็นเครื่องบ่งชี้ความแตกต่างในทางเมตาบอลิซึมได้ระดับหนึ่ง
- 9.9 สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดของปลาทั้งสองกลุ่ม ทำการขยายดีเอ็นเอ (DNA amplification) โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) จำเพาะต่อยีนอะโพลิโปโปรตีน (apolipoprotein gene) ซึ่งปรากฏอยู่ในลักษณะ VNTR การขยายดีเอ็นเอนี้จะใช้เทคนิค PCR (polymerase chain reaction) โดยมี Tag polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธี agarose gel electrophoresis สำหรับ primers นั้นในตอนแรกจะใช้ primers ที่มีจำหน่ายอยู่ก่อนแล้วจึงพิจารณาการใช้ primer ที่มีความจำเพาะดีขึ้นต่อไป

10. ขอบเขตการวิจัย:

ทำการวิเคราะห์ลักษณะทางชีวเคมีของปลาดุกอุยโครโมโซม 2 ชุด และปลาดุกอุยโครโมโซม 3 ชุดตามวิธีที่กล่าวมาแล้วในระเบียบวิธีวิจัย อาจจะมีการเจาะลึกในข้อ 9.7 หาก

พบว่ามีการสร้างโปรตีนใหม่ๆ ขึ้นจากการกระตุ้นโดย LPS ทำการตรวจสอบว่าโปรตีนใหม่นั้นคืออะไร

11. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย:

11.1 อุปกรณ์ที่มีอยู่แล้ว

Refrigerated Superspeed Centrifuge, Ultracentrifuge, HPLC ถังเลี้ยงปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 เมตร

11.2 อุปกรณ์ที่จำเป็นต้องหาเพิ่ม

ตู้เย็น 4°C สำหรับเก็บสารละลาย

ตู้เย็น -20°C สำหรับแช่แข็งวัสดุที่ไม่เสถียร

ตู้เก็บสารเคมีปราศจากความชื้น

เครื่องเหวี่ยงชนิด microcentrifuge

ชุดอิเล็กโตรโพรสิสสำหรับแยกดีเอ็นเอ

ไมโครปิเปตขนาด 1-20, 20-100, 100-1,000 และ 1,000-5,000 ไมโครลิตรตามลำดับ

12. แผนงานตลอด 3 ปี:

ปีที่ 1

1. ค้นคว้าเอกสารเพิ่มเติมรวมทั้งเอกสารจากต่างประเทศ
2. จัดซื้อสารเคมีและเครื่องมือ
3. ทำการผสมเทียมปลาตุ๊กตงูเพื่อผลิตปลาดีปลอยด์ และส่วนหนึ่งชักนำให้เกิดปลาทรูปลอยด์
4. เลี้ยงปลา 2 กลุ่มจนมีอายุครบ 8 เดือน
5. เก็บตัวอย่างเนื้อปลา เลือดปลา (แล้วเตรียมพลาสมา) และลำไส้เล็กโดยเก็บไว้ที่ -70°C
6. หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณไขมันทั้งหมดในปลา 2 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว
7. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 1 และเขียนต้นฉบับส่งตีพิมพ์

ปีที่ 2

1. จัดซื้อสารเคมีและเครื่องมือเพิ่มเติม
2. ผลิตปลาตุ๊กตงูดีปลอยด์และทรูปลอยด์รุ่นที่ 2 และเลี้ยงจนครบ 8 เดือน
3. ศึกษาชนิดของโปรตีนในกล้ามเนื้อและในพลาสมาจากตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้
4. หากัมมันตภาพของเอนไซม์ lactate dehydrogenase จากตัวอย่างที่เก็บไว้
5. เก็บตัวอย่างปลาบางส่วนที่เลี้ยงครบ 8 เดือนไว้ใช้ในการทดลอง
6. ฉีด LPS ให้กับปลา 2 กลุ่ม เก็บตัวอย่างเลือดแล้ววิเคราะห์หาโคเลสเตอรอลโดย PHLC

7. รายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 2 และเขียนต้นฉบับส่งตีพิมพ์

ปีที่ 3

1. จัดซื้อสารเคมีและเครื่องมือ
2. สกัดดีเอ็นเอจากเซลล์เม็ดเลือดของปลาทั้งสองกลุ่มแล้วทำ PCR ตรวจหา VNTR ของอะโปไลโปโปรตีน
3. เขียนรายงานทั้งโครงการวิจัยและเขียนต้นฉบับส่งตีพิมพ์

13. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ:

- 1) เกิดองค์ความรู้ใหม่ทางชีวเคมีของปลาดุกอุยโดยเฉพาะในเชิงเปรียบเทียบระหว่างปลาดุกดีปพลอยด์และปลาดุกทริพลอยด์
- 2) องค์ความรู้ใหม่ที่ได้อาจบ่งชี้ข้อได้เปรียบและข้อเสียเปรียบของปลาดุกทั้งสองกลุ่ม อาจจะเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป
- 3) ความรู้พื้นฐานที่เกิดขึ้นอาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้

14. ประโยชน์ที่ได้รับ

แสดงไว้แล้วในบทคัดย่อของผลการวิจัย

The Analysis of Muscle Proteins, Plasma Proteins, and VNTR Specific for Apolipoprotein in Diploid and Triploid Asian Catfish *Clarias macrocephalus*

Introduction

Rationale behind the induction of triploidy in fish has been for the purpose of controlling population of certain types of fish species, for increasing growth in juveniles, and for extending survival and improving growth in mature fish. Triploid fish have three sets of chromosomes instead of the two sets naturally occurs in diploid fish. Triploid fish are generally sterile due to irregular meiotic division of chromosomes resulting in reduced gonad development. Therefore, in such fish the energy consumption for sexual maturation may be avoided and more biological effort may be directed towards improving flesh quality and somatic growth (Thorgaard 1983a, 1986; Johnstone et al. 1991; Fast et al. 1995; Greenlee et al. 1995b). Induction of triploidy has been achieved in many species of fish by treatment designed to block the second meiotic division or to prevent extrusion of the second polar body from the fertilized egg. Occasionally, the retention of second polar body of the fertilized egg may happen in nature without special treatment. This would result in the natural occurrence of triploids in fish populations (Thorgaard and Gall 1979). However, in order to achieve high percentage of triploidy it becomes necessary to manipulate the process of fertilization to prevent the extrusion of the second polar body from the fertilized egg. This has been generally achieved through temperature, pressure or chemical treatment of the fertilized egg.

Methods of Induction of Triploid Fish

Triploidy has been successfully induced in fish by inhibiting the release of the second polar body after fertilization. This is achieved through physical means such as pressure or temperature shocks (Thorgaard 1983b; Chourrout 1984; Solar et al. 1984; Thorgaard 1986; Henken et al. 1987; Benfey et al. 1989; Thorgaard 1990; Tiwary et al. 2004) or by chemical means such as the use of cytochalasin B (Refstie 1981). For large scale production of triploid fish pressure chambers are also available

commercially (Abiado et al. 2007). However, induction through physical methods is more popular since it is relatively simple, less expensive, and free from potential side effects of chemicals. Triploid fish are referred to as autotriploids when fish of the same species are crossed, and as allotriploids when fish from different species are used in crossing. All together the two types of triploidy have been induced in more than 85 fish species (Benfey et al. 1989; Benfey 1999).

Triploid Fish Survival and Growth Rate

The method for induction of triploidy described above results in triploid fish which are widely known as meiotic triploidy. Since the method is traumatic in nature one would, therefore, expect certain impacts on fertilized eggs. Malison et al (1993) studied the effect of heat and pressure shocks on yellow perch *Perca flavescens* and concluded that heat and pressure shocks exerted negative influence on growth that was independent of changes in ploidy. Attempts have been made to produce another type of triploids called interploid triploids by first creating tetraploid (4n) fish. Subsequent mating between tetraploid and normal diploid (2n) fish should automatically result in the production of triploid (3n) offspring. This method would ensure 100% triploidy, thus, bypassing the cost of having to verify ploidy status. Besides, the interploid triploids would not have to experience the traumatic period of shocks as in the case of meiotic triploids. Myers and Hersberger (1991) found that the interploid triploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* derived from tetraploid male x diploid female experienced a low level of fertilization success (55.9%) compared to heat-shocked triploids (94%). The interploid triploids showed a much better growth during the first 63 days but heat-shocked triploids subsequently caught up, and at the end of the experiment there was no difference in weights. More studies are needed before we can judge the benefit of interploid triploids fully. In the meantime, meiotic triploidy induction is still the method of choice for researchers and aquaculturists.

Triploids are commonly assumed to be sterile as a result of the extra set (1n) of chromosomes (Lincoln 1981; Lincoln and Scott 1984). Triploidy induction can, therefore, be a useful means of improving fish growth, particularly when sexual maturity normally occurs before the fish reach market size (Purdom 1972; Fast et al. 1995). However, the benefit on improved growth rate is not universal and seems to be

species specific (Purdom 1972; Fast et al. 1995; Qin et al. 1998). Mixed results on the effect of triploidy on growth have been reported. Triploid channel catfish *Ictalurus punctatus* had a higher average weight than diploid fish beyond the age of eight months (Wolters et al. 1982; Wolters et al. 1991). Faster growth of triploid Asian catfish *Clarias macrocephalus* and Chinese catfish *Clarias fuscus* had also been observed (Fast et al. 1995; Qin et al. 1998). Triploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* grew faster after sexual maturation (Suzuki et al. 1985; Thorgaard 1986). Research work on another species revealed that heat-shocked triploid rohu *Labeo rohita* grew better when raised to 18 months (Islam et al. 1994). Some studies on Atlantic salmon *Salmo solar*, on the other hand, showed that triploids exhibited only comparable growth rate as diploids (Johnstone et al. 1991; Carter et al. 1994). A few reports exist, however, showing that triploidy resulted in inferior growth. For example, it was reported by Cherfas et al. (1994) that mean body weight of triploid common carp *Cyprinus carpio*, although appeared to be functionally sterile, was only about 85% of the weight of diploid controls. Galbreath et al (1994) observed that when triploid Atlantic salmon were reared together with diploid fish in fresh water the former had lower growth rate.

Cytological Characteristics of Triploid Fish

Since triploid fish have an extra set of chromosomes (3n) one would anticipate that each cell would be larger than the diploid (2n) counterpart. Our earlier studies (Vejaratpimol and Pewnim 1990; Fast et al. 1995; Thititananukij et al. 1996) showed that all erythrocytes from triploid Asian catfish (*Clarias macrocephalus*) were larger than the diploids. In the latter study erythrocyte nuclei from normal diploid (2n) and cold-shocked triploid (3n) Asian catfish *Clarias macrocephalus* were comparatively stained with a fluorescent dye, ethidium bromide and with a bright-field stain, Giemsa (Thititananukij et al. 1996). Both stains produced comparable quality for visual comparisons. There were significant differences between nuclear dimensions of 2n and 3n cells. Triploid nuclei were larger and more elongate than diploid nuclei.

Biochemical and Behavioral Characteristics of Triploid Fish

Since each cell of triploids has an extra set of chromosomes, it is apparent that triploid individual has an increased gene dosage. The effect of the increased gene dosage on gene expression in triploids is still not well understood. De Almeida-Toledo et al (1998) used 5-methylcytosine monoclonal antibody to evaluate chromosome methylation profiles of diploid and triploid pacu fish *Piaractus mesopotamicus* but found no significant difference between the two groups. Attempts have also been made to compare triploids and diploids at different levels. Deeley and Benfey (1995) in their study on the learning ability of brook trout *Salvelinus fontinalis*, found that triploids did not differ from diploids in their initial directional Y-maze, electric shock response threshold, or learning ability. Greenlee et al (1995) studied effects of triploidy on rainbow trout myogenesis and showed that muscle of diploids contained more mononuclear cells/g tissue than triploids. However, diploid and triploid myogenic cells differentiated similarly when compared under identical *in vitro* conditions. Parsons (1993) compared white crappies *Pomoxis annularis* and demonstrated that triploids had significantly lower concentration of circulating erythrocytes than diploids. There were no differences in the percentage of heart weight or in metabolic rate. Lincoln and Scott (1984) found no significant differences in the levels of testosterone and 11-ketotestosterone in triploid and diploid male rainbow trout *Salmo gairdneri*. However, female diploids had substantially higher levels of testosterone and estradiol than triploid females. Beck et al (1983) carried out electrophoresis analysis of the protein systems of *Ctenopharyngodon idella*, *Hypothalmichthys nobilis* and their F₁ triploid hybrid showed that the genome of both parental species were active in the triploid hybrid. They concluded that genes for enzymes were co-dominantly expressed.

A number of attentions have been paid to determining protein and lipid contents in triploids and diploids for the obvious reason that their levels would reflect nutritional values of the fish. Oliva-Teles and Kaushik (1990) showed that triploid and diploid rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* contained about the same levels of protein and lipid. Hussain et al (1995) found no difference in percent crude protein and percent crude lipid between triploid and diploid tilapia *Oreochromis niloticus*. Suresh and Sheehan (1998) studied white muscle tissues of diploid and triploid all-female

rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and found no difference in protein and RNA contents. Works on other species provided slightly different pictures, however. Saito et al (1997) showed that during a period of grow out triploid amago fish had lipid contents 2-3 times higher than the diploid fish while protein, minerals, and free amino acid did not differ significantly. Henken et al (1987) raised triploids and diploids African catfish *Clarias gariepinus* together at different proportions and found that triploids deposited more of fat but less protein. Qin et al (1998) raised triploid and diploid Chinese catfish *Clarias fuscus* separately and found that triploids accumulated significantly higher fatty acids than diploids.

Since triploidy induction can be achieved quite readily the resulted triploid fish would serve as a good model to study the effect of an extra set of chromosome on the fish. This notion was well supported by Maxime (2008). On this genetic model issue Mizgireuv et al (2004), for example, looked at the diploid and triploid genetic model to test the effect of carcinogen on organisms with and extra set of chromosome. It was found that diploid and triploid zebrafish (*Danio rerio*) showed differential sensitivity to N-nitrosodimethylamine (NDMA) in inducing hepatocarcinogenesis. It was concluded that triploid zebrafish demonstrated an overall increase in latency period in the development of hepatic tumors, a finding that can be interpreted as an increased resistance of triploid fish to the carcinogenic effect of NDMA.

Our study is an extension to earlier works on induction of triploidy in *Clarias macrocephalus* (Vejaratpimol and Pewnim 1990) and the assessment of grow-out performance in this species (Fast et al 1995). This study aimed at evaluating cytochemical as well as biochemical parameters associated with diploid and triploid Asian catfish. Firstly, cytological study on erythrocytes of diploids and triploids Asian catfish was carried out in more details using a light microscope, an Epifluorescence microscope, and a scanning electron microscope (SEM). Secondly, evaluation regarding lipid and protein levels in both diploids and triploids was carried out with a special attention to the analysis on types of protein in fish fillet using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Thirdly, an enzyme of anaerobic respiration namely lactate dehydrogenase was examined in both genetic types. Fourthly, a metabolic product of tryptophan metabolism, namely, kynurenine was evaluated in both diploids and triploids Asian catfish. Finally, the variable

number tandem repeat VNTR specific for apolipoprotein B in diploid and triploid Asian catfish was investigated.

Materials and Methods

Fish

The induction of triploidy in *Clarias macrocephalus* was carried out in a similar manner to those described by Vejaratpimol and Pewnim (1990) and Fast et al (1995) with some modifications. We replaced HCG with GnRH analog (Buserelin acetate Hoechst AG) at a dose of 5 mg/kg broodstock in combination with Motilium-M at a dose of 5mg/kg broodstock. With the new hormone we needed to inject the broodstock only once before both female and male fish were ready for artificial fertilization at about 16 h. Three broodstock females and two males were spawned manually. Broodstock's weights ranged from 250-400 g, and females always had higher weights than males. We also experienced that those males with slender bodies usually yielded better sperm quality than male broodstock with high fat. The method of triploidy induction is similar to the one described previously (Vejaratpimol and Pewnim 1990). Briefly, this involved induced ovulation, manual fertilization, and within 2 min after fertilization began, subjecting a portion of the eggs to a 30-min cold shock at 5 °C. Remaining eggs (control) and treated eggs (shocked) were then incubated at 26-28 °C. Both diploid and triploid *Clarias macrocephalus* were initially fed with fresh *Moina macropopa* up to the age of 25 days before transferring to four two-ton fiberglass tanks. We stocked diploids in two tanks and triploids in another two tanks, all with equal density of 55 fish/m². Fish were fed commercial catfish pellets and were raised up to eight months with continuous water flow. Triploid *Clarias macrocephalus* at this age were noticeably larger and weighed more than diploids, similar to those observed in the grow-out study previously reported (Fast et al 1995). Blood samples were collected from caudal veins before fish were sacrificed. At the time of sacrifice, fish were checked for ploidy status using ethidium bromide nuclear staining of erythrocytes (Thititananukij et al 1996). Both diploids and triploids were gutted and had their heads removed before keeping at -70 °C for further analysis. Figure 1 and Figure 2 summarizes photographic-wise the artificial fertilization of Asian catfish leading to mature fish used in this study.



A live female Asian catfish broodstock with swelling abdomen full of eggs ready to spawn



A sacrificed male Asian catfish broodstock showing a pair of testes



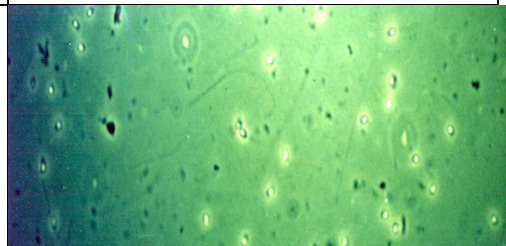
Mature unfertilized eggs could be readily emptied into a dry bowl with gentle squeezing



Testes were removed from male broodstocks



Artificially fertilized eggs were layered on a fine net submerged in flowing water



Spermatozoa from Asian catfish broodstock under a phase contrast microscope

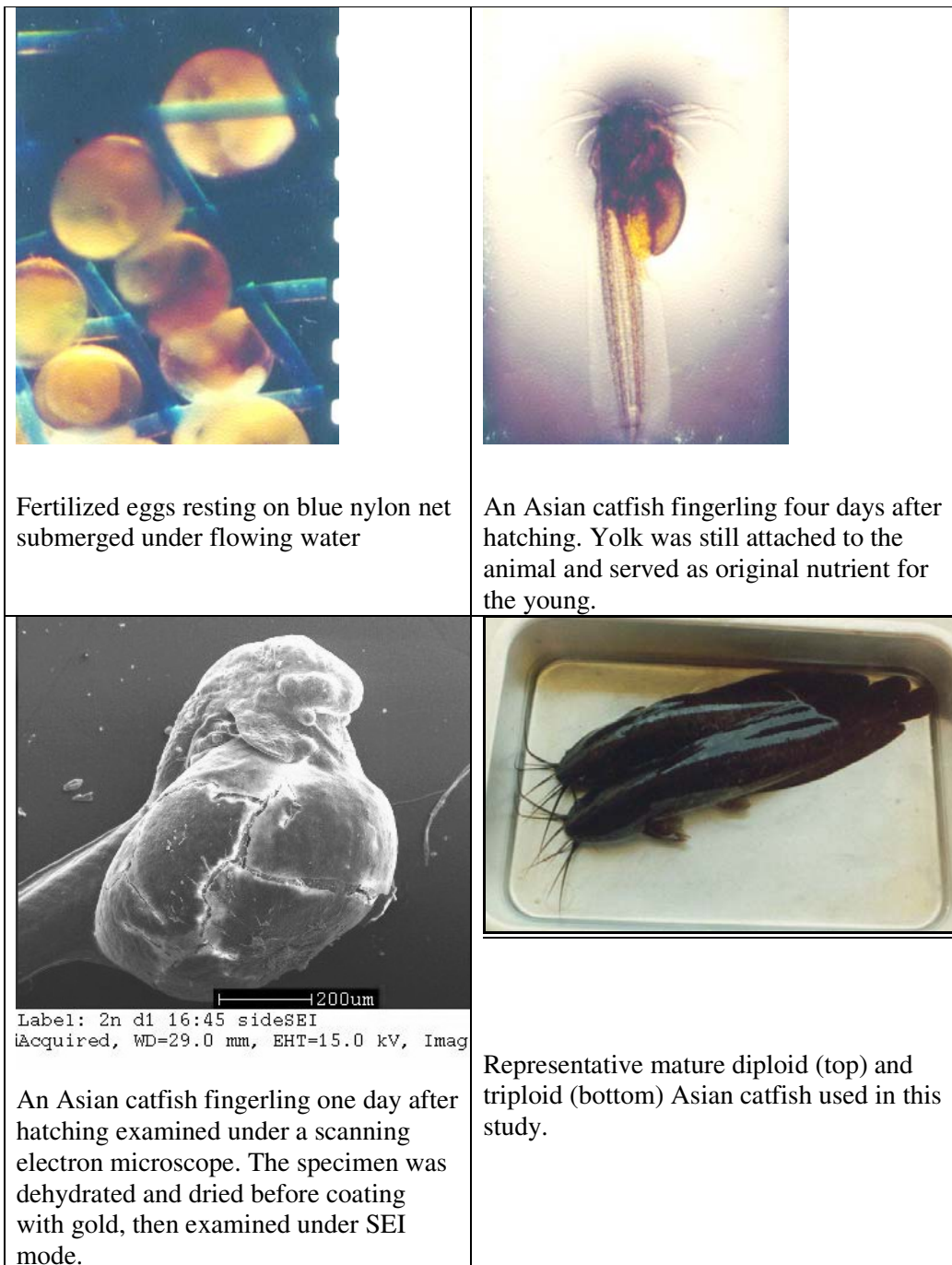


Figure 1 & 2 Steps involved in the production of diploid and triploid Asian catfish. The top figure details steps used for artificial fertilization. The bottom figure follows the development of fish from embryos until becoming the grown out fish.

Examination of Erythrocytes from Diploid and Triploid Asian Catfish

(1) Examination of erythrocytes under light microscope and Epifluorescence microscope.

Blood was withdrawn from caudal vein of fish using a 1 ml syringe coated with 0.5 % (w/v) sodium citrate. After placing a drop of blood on a clean glass slide, a smear was made by placing a short edge of another glass slide in contact with the blood, then applied a slight pressure and dragged the slide across the surface of the former slide. After air drying briefly the smeared slide was immersed in methanol for 5 min before staining with Giemsa stain for 15 min. Slides were then rinsed in distilled water, blotted dry, air dried, and examined microscopically.

In the case of the examination under the Epifluorescence microscope, the methanol fixed blood smear was immersed in ethidium bromide solution (0.5 µg/ml; Fluka 46065; Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), for 2 min. After air dried the ethidium bromide stained slides were examined with an Epifluorescence microscope at 1000 X magnification.

Density of erythrocytes from diploid and triploid fish was also assessed by counting number of erythrocytes in a volume of blood using hemacytometer under a phase contrast light microscope.

(2) Examination of erythrocytes under a scanning electron microscope (SEM).

Gently let drops of blood go through a solution of 1% (v/v) glutaraldehyde in PBS in a test tube, having a traveling distance of about 10 cm. Erythrocytes would gradually settling down at the bottom of the tube and had a dark brown jelly like appearance. Placed a Pasture pipette through the solution and gently withdrawn the bottom layer of erythrocytes and cells. Placed drops of the cells on a glass slide previously coated with 1% (w/v) gelatin. After washing with PBS for 5 times and a series of increasing concentration of ethanol ranging from 35% (v/v) to 100% (v/v) the slide was kept in a

dessicator. The samples were coated with gold before being examined under a Camscan Maxim 2500 SEM using a BEI mode and acquiring image at 20 keV.

Elemental Analysis of Bones from Diploid and Triploid Asian Catfish Using Scanning Electron Microscope and X-Ray Microanalysis

Flesh was removed from bones as much as possible by gently scrapping out flesh using a sharp scalpel. The adhering tissue was removed by immersing the bones in a solution of 1% (w/v) trypsin and left at room temperature for 4hr before washing the bones with water. The bones were placed in 1% (v/v) glutaraldehyde in PBS for 15 min before being dehydrated in a series of increasing concentration of ethanol. After drying in a dessicator the samples were coated with carbon and analyzed with SEM equipped with X-Ray microanalysis attachment. The X-Ray probe was fitted with a beryllium window and the detector cooled under liquid nitrogen.

Analysis of protein and lipid

Twenty diploids and twenty triploids were individually analyzed for protein and lipid contents. Protein was determined by Kjeldahl method similar to that described by Munro and Fleck (1969). All fillets from individual fish were minced and mixed thoroughly to obtain a homogenous sample. A portion of 10.00 g was lyophilized and used for lipid determination. Another portion of 1.00g was digested with 20.0 ml of concentrated H_2SO_4 in the presence of 16.7g K_2SO_4 , 0.3g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ and 0.6g TiO_2 for 1 h. Ammonia was distilled in the presence of 40% (w/v) NaOH and trapped in 4% (w/v) boric acid then titrated with 0.2 M HCl. Protein is calculated from N x 6.25 and expressed as g protein/100g tissue weight.

Lipid was determined using a method similar to the one described by Folch et al (1957). Lyophilized samples (10.00 g each) were Soxhlet extracted for 5 h in $\text{CHCl}_3/\text{C}_3\text{HOH}$ (2:1, v/v). After rotatory evaporated at 40 °C to dryness, total lipid was determined and expressed as g lipid/100g tissue weight.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins in Diploid and Triploid Asian Catfish

Fillet fish extracts were prepared by homogenizing 2.0g sample in 4.0 ml of 0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4 using Ultratorax homogenizer. The homogenate was centrifuged at 5,000 x g for 20 min using Beckman Avanti J25 refrigerated centrifuge. Proteins in supernatant were heated in sample buffer containing SDS and mercaptoethanol to denature proteins. Protein samples as well as molecular weight standards (BioRad, Hercules, CA) were separated by SDS-PAGE according to the method described by Laemmli et al (1976). The polyacrylamide gel, consisted of a 3% stacking gel above a 10% separating gel, were run at 10 mA/gel until bromophenol blue reached the bottom of the gel. Individual protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue R (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO) and molecular weights of fish proteins were determined from standard curve of standard proteins run concurrently.

Analysis of Omega-3 Fatty Acids from Diploid and Triploid Asian Catfish

The methylation of the fatty acid component of the Soxhlet extracted lipids were carried out by adding 5 ml of 0.5 M NaOH in methanol into 200 mg of lipids. Methyl heptadecanoate (C17:0) was added as an internal standard. The solution was refluxed for 20 min before 7 ml of boron trifluoride (BF₃) was added and the reflux was continued for another 30 min. Fatty acids were extracted into 10 ml heptane and subjected to analysis using capillary gas chromatograph equipped with capillary AT-SILAR column (30 m x 0.32 mm x 0.25 µm). The injector was set at 200 °C and the detector was at 240 °C. The experiment was run under a program temperature ramp starting from 160 °C for 2 min, then ramping at 1 °C/min to a final temperature of 190 °C and kept at this temperature for 5 min.

Analysis of lactate dehydrogenase

An enzyme extract was prepared by homogenizing flesh from diploid and triploid fish in 0.1 M TEB (Tris-EDTA-Borate) buffer, pH 9.5 before subjecting the homogenate to centrifugation at 10,000 x g for 20 min. The assay was carried out under a time scan mode using a Shimadzu UV-VIS spectrophotometer. The reaction was started by adding 25 µl of enzyme extract to 3.0 ml incubation mixture consisting of 1mM sodium lactate, 0.3 mM NAD, and 0.2 M hydrazine sulfate in 0.5 M glycine, pH 9.5. The reaction was followed spectrophotometrically by measuring the continuous decrease of absorbance at 340 nm as NAD^+ was transformed to $\text{NADH} + \text{H}^+$ while the reaction proceeded. Enzyme activity was expressed as change in absorbance at 340 nm/min.

Analysis of Kynurenine from Plasma of Diploid and Triploid Fish before and after Injecting with Lipopolysaccharide (LPS)

Ten diploid and triploid fish were used in this study. Blood samples were taken from each fish prior to intramuscular injection of 0.2 ml LPS (5mg/ ml) to each fish. Blood samples were taken again from those fish after 2 days for the analysis of kynurenine. Plasma was deproteinized by adding trichloroacetic acid (TCA) then fractionated on C18 Sep-Pak columns (Waters Chromatography Division, USA). Kynurenine was then determined at 360 nm by HPLC on CR Pecosphere reversed-phase C18 column (Perkin-Elmer, USA) using 5% CH_3CN in 0.001 M sodium phosphate buffer, pH 2.3 as a mobile phase similar to the method described previously (Pewnim and Seifert 1993). The amount of kynurenine present in the plasma was quantified by comparing the area of the peak counts with the standard kynurenine.

Analysis of VNTR Specific for Apolipoprotein B in Diploid and Triploid Asian Catfish

(1) Sample Preparation

Blood (1.0 ml) was taken from caudal vein of fish as described previously and washed three times with 5.0 ml each for 0.8% (w/v) NaCl. Blood cells were then suspended in

1.0 ml 0.8% (w/v) NaCl before 6.0 ml of 0.14 M NaCl in 0.02 M sodium citrate buffer, pH 7.4 was added. After centrifugation at 3,000 x g to pellet the blood cells, a 6.0 ml solution of 0.01 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 containing 50 mM sodium bisulfite, 20 mM EDTA, and 1.0% (v/v) detergent was added to lyse cell membranes. After centrifugation at 4,500 x g to collect cell nuclei, 2.0 ml of 0.14 M NaCl in 0.02 M sodium citrate buffer, pH 7.4 was added, then followed by 0.3 ml 10% (w/v) SDS. After incubating at 60 °C for 10 min to denature protein, 0.25 ml of 2.0 M NaCl was added. The DNA was extracted into an aqueous phase using chloroform/amy alcohol mixture (24:1, v/v). Denatured proteins were separated as a distinct band between the top aqueous phase and the bottom chloroform organic phase. DNA from the aqueous phase was precipitated by the addition of 95% (v/v) ethanol. After washing the precipitated DNA with 75% (v/v) ethanol and dried with ether. The DNA sample from fish blood cells was dissolved in 0.01 M NaCl and subjected the sample to PCR for the analysis of VNTR specific for apolipoprotein B.

(2) PCR Amplification of VNTR Specific for Apolipoprotein B

A PCR Amplification of VNTR specific for apolipoprotein B was performed using a DNA Engine (MJ research) . Final concentrations of the following components were present in the reaction mixture: 2 mM MgCl₂, 200 µM of each nucleotide (Amersham, UK), 5.0 units of Taq polymerase (Amersham, UK), 25 ng of each primer, 67 mM Tris-HCl, pH 8.8, 17 mM (NH₄) SO₄, 200 µg/ml gelatin and 0.45% Triton X-100. The sequence of primer 1 was 5'-ATGGAAACGGAGAAATTATG-3'. The sequence of primer 2 was 5'-CCTTCTCACTTGGCAAATAC-3'. After adding 5 µl of sample to the reaction mixture, final total volume of each tube was 25 µl. The thermocycling conditions were set at five minutes for initial denaturation at 94 °C followed by 35 cycles of one minute denaturation at 94 °C, five minutes annealing at 58 °C, and three minutes extension at 72 °C. A final extension of 10 minutes at 72 °C was used before the DNA Engine enter the 4 °C mode.

(3) Agarose Gel Electrophoresis

Agarose gels (2 %, w/v) were loaded with 10 µl of PCR product mixed with 2 µl of loading dye (0.04% bromophenol blue, and 5% glycerol). Phage SSP-1 DNA markers was used as standard to identify base pairs of VNTR. Electrophoresis was performed at 3 volts/cm for 16 hr. After staining with ethidium bromide, the DNA bands were visualized on UV illumination box and photographs taken.

Results and Discussion

Cytological Characteristics of Diploid and Triploid Catfish

Since triploid (3n) Asian catfish contains an extra set of chromosome in addition to the diploid (2n) Asian catfish, it is anticipated that the nuclei of each cell would be larger than the diploid counterpart. Erythrocytes became a convenient cell model for comparing cytological characteristics between the diploid fish and the triploid fish. Using Giemsa stain with the examination under a light microscope as well as using the ethidium bromide stain with subsequent viewing under an Epifluorescence microscope, we confirmed our previous studies (Vejaratpimol and Pewnim 1990; Thititananukij et al. 1996) that erythrocytes as well as the nuclei from triploid Asian catfish were significantly larger than those from diploid Asian catfish as shown in Figure 3.

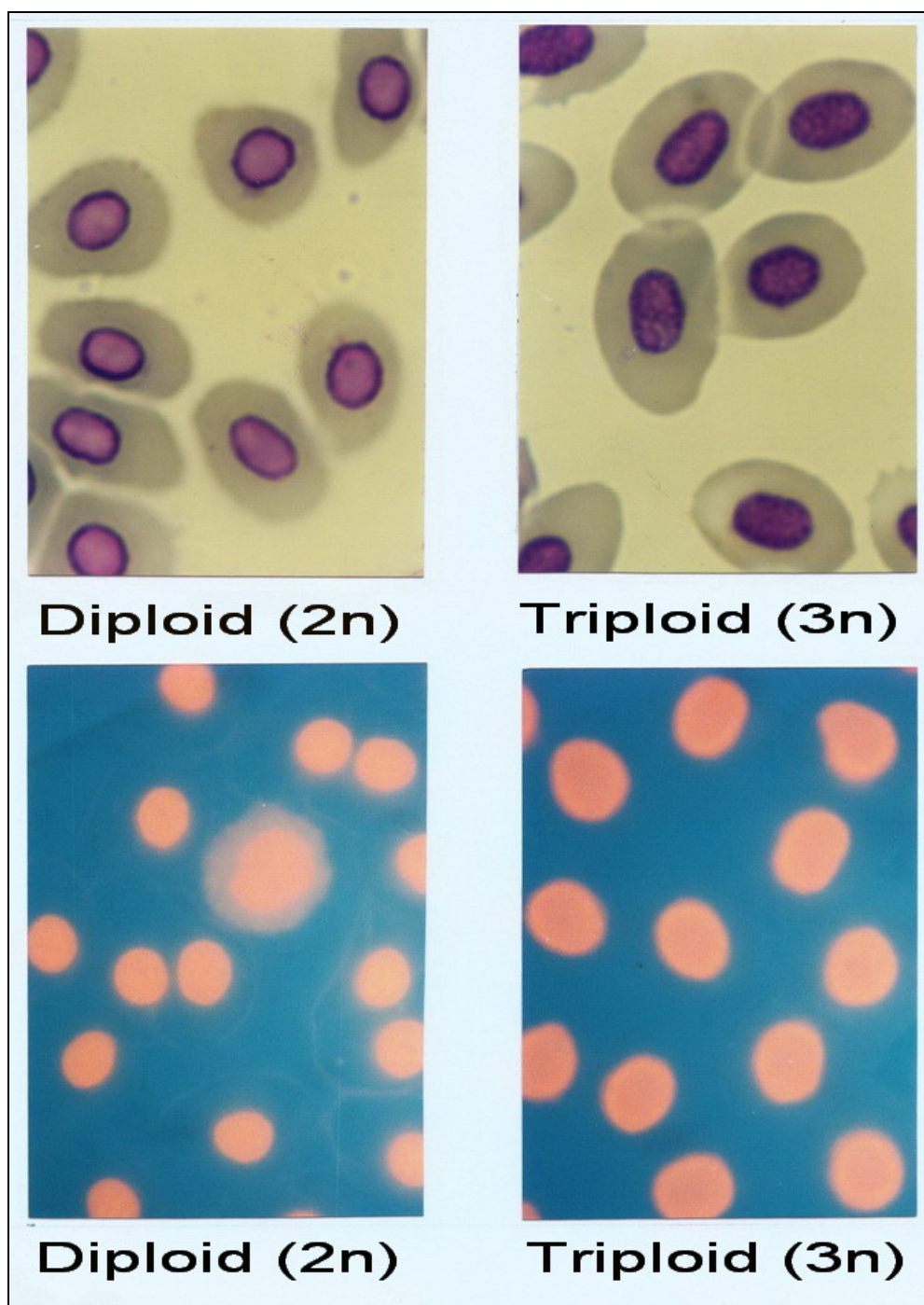
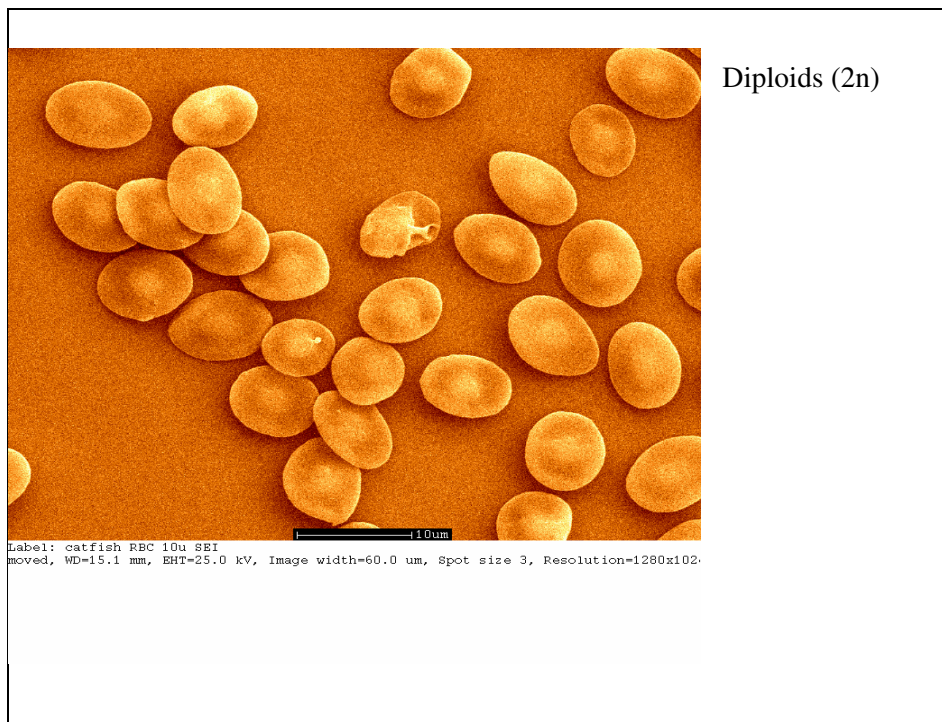


Figure 3 Erythrocytes from diploid (2n) and triploid (3n) Asian catfish as examined under light microscope after Giemsa stain (top row) and under Epifluorescence microscope after staining with ethidium bromide (bottom row). All pictures were taken at X1000 magnification.

When erythrocytes were examined in more details under a scanning electron microscope (SEM) it became evident that the presence of an extra set of chromosome in triploid Asian catfish resulted in cells becoming more elongated as shown in Figure 4 at low magnification and in Figure 5 at a higher magnification, respectively. Even though evaluation regarding the size of the nuclei is more difficult to make in this case of examination under SEM due to the fact that they are enclosed within the enveloping membranes, but it is relatively clear from the protruding portion observed that the nuclei of triploid fish are larger than those of the diploid fish.

It is interesting to note that the extra set of chromosome does force the cell to adopt the ellipsoidal shape. This may be essential in allowing these larger cells to migrate efficiently throughout the blood circulating system of the fish.



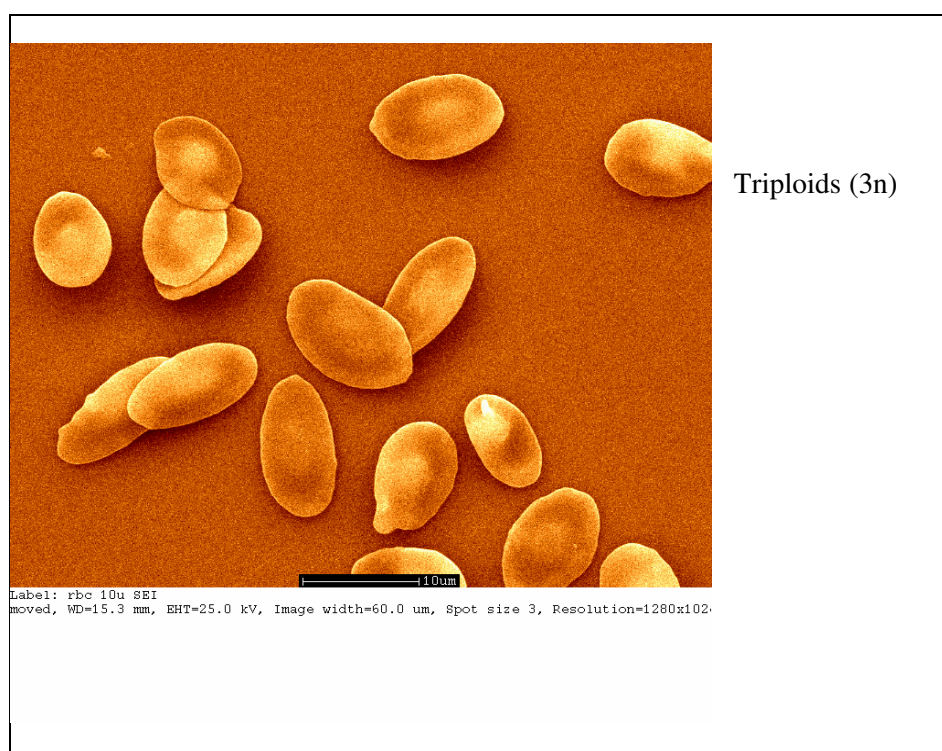


Figure 4 Scanning Electron Micrographs at low magnification showing erythrocytes obtained from diploids (2n) and triploids (3n) Asian catfish. Secondary electron image (SEI) mode was employed in this analysis. Bar indicated length in 10 μm .



Figure 5 Scanning Electron Micrographs at a higher magnification showing erythrocytes obtained from diploids (2n) and triploids (3n) Asian catfish. Secondary electron image (SEI) mode was employed in this analysis. The top bar is 10 µm and the bottom bar is 5 µm.

When populations of erythrocytes in both the diploids and the triploid fish are compared as shown in Figure 6, it was interesting to note that the density of cells in the blood from diploid fish was higher than the density of cells in the blood from the triploid fish. The values being $1.57 \pm 0.05 \times 10^7$ cells/ml blood and $1.03 \pm 0.04 \times 10^7$ cells/ml blood, respectively.

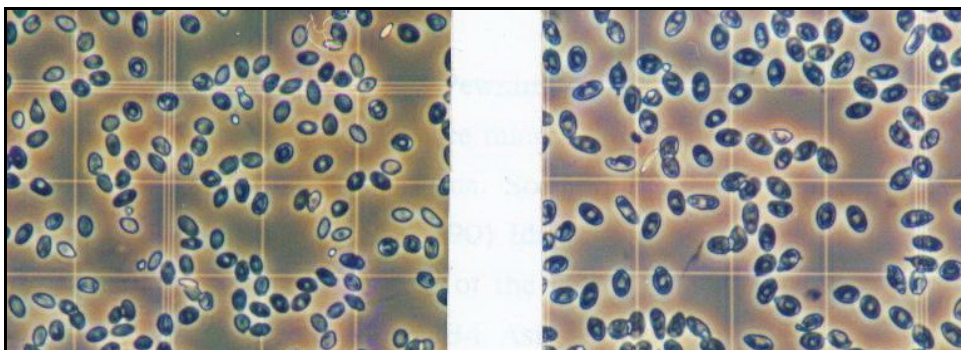


Figure 6 Determination of erythrocyte density (cells/mL blood) using hemocytometer as examined under phase contrast microscope. Left panel shows an appearance of diploid blood cells and right panel shows triploid blood cells.

This finding regarding the density of erythrocytes agreed well with the recent finding by Dorafshan et al (2008) when they studied the effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology and found that triploid salmon had lower numbers of red blood cells than diploid salmon. The density being 700,000 cells/ ml in triploids as compared to 1,120,000 cells/ ml in diploids, respectively. Another work also appeared (Gao et al 2007) reported the decreasing density of erythrocytes in triploid and tetraploid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) as compared to diploid fish. Seol et al (2008) looked at haematological parameters and respiratory function in diploid and triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus* and found that triploids also characteristically had lower concentration of circulating blood cells. Study on Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Peruzzi et al. 2005) also showed that while triploidisation led

to an increase in erythrocyte size with 32% increase in cytoplasm surface area, and 50% increase in size of the nucleus, there was a decrease in erythrocyte number by 34%.

Elemental Analysis of Bones from Diploid and Triploid Asian Catfish Using Scanning Electron Microscope and X-Ray Microanalysis

Another attempt in searching for differences between diploid and triploid Asian catfish is to look at the elemental compositions of bones. The appearance of tissues prepared for the analysis using scanning electron microscope and X-Ray microanalysis is shown in Figure 7. It can be seen that the bones were practically free from any adhering tissues, particularly proteins, since the proteins were well digested with trypsin. Dried bones were glued to an aluminum stub using carbon paste as appeared as a black background in Figure 7. This carbon is an important conducting material which would lead the electrons that arrived from an electron gun to the bones to reach ground, thus preventing the accumulation of charges on the samples.

The spectra of characteristics X-ray generated by hitting the samples with primary electrons are shown in Figure 8. The spectra revealed, as shown through the $K\alpha$ lines, that bones from diploid and triploid fish contained mostly calcium and phosphorus. This finding reflected well on the generally known composition of bones that they largely composed of calcium phosphate. However, there seemed to be no differences in elemental compositions between the two genetic groups of fish.

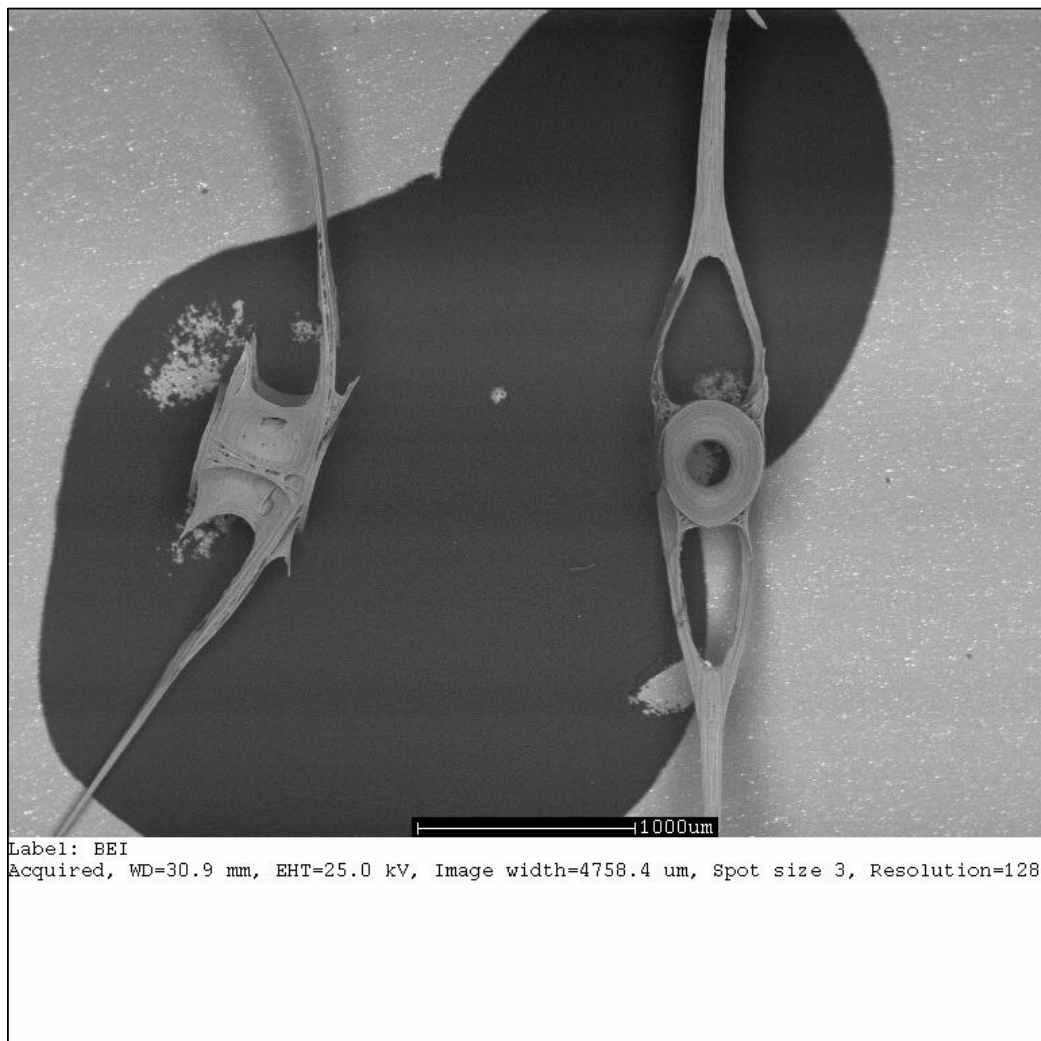


Figure 7 A representative of bone tissues from diploid (2n) and triploid (3n) Asian Catfish. The bones were subjected to elemental analysis using SEM and X-Ray microanalysis.

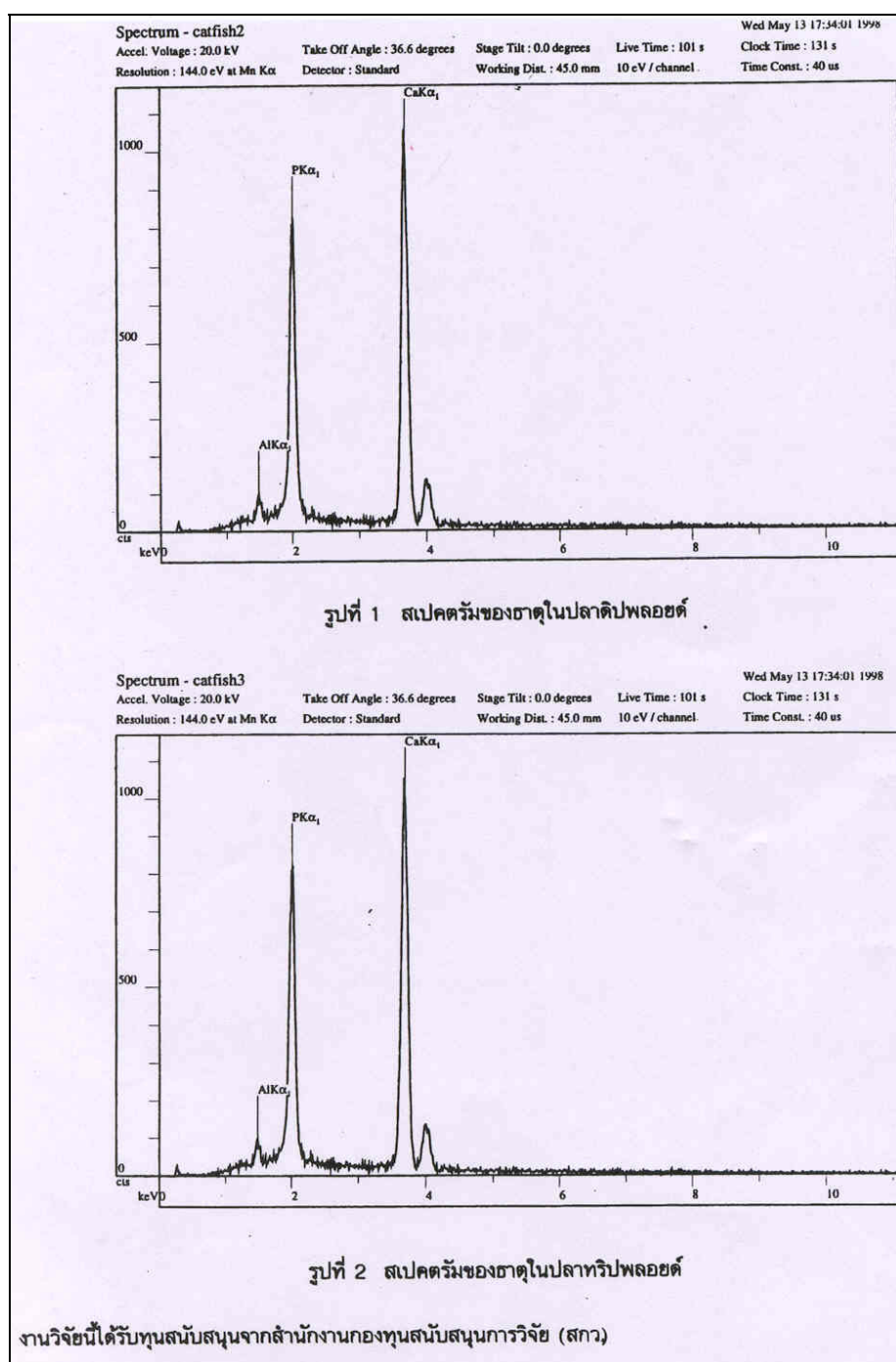


Figure 8 X-Ray Microanalysis on bone from diploid (2n) and triploid (3n) Asian catfish. The characteristics X-ray revealed calcium and phosphorus as the major components.

Lipids and Protein Content in Diploid and Triploid Asian Catfish

Lipid content in Asian catfish *Clarias macrocephalus* is shown in Figure 9 (top). Triploids contained 6.26 ± 0.52 (mean $\pm$ S.D.) g lipid/100g tissue which was significantly higher than diploid fish, 5.37 ± 0.47 g lipid/100g tissue ($p < 0.01$). When total lipid per individual fish was analyzed as shown in Figure 9 (bottom) the difference between triploids and diploids became even more pronounced (4.16 ± 0.56 vs 2.31 ± 0.53 g lipid/fish, $p < 0.01$).

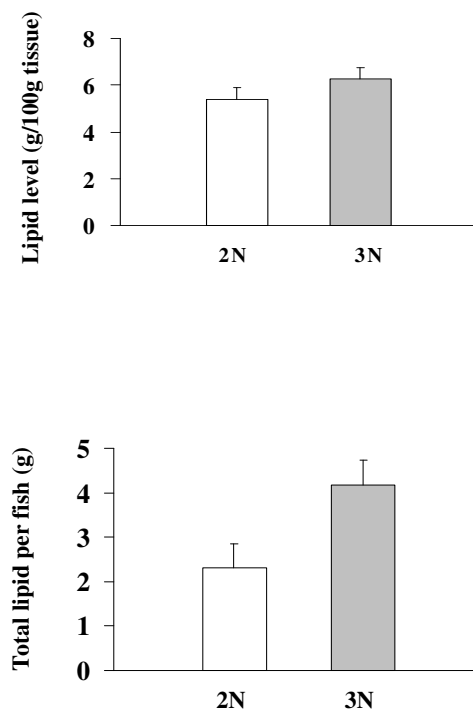


Figure 9 Lipid levels in diploid and triploid Asian catfish *Clarias macrocephalus*. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of 20 fish. Differences in lipid levels both expressed as g lipid/100g tissue and as total lipid/gutted fish were both statistically significant ($p < 0.01$, Student's t-test).

Levels of protein in diploid and triploid Asian catfish are shown in Figure 10.

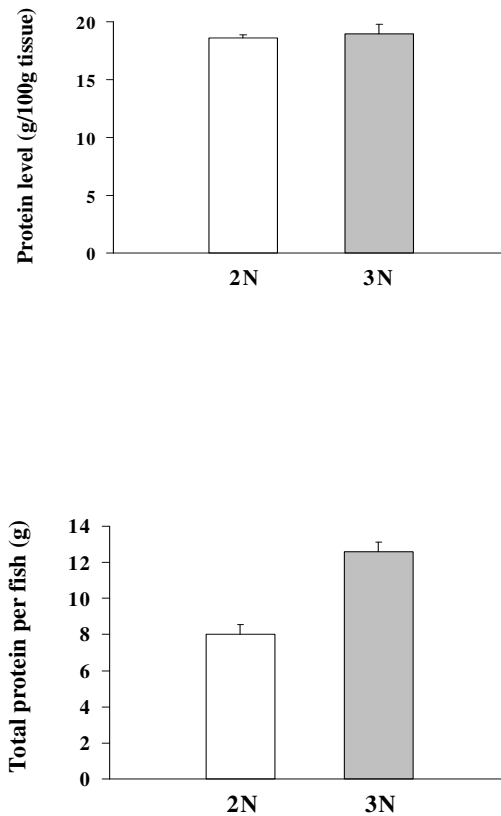


Figure 10 Protein levels in diploid and triploid Asian catfish *Clarias macrocephalus*. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of 20 fish. The difference in protein levels shown on the top (g protein/100g fresh tissue) was not statistically significant ($p > 0.05$, Student's t-test), while the values on the bottom (total protein/gutted fish) showed a difference which was statistically significant ($p < 0.01$, Student's t-test).

Result in Figure 10 showed that triploid *Clarias macrocephalus* contained 18.93 ± 0.88 g protein/ 100g fresh tissue while diploids contained 18.58 ± 0.31 g protein/ 100g fresh tissue. Protein levels in the two groups were approximately the same (Figure 10 top) and the difference was therefore not statistically significant ($p > 0.05$).

When total protein per individual fish was considered as shown in Fig 10 (bottom) triploids contained significantly higher amount of protein than diploids (12.57 ± 0.61 vs 8.01 ± 0.52 g protein/fish, $p < 0.01$).

The finding that triploid *Clarias macrocephalus* accumulated significantly higher amount of lipid than diploids (g lipid/100g tissue and g lipid/fish) was in line with our previous finding that triploids grew faster than diploids when the fish attained sexual maturation (Fast et al 1995). Our finding on lipid contents agreed with results obtained from other species, particularly the results from the Clariidae family. Henken et al (1987) showed that triploids *Clarias gariepinus* had significantly higher percent fat gain than diploids. They raised diploids and triploids together at different proportions ranging from an aquarium containing all diploids to an aquarium containing 95.8 % triploids. One set of fish received low feeding level while a duplicated set received high feeding level. Both sets of feeding level showed triploids having higher percent fat gain than diploids (5.82 vs 3.78 % for low feeding level and 7.31 vs 6.49 % for high feeding level, respectively). Qin et al (1998) raised triploid and diploid Chinese catfish (*Clarias fuscus*) separately, one group comparing diploids and triploids at low temperature and another duplicated group comparing them at high temperature. Triploids from both groups contained significantly higher level of total fatty acids (g/ 100g dry weight) than diploids (12.56 vs 8.85 for low temperature and 11.61 vs 8.59 for high temperature, respectively). Saito et al (1997) working on amago found that during a period of growth in October triploids had lipid contents 2-3 times higher than diploids. Work on rainbow trout also showed that triploid fish had 16-17 % higher lipid content than diploid fish (Fauconneau et al. 1990).

Our results with *Clarias macrocephalus* supports the notion that triploids were sterile and did not have to spend much nutrients on the development of gonads thus enable them to divert their resources more in the form of lipid reserves. Different findings, however, were also reported regarding the lipid content. Hussain et al (1995) showed that there was no difference in lipid content between triploid and diploid tilapia *Oreochromis niloticus*. Also, Oliva-teles and Kaushik (1990) studied rainbow trout juveniles *Oncorhynchus mykiss* and found that there were no differences in lipid levels between triploid and diploid fish. The differences in lipid contents thus seem to

be species specific among fish. It is worth noting also that lipid levels in rainbow trout juveniles in one group of the experiment ranged from 8.3 to 9.7 g/ 100g dry weight. These values are in comparable range to total fatty acids reported in *Clarias fuscus* by Qin et al (1998) and to total lipid in *Clarias macrocephalus* reported in this study.

Our finding that there was no significant difference in protein levels between triploid and diploid *Clarias macrocephalus* (18.93 ± 0.88 vs 18.58 ± 0.31 g/ 100g tissue) tends to support the general trend observed in other species. Suresh and Sheehan (1998) found no differences in protein levels in white muscle tissue of triploid and diploid all-female rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. In another study Hussain et al (1990) showed that there was no significant difference in protein levels of triploid and diploid tilapia *Oreochromis niloticus*. Saito et al (1997) while finding an increase in lipid levels in triploid amago over the diploids demonstrated that there was no difference in the protein levels of the two groups of fish. Oliva-teles and Kaushik (1990) also found no difference in protein levels in triploid and diploid rainbow trout juveniles. It was found that levels of protein in one set of that experiment ranged from 14.6 to 15.4 g/ 100g tissue. This is again in a comparable range with protein levels found in *Clarias macrocephalus* presented in this study.

Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins in Diploid and Triploid Asian Catfish

Attempts were also carried out to compare proteins from flesh of the two genetic groups by separating individual protein on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The result is shown alongside standard marker proteins in Figure 11.

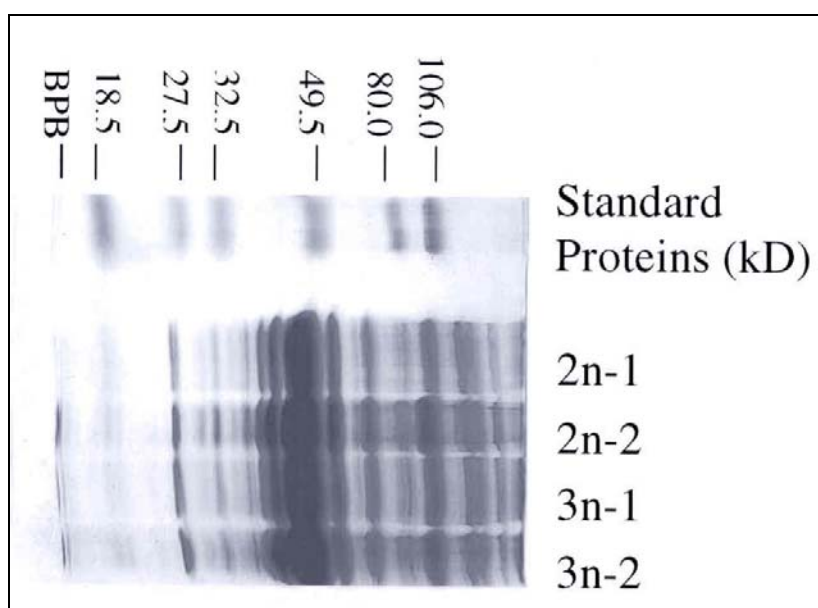


Figure 11 SDS-PAGE of proteins from fillets of diploid and triploid Asian catfish *Clarias macrocephalus*. Two representative samples from each group were run concurrently with six standard proteins. Bromophenol blue was used as the tracking dye. Labels 2n and 3n represent diploid and triploid respectively, numbers 1 and 2 indicated that they were from different fish.

Analysis for the types of protein from flesh of diploid and triploid Asian catfish by SDS-PAGE (Figure 11) revealed that both diploids and triploids contained proteins having molecular weights ranging from 18.6-120.2 kD. There were no differences in the types of proteins in both groups of the fish. Protein having MW of 39.8 kD was present the highest in amount followed by proteins having MW of 72.4, 46.8 and 52.4 kD, respectively. Other proteins were present at relatively lower levels. There was no protein with MW of 12.5 kD present in Asian catfish. The absence of this low molecular weight protein of 12.5 kD may have significant meaning in nutritional terms regarding to the allergen-free nature of the Asian catfish fillet.

Apart from the no differences in types of protein presented, SDS-PAGE analysis of proteins in fillet of *Clarias macrocephalus* also showed that there was no difference in band patterns between diploids and triploids. Among those proteins having a wide range of molecular weights starting from 18.6 – 120.2 kD, it is important to

emphasize that *Clarias macrocephalus* did not show a protein band at 12.5 kD. James et al (1997) while working on adult IgE antibody binding to fish proteins, demonstrated by SDS-PAGE that channel catfish, cod, and snapper contained predominant amounts of 12.5 kD protein. This protein was immunochemically similar to the Gad cI protein, the well-known allergen originally detected in cod. The authors used the results to explain why some people are allergic to those fish. Since no allergic effects has ever been reported regarding the consumption of Asian catfish *Clarias macrocephalus*, our finding as to the absence of this infamous 12.5 kD allergen should add comfort to those who love this delicious fish.

Omega-3 Fatty Acids from Diploid and Triploid Asian Catfish

The finding that triploid Asian catfish contained significantly higher amount of lipid than diploid Asian catfish (Figure 9) led us to investigate further and look into the fatty acid compositions, paying a particular attention to the level of omega-3 fatty acids. Despite being a freshwater fish, Asian catfish does have substantial amounts of the two well known omega3- fatty acids, the eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) as shown in Figure 12. The amounts present are in comparable ranges with the two marine organisms, namely the banana prawn and the squid (Table 1).

It is worth noting that the amount of DHA was always higher than the amount of EPA in both diploid and triploid Asian catfish. The ratio of DHA/EPA in diploid Asian catfish was 9.00 while the ratio of DHA/EPA in triploid Asian catfish was 3.50. The higher ratio of DHA/EPA could also be deduced from the study on fatty acids composition in Chinese catfish (*Clarias fuscus*) by Qin et al (1998). It could be calculated that diploid and triploid fish raised at low and high temperatures had the DHA/EPA of 1.67, 1.76, 1.61, and 1.61 in the case of diploid fish at low temperature (DL), diploid fish at high temperature (DH), Triploid fish at low temperature (TL), and triploid fish at high temperature (TH), respectively.

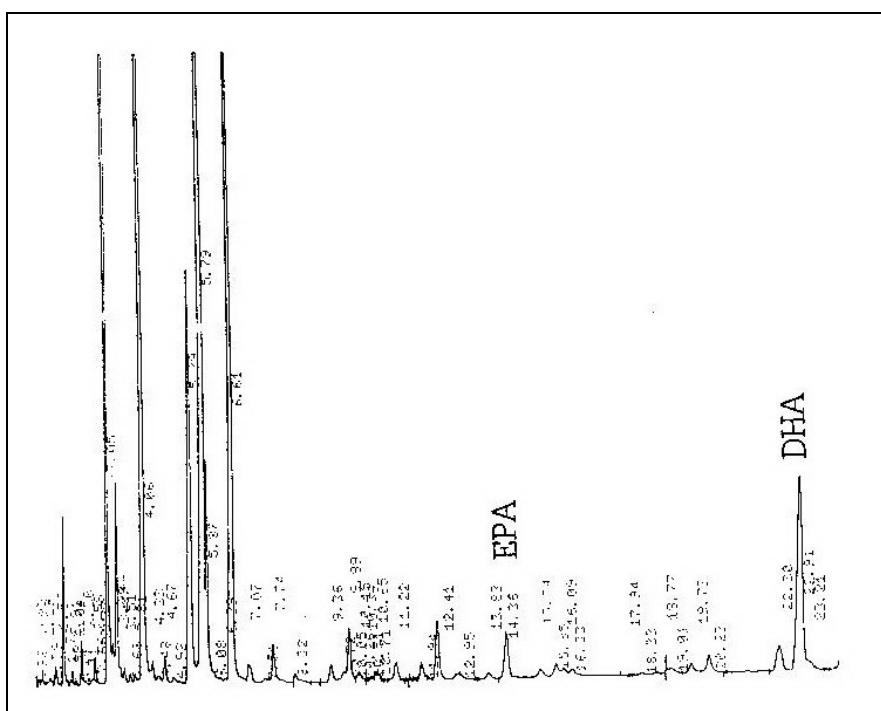


Figure 12 A typical capillary GC trace of fatty acids from an Asian catfish showing two important omega-3 fatty acids, eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6, DHA)

It is worth noting that the ratios of DHA/EPA in the case of the Chinese catfish were much lower than those in the Asian catfish. One would anticipate that the species of the fish as well as the environmental conditions, including the diets, would play major roles in contributing to these differences. The existence of high levels of EPA and DHA in Asian catfish has a positive implication in terms of nutrition, particularly for general publics. Since Asian catfish can be raised practically in most region of the country we should encourage this practice so that more cohort of our population will have a good access to these important nutrients. Those areas far away from marine foods would not be at disadvantageous position any more in terms of obtaining these omega-3 fatty acids to nourish their bodies, particularly the eyes and the brains.

Food Source (Flesh)	EPA (mg/100g tissue)	DHA (mg/100g tissue)
Diploid (2n) Asian catfish	14.5 ± 4.5	130.5 ± 48.2
Triploid (3n) Asian catfish	38.5 ± 12.4	134.8 ± 50.1
Banana shrimp (<i>P.merguensis</i>)	38.4 ± 5.4	33.2 ± 4.3
Squid	12.4 ± 4.8	43.3 ± 6.7

Table 1 Eicosapentaenoic acid (C20:5, EPA) and docosahexaenoic acid (C22:6, DHA) compositions of diploid and triploid Asian catfish as compared to two marine organisms, namely, the banana shrimp and the squid.

Lactate dehydrogenase activities in diploid and triploid Asian catfish

Apart from investigating the cytological aspects as well as the composition of the basic biomolecules such as proteins and lipids in diploid and triploid Asian catfish, it became logical to examine enzymes present in the animal tissues. Lactate dehydrogenase (LDH) was selected for the reason that it is known to be present in abundance in most of the tissues since it is one of the key enzymes involved in energy metabolism. The presence of LDH in muscle is well established and one would expect the flesh of the fish to contain an abundant amount of this enzyme. The activities of

LDH in triploid fish were found to be higher than the diploid fish (Figure 13). However, this difference is not statistically difference ($p>0.05$).

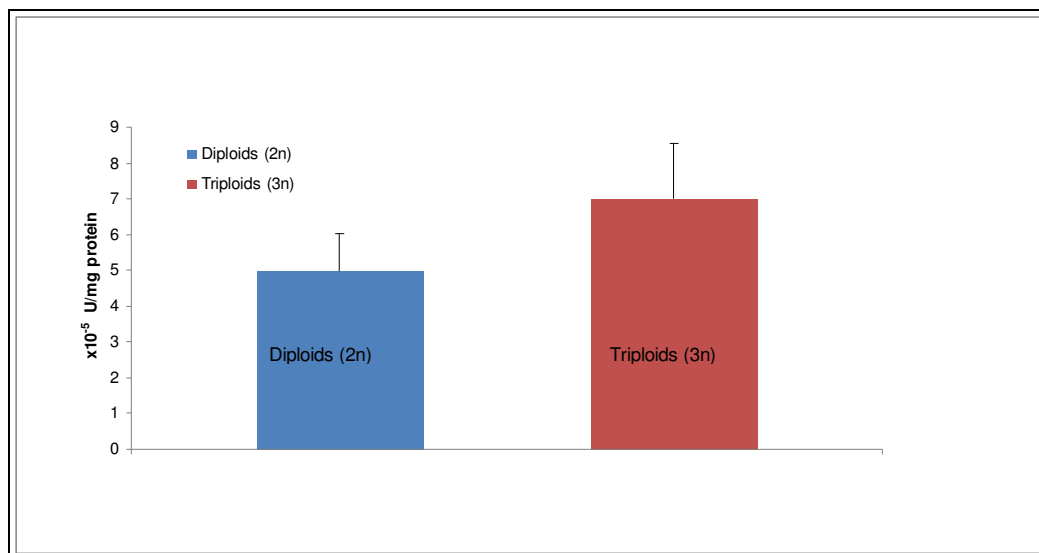


Figure 13 Lactate dehydrogenase activities in diploid (2n) and triploid (3n) Asian catfish. Activities were expressed as Unit per mg protein. The values are averages from 10 fish each.

Even though there were no reports to date on comparing LDH activities in diploid and triploid fish, other enzymes had been studied (Biswas et al. 2006). It was reported that triploid *Heteropneustes fossilis* showed sterility and higher growth potential than the normal diploid fish. Activities of some metabolic enzymes such as cytosolic NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH), mitochondrial NAD-malate dehydrogenase (NAD-MDH) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) were evaluated in liver, brain and kidney along with glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P D) in ovary of female triploid catfish. Activities of these enzymes showed distinct seasonal periodicity, mostly with highest activities in prespawning and spawning periods, in both diploid and triploid catfish but differed in magnitude. In triploid liver, GPT showed higher activity than the diploid counterpart in prespawning and spawning periods.

Kynurenine from Plasma of Diploid and Triploid Asian Catfish before and after Injection with Lipopolysaccharide (LPS)

Apart from the investigation on lipids, proteins, and an enzyme from diploid and triploid Asian catfish, an attempt was made in the investigation on an amino acid metabolism. This was the examination of kynurenine, one of the metabolite originating from tryptophan metabolism. Since it was reported earlier in mouse that lipopolysaccharide (LPS) did have influence on the synthesis of kynurenine (Pewnim et al. 1992; Seifert and Pewnim 1992; Pewnim and Seifert 1993) we therefore decided to investigate the effect of LPS on these two different genetic fish as well. Figure 14 showed a typical HPLC profile of kynurenine present in a deproteinized blood sample.

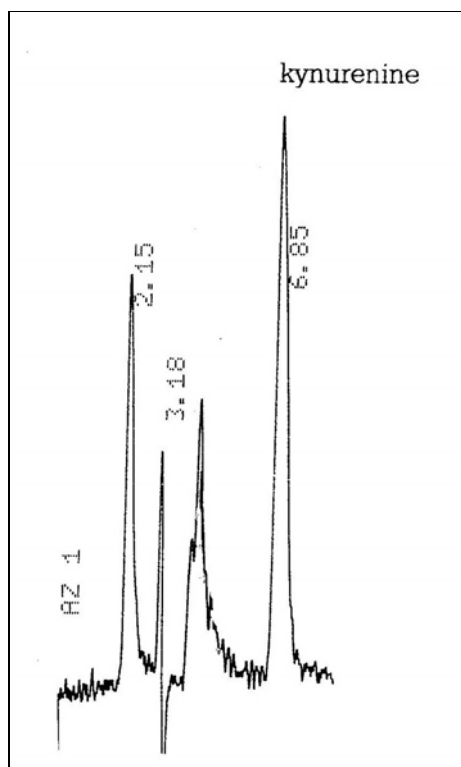


Figure 14 A representative HPLC profile showing the presence of kynurenine in plasma of an Asian Catfish.

The levels of kynurenine in plasma of diploid and triploid Asian catfish are shown in Figure 15. The levels of kynurenine appeared slightly lower in triploid fish compared

to the diploid fish in both control and the LPS treated fish. However, these differences are not statistically significant ($p > 0.05$). The high values of standard deviation (SD), which reflected the high variability among samples, would most likely account for the no significant differences in this case.

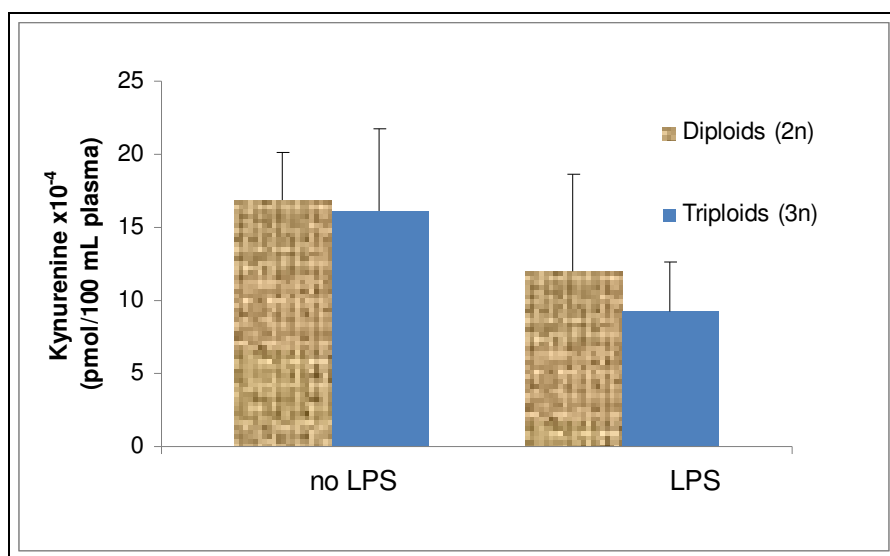


Figure 15 Levels of kynurenine in plasma from diploid (2n) and triploid (3n) Asian catfish in control group (no LPS) and in lipopolysaccharide treated group (LPS)

VNTR Specific for Apolipoprotein B in Diploid and Triploid Asian Catfish

The analysis of variable number tandem repeat (VNTR) specific for apolipoprotein B was carried out using the known forward and reverse primers as described in the materials and methods section. A representative result of PCR products on agarose gel electrophoresis is shown in Figure 16. It was found that while some diploid Asian catfish contained 860 bp band, the other diploid Asian catfish contained 2,810 bp band (lane 1, 3, and 2, respectively in Figure 15). The same observation applied in the case of triploid Asian catfish as well (lane 5, then 4 and 6, respectively in Figure 15) in which one could only see the 860 bp and the 2,810 bands.

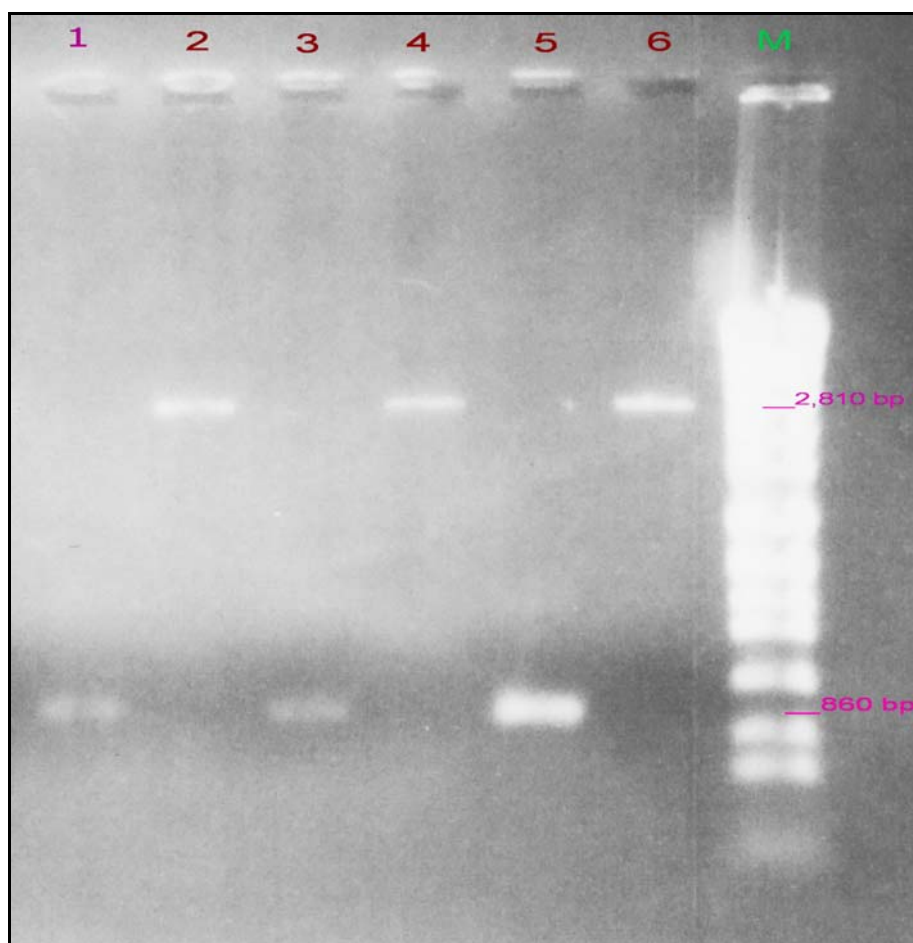


Figure 15 Agarose gel electrophoresis of VNTR specific for apolipoprotein B from diploid Asian catfish (lane 1, 2, and 3) and triploid Asian catfish (lane 4, 5, and 6). The right lane M was phage SPP-1 DNA markers.

It should be noted that most of the works on VNTR specific for apolipoprotein B were carried out on human population. For example Giorgetti et al (1991) assessed the suitability of the analysis of the apolipoprotein B VNTR system in an Italian population as a method for forensic investigation. On an Asian population study Das and Mastana (2003) looked at genetic variation at three VNTR loci in three tribal populations of Orissa, India which included apolipoprotein B VNTR in the investigation. On the study of genetic markers in human bone Lee et al (1991) also included apolipoprotein B VNTR as one of the markers. Verbenko et al (2003) on the other hand showed a detailed investigation on the apolipoprotein B VNTR polymorphism in Eastern European populations.

Since no reports appeared so far on the study of VNTR specific for apolipoprotein B in fish, this study is the first report showing that there were the 860 bp and the 2,810 bp bands present. We should keep in mind however that the population of diploid and triploid Asian catfish artificially fertilized for used in this study, even though involved a few thousands fingerlings, did originate from a few females and males broodstocks only. Further work should be carried out on this topic, particularly on expanding the work to include other closely related fish species.

Acknowledgement

We greatly appreciate financial support provided for this research by Thailand Research Fund (TRF). We are particularly thankful to Dr Vichai Boonsaeng and Khun Chonnapa Arnkaew at the Thailand Research Fund for their continual supports and encouragements, particularly for the many friendly reminders. We do also appreciate their great patience. Many students and support staff at Silpakorn University also contributed to this work. We would particularly like to thank Siriporn Patsuriyanan, Kanok-on Dokmaisrichan and Witoon Ngow for their technical assistance. We also appreciated the assistance from staff members of Research Center for Art and Design Materials at Silpakorn University for providing the center's formulated inks in printing the color photographs used in this report.

References

- Abiado M. A. G., Penn M., Dabrowski K. and Stafford J. (2007) Evaluation of two commercially available pressure chambers to induce triploidy in saugeyes. *North American Journal of Aquaculture* **69**, 197-201.
- Beck M. L., Biggers C. J. and Dupree H. K. (1983) Electrophoretic analysis of protein systems of *Ctenopharyngodon idella* (Val.), *Hypophthalmichthys nobilis* (Rich.) and their F1 triploid hybrid. *Journal of Fish Biology* **22**, 603-611.
- Benfey T. J. (1999) The Physiology and Behavior of Triploid Fishes. *Reviews in Fisheries Science* **7**, 39-67.

- Benfey T. J., Dye H. M., Solar, II and Donaldson E. M. (1989) The Growth and Reproductive Endocrinology of Adult Triploid Pacific Salmonids. *Fish Physiology and Biochemistry* **6**, 113-120.
- Biswas A., Pramanik M., Kundu S., Roy S., De J. and Ray A. K. (2006) Alterations in enzyme activities in vital organs of triploid female catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Fish Physiology and Biochemistry* **32**, 73-81.
- Carter C. G., McCarthy I. D., Houlihan D. F., Johnstone R., Walsingham M. V. and Mitchell A. I. (1994) Food-Consumption, Feeding-Behavior, and Growth of Triploid and Diploid Atlantic Salmon, *Salmo-Salar* L, Parr. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie* **72**, 609-617.
- Cherfas N. B., Gomelsky B., Ben-Dom N., Peretz Y. and Hulata G. (1994) Assessment of triploid common carp (*Cyprinus carpio* L.) for culture. *Aquaculture* **127**, 11-18.
- Chourrout D. (1984) Pressure-Induced Retention of Second Polar Body and Suppression of 1st Cleavage in Rainbow-Trout - Production of All-Triploids, All-Tetraploids, and Heterozygous and Homozygous Diploid Gynogenetics. *Aquaculture* **36**, 111-126.
- Das K. and Mastana S. S. (2003) Genetic variation at three VNTR loci in three tribal populations of Orissa, India. *Annals of Human Biology* **30**, 237-249.
- de Almeida-Toledo L. F., Viegas-Pequignot E., Coutinho-Barbosa A. C., Foresti F., Niveleau A. and Toledo-Filho S. D. (1998) Localization of 5-methylcytosine in metaphase chromosomes of diploid and triploid pacu fish, *Piaractus mesopotamicus* (Pisces, Characiformes). *Cytogenetics and Cell Genetics* **83**, 21-24.
- Deeley M. A. and Benfey T. J. (1995) Learning ability of triploid brook trout. *Journal of Fish Biology* **46**, 905-907.
- Dorafshan S., Kalbassi M. R., Pourkazemi M., Amiri B. M. and Karimi S. S. (2008) Effects of triploidy on the Caspian salmon *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiology and Biochemistry* **34**, 195-200.
- Fast A. W., Pewnim T., Keawtabtim R., Saijit R., Te F. T. and Vejaratpimol T. (1995) Comparative Growth of Diploid and Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*) in Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society* **26**, 390-395.
- Fauconneau B., Aguirre P. and Blanc J. M. (1990) Protein-Synthesis in Different Tissues of Mature Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri* R) - Influence of Triploidy. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology* **97**, 345-352.
- Folch J., Lees M. and Stanley G. H. S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509.

- Galbreath P. F., Jean W. S., Anderson V. and Thorgaard G. H. (1994) Freshwater performance of all-female diploid and triploid Atlantic salmon. *Aquaculture* **128**, 41-49.
- Gao Z. X., Wang W. M., Abbas K., Zhou X. Y., Yang Y., Diana J. S., Wang H. P., Wang H. L., Li Y. and Sun Y. H. (2007) Haematological characterization of loach *Misgurnus anguillicaudatus*: Comparison among diploid, triploid and tetraploid specimens. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **147**, 1001-1008.
- Giorgetti R., Tagliabracci A., Agostini A., Cingolani M. and Ferrara S. D. (1991) Suitability of Pcr Methods for Forensic Investigation - Analysis of the 3'apob Vntr System in an Italian Population-Sample. *International Journal of Legal Medicine* **104**, 243-246.
- Greenlee A. R., Kersten C. A. and Cloud J. G. (1995) Effects of triploidy on rainbow trout myogenesis *in vitro*. *Journal of Fish Biology* **46**, 381-388.
- Henken A. M., Brunink A. M. and Richter C. J. J. (1987) Differences in Growth-Rate and Feed-Utilization between Diploid and Triploid African Catfish, *Clarias Gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture* **63**, 233-242.
- Hussain M. G., Rao G. P. S., Humayun N. M., Randall C. F., Penman D. J., Kime D., Bromage N. R., Myers J. M. and McAndrew B. J. (1995) Comparative performance of growth, biochemical composition and endocrine profiles in diploid and triploid tilapia *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* **138**, 87-97.
- Islam M. S., Shah M. S., Rahman M. A. and Chowdhury H. A. (1994) Induction of triploidy in rohu, *Labeo rohita*, by heat shock treatment and comparative growth with normal diploid. *Journal of Aquaculture in the Tropics* **9**, 299-309.
- James J. M., Helm R. M., Burks A. W. and Lehrer S. B. (1997) Comparison of pediatric and adult IgE antibody binding to fish proteins. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* **79**, 131-137.
- Johnstone R., Mclay H. A. and Walsingham M. V. (1991) Production and performance of triploid Atlantic salmon in Scotland. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences* **1789**, 15-33.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee H. C., Pagliaro E. M., Berka K. M., Folk N. L., Anderson D. T., Ruano G., Keith T. P., Phipps P., Herrin G. L., Garner D. D. and Gaensslen R. E. (1991) Genetic-Markers in Human Bone .1. Deoxyribonucleic-Acid (DNA) Analysis. *Journal of Forensic Sciences* **36**, 320-330.
- Lincoln R. F. (1981) Sexual maturation in female triploid plaice, *Pleuronectes platessa*, and plaice flounder, *Platichthys flesus*, hybrids. *Journal of Fish Biology* **19**, 499-507.

- Lincoln R. F. and Scott A. P. (1984) Sexual maturation in triploid rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology* **25**, 385-392.
- Malison J. A., Procarione L. S., Held J. A., Kayes T. B. and Amundson C. H. (1993) The Influence of Triploidy and Heat and Hydrostatic-Pressure Shocks on the Growth and Reproductive Development of Juvenile Yellow Perch (*Perca-Flavescens*). *Aquaculture* **116**, 121-133.
- Maxime V. (2008) The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries* **9**, 67-78.
- Mizgirev I. V., Majorova I. G., Gorodinskaya V. M., Khudoley V. V. and Revskoy S. Y. (2004) Carcinogenic effect of N-nitrosodimethylamine on diploid and triploid zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicologic Pathology* **32**, 514-518.
- Munro H. N. and Fleck A. (1969) *Analysis of nitrogen constituents. Vol. 8*, pp 435-437. Academic Press, London.
- Myers J. M. and Hershberger W. K. (1991) Early Growth and Survival of Heat-Shocked and Tetraploid-Derived Triploid Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **96**, 97-107.
- Oliva-Teles A. and Kaushik S. J. (1990) Growth and nutrient utilization by 0 + and 1 + triploid rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology* **37**, 125-133.
- Parsons G. R. (1993) Comparisons of Triploid and Diploid White Crappies. *Transactions of the American Fisheries Society* **122**, 237-243.
- Peruzzi S., Varsamos S., Chatain B., Fauvel C., Menu B., Falguiere J. C., Severe A. and Flik G. (2005) Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture* **244**, 359-367.
- Pewnim T. and Seifert J. (1993) Structural Requirements for Altering the L-Tryptophan Metabolism in Mice by Organophosphorous and Methylcarbamate Insecticides. *European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section* **248**, 237-241.
- Pewnim T., Miles C. and Seifert J. (1992) A New Method of L-Kynurenine Precolumn Derivatization with Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde and Cyanide for High-Performance Liquid-Chromatography (HPLC). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **343**, 907-908.
- Purdom C. E. (1972) Induced polyploidy in plaice (*Pleuronectes platessa*) and its hybrid with the flounder (*Platichthys flesus*). *Heredity* **29**, 11-24.
- Qin J. G., Fast A. W. and Ako H. (1998) Growout performance of diploid and triploid Chinese catfish *Clarias fuscus*. *Aquaculture* **166**, 247-258.

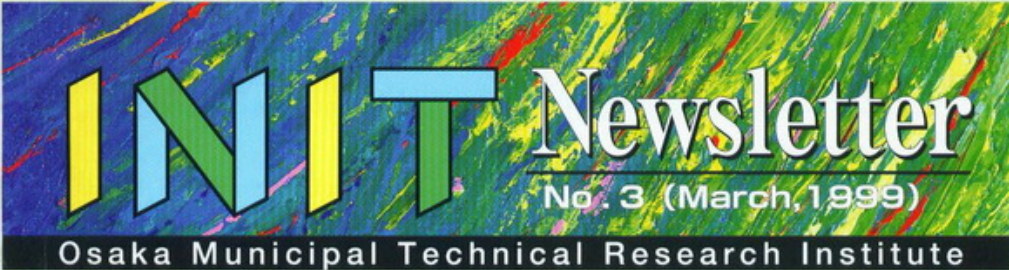
- Refstie T. (1981) Tetraploid Rainbow-Trout Produced by Cytochalasin-B. *Aquaculture* **25**, 51-58.
- Saito M., Kuwada T., Arai M., Yamashita Y., Aoki T. and Kunisaki N. (1997) Changes of the Proximate Composition and Some Minor Constituents of the Muscular Tissue from Cultured Diploid and Triploid Amago during Growth. *Fisheries Science* **63**, 639-643.
- Seifert J. and Pewnim T. (1992) Alteration of Mice L-Tryptophan Metabolism by the Organophosphorous Acid Triester Diazinon. *Biochemical Pharmacology* **44**, 2243-2250.
- Seol D. W., Im S. Y., Hur W. J., Park M. O., Kim D. S., Jo J. Y. and Park I. S. (2008) Haematological parameters and respiratory function in diploid and triploid Far Eastern catfish, *Silurus asotus*. *Genes & Genomics* **30**, 205-213.
- Solar, II, Donaldson E. M. and Hunter G. A. (1984) Induction of Triploidy in Rainbow-Trout (*Salmo-Gairdneri* Richardson) by Heat-Shock, and Investigation of Early Growth. *Aquaculture* **42**, 57-67.
- Suresh A. V. and Sheehan R. J. (1998a) Muscle fibre growth dynamics in diploid and triploid rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **52**, 570-587.
- Suresh A. V. and Sheehan R. J. (1998b) Biochemical and morphological correlates of growth in diploid and triploid rainbow trout. *Journal of Fish Biology* **52**, 588-599.
- Suzuki R., Nakanishi T. and Oshira T. (1985) Survival, growth and sterility of induced triploids in the cyprinid loach *Misgurnus anguillicaudatus*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **51**, 889-894.
- Thititananukij S., Vejaratpimol R., Pewnim T. and Fast A. W. (1996) Ethidium bromide nuclear staining and fluorescence microscopy: An alternative method for triploidy detection in fish. *Journal of the World Aquaculture Society* **27**, 213-217.
- Thorgaard G. H. (1983a) Chromosome Set Manipulation and Sex Control in Fish. *Fish Physiology* **9**, 405-434.
- Thorgaard G. H. (1983b) *Chromosome set manipulation and sex control in fish*, Vol. 9(B), pp 405-434. Academic Press, London.
- Thorgaard G. H. (1986) Ploidy manipulation and performance. *Aquaculture* **57**, 57-64.
- Thorgaard G. H. (1990) Application of Genetic Technologies to Rainbow-Trout, in *1st Aquaculture Symp : the Rainbow Trout*, pp 85-97, Stirling, Scotland.
- Thorgaard G. H. and Gall G. A. E. (1979) Adult Triploids in a Rainbow-Trout Family. *Genetics* **93**, 961-973.
- Tiwarly B. K., Kirubakaran R. and Ray A. K. (2004) The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **14**, 391-402.

- Vejaratpimol R. and Pewnim T. (1990) Induction of triploidy in *Clarias macrocephalus* by cold shock, in *Proceeding of the Second Asian Fisheries Forum* (Hirano R. and Hanyu I., eds), pp 531-534 Manila, Philippines.
- Verbenko D. A., Pogoda T. V., Spitsyn V. A., Mikulich A. I., Bets L. V., Bebyakova N. A., Ivanov V. P., Abolmasov N. N., Pocheshkhova E. A., Balanovskaya E. V., Tarskaya L. A., Sorensen M. V. and Limborska S. A. (2003) Apolipoprotein B 3'-VNTR polymorphism in Eastern European populations. *European Journal of Human Genetics* **11**, 444-451.
- Wolters W. R., Libey G. S. and Chrisman C. L. (1982) Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* **111**, 102-105.
- Wolters W. R., Lilyestrom C. G. and Craig R. J. (1991) Growth, Yield, and Dress-out Percentage of Diploid and Triploid Channel Catfish in Earthen Ponds. *Progressive Fish-Culturist* **53**, 33-36.

ภาคผนวก

สำเนาเอกสารแสดง ผลผลิต (Output) จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

- 1 Pewnim, T. (1999) "The Benefit of Producing Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*)" *INIT Newsletter Osaka Municipal Technical Research Institute* 3: 9
- 2 สุรัชย์ นิมจิรวัดน์ (2541) "ผลงานและโครงการวิจัยของ ผศ. ดร. ธนิต ผิว نیم" *จุลสารสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร*. 5: 12
- 3 ธนิต ผิว نیم (2541) "การตรวจสอบโครโมโซม 3 ชุด (Triploid Fish) โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ ไมโครสโคปี." *จุลสารสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร* 5: 8-10
- 4 Pewnim, T., W. Ngow and C. Poolperm (1998) "Determination of Erythrocyte Volume of Diploid and Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*) using Scanning Electron Microscope" *Proceedings of 24th Congress on Science and Technology of Thailand*: page 720 -721
- 5 Pewnim, T., W. Ngow and C. Poolperm (1998) "Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Microanalysis of Bones from Diploid and Triploid Asian Catfish" *Proceedings of 24th Congress on Science and Technology of Thailand*: 722 - 723

	
Osaka Municipal Technical Research Institute	
C o n t e n t s	
Editorial	
Progress in Science & Technology of OMTRI	
<i>Yasuo Kita</i>	Improvement of Weatherability on Polycarbonate with Benzophenone Derivatives Using Reactive Processing
<i>Masanobu Izaki</i>	Soft Solution Electrochemical Processing (SSEP) for Preparation of Smart Oxide Films
<i>Yuji Shimada</i>	A New Method of Purifying Polyunsaturated Fatty Acids: Two-Step Enzymatic Method
<i>Akio Sugihara</i>	Treatment of Waste Fats and Lipids Using a Bacterium which Assimilates Lipids Efficiently
International Symposium on Advanced Technology	
<i>V. Altstadt, W. Loth, and A. Schlarb</i>	Comparison of Fatigue Test Methods for Research and Development of Polymers and Polymer Composites
<i>Chi-Ming Chan</i>	Surface Characterization of Polymer Blends Having Strong Specific Interactions
Topics	
<i>Thanit Pewnim</i>	The Benefit for Producing Triploid Asian Catfish (<i>Clarias macrocephalus</i>)
Research Organizations	
<i>Farid Abo-Rageh</i>	Central Metallurgical Research and Development Institute (Egypt)
Country Reports	
<i>Evelyn F. Lastierre</i>	Plastic Industry in the Philippines
New Technology & Products	
<i>Osaka Gas Co., Ltd</i>	VAM Fungi Promote Plant Growth in Reforestation and Agriculture
<i>Daiwa Kasei Industry Co., Ltd</i>	New Synthetic Process of 4, 6-Diaminoresorcinol
<i>Harima Chemicals Inc.</i>	No-clean "Self-Deactivating" Solder Paste
<i>Taiyo Kagaku Co., Ltd</i>	A New Polyglycerol Ester Emulsifiers/Sunsoft A Series
Call for Articles	
 Let's Invite the 29th Olympic Games in 2008 to Osaka! 	

Topics

The Benefit for Producing Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*)

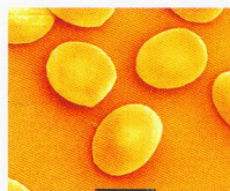
Thanit Pewnim

Silpakorn University, Thailand

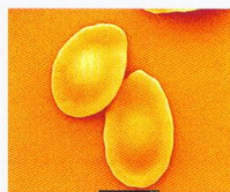
Asian catfish (*Clarias macrocephalus*), as it is known in Thai under the name of Pla Duke Oui, is one of the most famous fresh water fish consumed by a large number of people throughout the country. Research work which is supported by Thailand Research Fund (TRF) carried out at the Department of Chemistry and Biology at Silpakorn University in Thailand was able to produce triploid ($3n = 78$) catfish that exhibited a better growth performance than the normal diploid ($2n = 52$) catfish.

We reported that the induction of triploidy in catfish is a simple matter. The gravid female and male broodstocks were injected with GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormone) 12 hours prior to artificial fertilization. Two minutes after mixing eggs and sperms, the fertilized eggs were subjected to cold shock at 4°C for 15 minutes before allowing the fertilized eggs to develop and hatch in water at ambient temperature. The cold-shock resulted in the retention of the polar body within the fertilized egg. The fertilized egg, therefore, contained 3 sets of chromosome. One set ($n = 26$) came from the egg, the second set from the polar body, and the third set from the sperm. Subsequent cell division would retain these 3 sets of chromosomes in every cell.

We raised the triploids in parallel with the diploid fish for over a year now, and found that the nuclei and cells of triploids were significantly larger than those in diploids (see the pictures). The growth performance of both groups were about the same initially. But when they reached the time of sexual maturity the growth rate of triploids were significantly higher than the diploids. Further examination revealed that triploid fish were fertile. This may account for their higher growth rates as compared to diploids at sexual maturity. Work are now underway to study biochemical aspects of triploids in details, namely, proteins, lipids, and certain genes.



SEM of erythrocytes from diploid catfish



SEM of erythrocytes from triploid catfish

Mailing Address

Prof. Dr. Thanit Pewnim
Department of Chemistry
Silpakorn University
Nakornpathom 73000, Thailand
Phone : +66-34-255797 Fax : +66-34-255820
e-mail : thanit@su.ac.th

ผลงานและโครงการวิจัยของผศ.ดร.ธนิต ผิวนิม

*รศ.ดร.สุรัชย์ นิเมจิรัตน์

ปัญหาการขาดแคลนนักวิจัยเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยเป็นอย่างมาก การเปรียบเทียบอัตราส่วนนักวิทยาศาสตร์ต่อหัวประชากรเมื่เทียบกับประเทศเพื่อนบ้านอย่างสิงคโปร์และมาเลเซียยังพบว่าแนวโน้มการขาดแคลนนักวิทยาศาสตร์ของประเทศไทยอยู่ในภาวะที่เสียเปรียบและน่าเป็นห่วงเป็นอย่างยิ่ง

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จึงได้เริ่มโครงการสนับสนุนนักวิจัยขึ้นมากมายโครงการหนึ่งในโครงการเหล่านี้ได้แก่ โครงการพัฒนานักวิจัยหรือ "เมธีวิจัย" เพื่อสนับสนุนนักวิจัยที่มีศักยภาพสูงให้มีโอกาสทำงานวิจัยด้วยความคล่องตัวยิ่งขึ้น ผศ.ดร.ธนิต ผิวนิม เป็น "เมธีวิจัย" คนหนึ่งในกลุ่มวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ซึ่งได้รับการสนับสนุนให้ทำโครงการวิจัยเรื่อง "การวิเคราะห์หาโปรตีนในกล้ามเนื้อ โปรตีนในพลาสมา และ VNTR จำเพาะสำหรับอะโปไลโปโปรตีนในปลาคูกลุยโครโมโซม 2 ชุด และปลาคูกลุยโครโมโซม 3 ชุด"

โครงการวิจัยนี้สืบเนื่องมาจากความสำเร็จของ ผศ.ดร.ธนิต ผิวนิม และ ผศ. เรณู เวชชีวะพิมล ในการดัดแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมของปลาคูกลุย ทำให้สามารถสร้างปลาคูกลุยที่ทุก ๆ เซลล์ของปลามีโครโมโซม 3 ชุด (triploid) ขึ้นมาได้ ซึ่งต่างจากปลาคูกลุยปกติ ซึ่งเซลล์มีโครโมโซมเพียง 2 ชุด (diploid) ปลาคูกลุยแบบ triploid นี้มีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับปลาคูกลุยแบบ diploid ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์ แต่จะเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบบ diploid ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ เนื่องจากปลาคูกลุยแบบ triploid เป็นหมัน จึงไม่มีการสูญเสียพลังงานและสารอาหารไปในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และกิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ การที่ปลาคูกลุยแบบ triploid มีอัตราการเจริญเติบโตตลอดช่วงอายุของมันจึงเป็นผลดีในเชิงเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก

เนื่องจากความเข้าใจพื้นฐานทางชีวเคมีของปลาคูกลุยแบบ triploid ยังมีน้อยอยู่ โดยเฉพาะในระดับยีนโปรตีนและเอนไซม์ในระดับโปรตีนโดยรวมนั้น มีผู้ค้นพบว่าปลาคูกลุยแอฟริกาแบบ diploid ส่วนการศึกษาในระดับดีเอ็นเอเอนไซม์ยังไม่ปรากฏว่ามีรายงานใด ๆ เกี่ยวกับปลาคูกลุยแบบ triploid งานวิจัยนี้จึงมุ่งแสวงหาองค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับปลาคูกลุยแบบ diploid และปลาคูกลุยแบบ triploid ในระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิคใหม่ๆทางชีวเคมีโมเลกุล (Molecular

Biochemistry) ซึ่งได้มีการพัฒนาอยู่ตลอดเวลา

ผศ.ดร.ธนิต ผิวนิมได้รับปริญญา BSc(Hons) และ PhD สาขาชีวเคมีจากมหาวิทยาลัย นิวเซาท์เวลส์ ประเทศออสเตรเลีย เริ่มรับราชการที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์ ต่อมาย้ายมาสังกัดภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มีประสบการณ์การวิจัยด้านชีวเคมีและสาขาที่เกี่ยวข้องอย่างกว้างขวาง มีความร่วมมือด้านการวิจัยกับนักเคมีชาวอเมริกันและชาวญี่ปุ่นหลายท่าน และมีผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติอย่างสม่ำเสมอ

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ใน 5 ปีที่ผ่านมา

1. Thittitananukij,S., Vejaratpimol,R., Pewnim,T., and Fast,A.W. (1996) Ethidium bromide nuclear staining and fluorescence microscopy: an alternative method for triploidy detection in fish, *J.World Aqua.Soc.* 27, 213-217.
2. Fast,A.W., Pewnim,T., Keawtabtim,R., Sajit,R., and Vejaratpimol,R.(1995) Comparative growth of diploid and triploid Asian catfish (*Clarias macrocephalus*) in Thailand. *J. World Aqua.Soc.*, 26, 390-395.
3. Pewnim,T., and Seifert,J. (1993) Structural requirements for altering the L-tryptophan metabolism in mice by organophosphorus and methylcarbamate insecticides. *Eur.J.Pharmacol.*248, 237-241.
4. Pewnim,T., Miles,C., and Seifert,J. (1992) A new method for L-kynurenine precolumn derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde and cyanide for high-performance liquid chromatography. *Fresenius J.Anal.Chem.*243,907-909.
5. Seifert,J., and Pewnim,T. (1992) Alteration of mice L-tryptophan metabolism by the organophosphorus acid triester diazinon. *Biochem. Pharmacol.*44,2243-2250.
6. Vejaratpimol,R., and Pewnim,T. (1990) Induction of triploidy in *Clarias macrocephalus* by cold shock in *Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum* (Hirano,R. And Hanyu, I eds.) pp.531-534. Asian Fisheries Society, Manila.

*

รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

การตรวจสอบปลาโครโมโซม 3 ชุด (Triploid Fish)

โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ไมโครสโคปี

* ศ.ดร.ธนิศ ลิขนิม

ความสำคัญของปลาโครโมโซม 3 ชุด

การชักนำให้ปลาโครโมโซม 3 ชุด เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงปลา เช่น ปลาเทราต์ (*Salmo gairdneri*) ปลาดุก (*Ictalurus punctatus*) และปลานิล (*Tilapia aureus*) ปลาหริปฟลอยด์เหล่านี้เป็นหมัน จึงมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดีปลอยด์ เพราะไม่มีการสูญเสียพลังงานและสารอาหารไปในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ รวมทั้งกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ (Thorgaard, 1986; Wolters et al, 1982; Valenti, 1975) สำหรับปลาดุกยูนันได้มีการทดลองได้ผลในทำนองเดียวกัน กล่าวคือปลาหริปฟลอยด์ เมื่อเข้าถึงวัยที่ควรจะเจริญพันธุ์แล้วนั้นจะมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดุกดีปลอยด์ (Fast et al, 1995) สำหรับข้อดีในแง่ภูมิคุ้มกันมีรายงานว่า การสร้างปลาเทราต์หริปฟลอยด์และปลาเซลมอนหริปฟลอยด์นั้น ยังเป็นวิธีช่วยลดอัตราการตายของปลาด้วย (Rafstie et al, 1977; Solar et al, 1984) ทั้งนี้เป็นเพราะธรรมชาติของปลาเหล่านี้ที่ว่า เมื่อถึงฤดูวางไข่จะอพยพจากทะเลไปยังแหล่งน้ำจืดเพื่อวางไข่ การเดินทางทวนกระแสน้ำทำให้บอบช้ำและเมื่อวางไข่แล้วปลาก็จะตาย เมื่อมีการเพาะเลี้ยงปลาเทราต์ในบ่อเพาะเลี้ยงนั้น ปลาเพศเมียก็ยังแสดงพฤติกรรมคล้ายธรรมชาติ คือปลาใช้ลำตัวกับกรวดหินกันบ่อเกิดบาดแผลและมีอัตราการตายสูง การชักนำให้ปลาเทราต์มีโครโมโซม 3 ชุด ทำให้ปลาลดพฤติกรรมดังกล่าวลง ส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงมีอัตราการรอดสูงเพิ่มขึ้นด้วย

งานวิจัยเพื่อคัดแปลงองค์ประกอบทางพันธุกรรมในปลาดุกยูนัน (*Clarias macrocephalus*, Gunther) ทำให้เราสร้างปลาดุกยูนันทุก ๆ เซลล์ของปลาโครโมโซม 3 ชุด (Triploid) ขึ้นมาได้สำเร็จ (Vejaratpimol & Pewnim, 1990) เมื่อทำ karyotyping เปรียบเทียบระหว่างปลาโครโมโซม 2 ชุด (Diploid) และปลาหริปฟลอยด์ แล้วพบว่ามีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 54 และ 81 ตาม

ลำดับ (n=27) เมื่อพิจารณาโดยทั่วไปแล้วเห็นได้ว่าปลาดีปฟลอยด์ (2n) และปลาหริปฟลอยด์ (3n) มีลักษณะภายนอกคล้ายกันมาก นอกจากนั้นปลาหริปฟลอยด์ยังสามารถเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยได้เหมือนปลาดีปฟลอยด์ด้วย การศึกษาในเวลาต่อมาเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของปลาดีปฟลอยด์และปลาหริปฟลอยด์ในช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์พบว่า อัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่ออายุถึงเวลาที่ปลาดีปฟลอยด์มี gonads สมบูรณ์แล้ว ปลาหริปฟลอยด์จะไม่มีการพัฒนาดังกล่าว และในช่วงเวลานี้ปลาหริปฟลอยด์ยังคงมีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ขณะที่ปลาดีปฟลอยด์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงและต่างจากปลาหริปฟลอยด์อย่างมีนัยสำคัญ (Fast et al, 1995) การเจริญเติบโตที่ดีกว่าของปลาดุกโครโมโซม 3 ชุด น่าจะเป็นผลดีในแง่ภูมิคุ้มกันเพาะเลี้ยง

วิธีตรวจสอบปลาโครโมโซม 3 ชุด

ปลาและสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปที่ถือกำเนิดมาจากการผสมพันธุ์โดยอาศัยเพศนั้นจะมีโครโมโซม 2 ชุด (2n) โดยที่โครโมโซม 1 ชุด ได้มาจากพ่อและอีก 1 ชุด ได้มาจากแม่ เช่นมนุษย์เรามีโครโมโซม 23 คู่ หรือ 46 ชิ้น (2n=46) โครโมโซมแต่ละชิ้นประกอบด้วยสายดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งยาวมากขดพันและบิดวนไม่กันอย่างซับซ้อน อีกทั้งมีโปรตีนมาเกาะจับอยู่ทั่วทั้งโครโมโซม เราจะเห็นโครโมโซมเป็นรูปร่างชัดเจนในระยะหนึ่งของการแบ่งเซลล์ที่เรียกว่าเมตาเฟส (metaphase) เท่านั้น เซลล์ทุกเซลล์ในร่างกายมีโครโมโซม 2 ชุด ยกเว้นเซลล์สืบพันธุ์จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียว เพราะรู้ว่าจะต้องรอโครโมโซมอีกชุดหนึ่งจากเซลล์สืบพันธุ์เพศตรงข้ามเพื่อรวมกันเป็น 2 ชุด เพื่อก่อให้เกิดชีวิตใหม่ต่อไป ไมโครกุลของดีเอ็นเอและโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครโมโซมนั้นอยู่ภายในเซลล์ในส่วนที่เรียกว่านิวเคลียส ขนาดของนิวเคลียสจะ

* ผู้ส่งบทความรายงานผลการปฏิบัติงานวิทยานิพนธ์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ใหญ่หรือเล็กเพียงใดนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของโมเลกุลดีเอ็นเอ และโปรตีนดังกล่าวแล้ว จึงเป็นที่แน่นอนว่าปลาชนิดหนึ่ง ๆ ที่แต่ละเซลล์ของมันมีโครโมโซม 3 ชุด ย่อมมีขนาดของนิวเคลียสใหญ่กว่าปลาชนิดเดียวกันที่แต่ละเซลล์มีโครโมโซม 2 ชุด นักวิทยาศาสตร์ใช้ความแตกต่างของปริมาณดีเอ็นเอ และขนาดของนิวเคลียสในการจำแนกปลา 2 กลุ่มออกจากกัน

ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้คิดค้นวิธีต่าง ๆ แล้วหลายวิธี เพื่อจำแนกปลา 2n และ 3n ออกจากกัน เช่น

1. Flow cytometry ซึ่งมีราคาแพงมากและต้องใช้กระบวนการที่ซับซ้อน
2. วิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอในเซลล์
3. ย้อมนิวเคลียสของเซลล์ให้เกิดสีขึ้น แล้ววัดขนาดของนิวเคลียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ในการศึกษาเกี่ยวกับปลาดุก 2n และปลาดุก 3n นั้นเราต้องการวิธีตรวจสอบที่รวดเร็วและมีความไวสูง จึงได้พัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า การตรวจสอบโดยฟลูออเรสเซนส์ไมโครสโคปี (Fluorescence microscopy) ขึ้นมาใช้

วิธีการตรวจสอบปลาโครโมโซม 3 ชุด โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ไมโครสโคปี

วิธีดังกล่าวอาศัยหลักการที่ว่า อีธิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) เป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสที่จับคู่กันอยู่ในสายของดีเอ็นเอ เมื่อจุ่มแผ่นกระจกสไลด์ซึ่งมีเม็ดเลือดของปลาดักอยู่ลงไปในสารละลายอีธิเดียมโบรไมด์ สารนี้จะแทรกตัวเข้าไปอยู่ระหว่างเบสของดีเอ็นเอ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเล็ตเข้าไปที่นิวเคลียสจะมีการเรืองแสงของนิวเคลียสเป็นสีส้มแดง สามารถตรวจผลได้อย่างรวดเร็วภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังภาพที่ 1 วิธีที่คณะผู้วิจัยได้พัฒนาขึ้นใช้เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบปลา 3n ได้เร็วที่สุดเท่าที่มีมา และได้ตีพิมพ์เผยแพร่เทคนิคนี้ในวารสารนานาชาติด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือ

Thittitananukij, S., Vejaratpimol, R., Pewnim, T. and Fast, A.W. (1996) Ethidium bromide nuclear staining and fluorescence microscopy : an alternative method for triploidy detection in fish, J. World Aqua. Soc: 27 , 213-217

Triploidy Detection in Fish

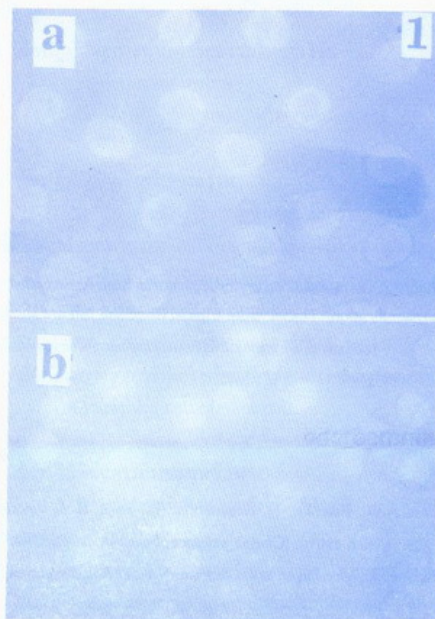


Figure 1. Ethidium bromide stained erythrocyte nuclei from Asian catfish *Clarias macrocephalus*, under fluorescence microscopy, at 1,000 x magnification. Nuclei from triploid (shocked) fish are shown in A, while nuclei from diploid (control) fish are shown in B. The slight haze around nuclei was caused by long exposure times needed to obtain photos.

Haze was absent when viewed through the microscope.

บทวิจัย

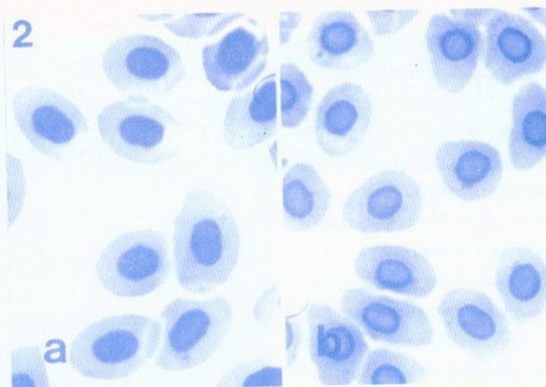


Figure 2. Giemsa-stained erythrocyte nuclei from Asian catfish *Clarias macrocephalus*, under bright field microscopy, at 1,000 x magnification. Nuclei from triploid (shocked) fish are shown in A, while nuclei from diploid (control) fish are shown in B.

(งานวิจัยส่วนนี้ได้รับการสนับสนุนค่าใช้จ่ายบางส่วนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากรเพื่อตีพิมพ์ใน Journal of the World Aquaculture Society ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เอกสารอ้างอิง

- Fast, A.W., Pewnim, T., Keawtabtim, R., Saijit, R. & Vejaratpimol, R. (1995) Comparative growth of diploid and triploid Asian catfish (*Clarias macrocephalus*) in Thailand, J. World Aqua. Soc. **26**, 390-395.
- Refstie, T., Vassvik, V. and Gjerdem, T. (1977) Induction of polyploidy in salmonids by cytochalasin B, Aquaculture **10**, 65-74.
- Richter, C.J.J., Henken, A.M., Eding, E.H., Van Doesum, J.H. & De Boer, P. (1987) Induction of triploidy by cold-shocking eggs and performance of triploids of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), Proc. World Symp. on Selection, Hybridization, and Genetic Engineering in Aquaculture, pp. 225-237, Berlin
- Solar, I.I., Donaldson, E.M. & Hunter, G.A. (1984) Induction of triploidy in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) by heat shock, and investigation of early growth, Aquaculture **42**, 57-67
- Thorgaard, G.H. (1986) Ploidy manipulation and performance, Aquaculture **57**, 57-64
- Valenti, R.J. (1975) Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment, J. Fish. Biol. **7**, 519-528
- Vejaratpimol, R. & Pewnim, T. (1990) Induction of triploidy in *Clarias macrocephalus* by cold shock in: Proceedings of the Second Asian Fisheries Forum (Hirano, R. & Hanyu, I. eds.) pp. 531-534 Asian Fisheries Society, Manila
- Wolters, W.R., Libey, G.S. & Chrisman, C.L. (1982) Effect of triploidy on growth and gonad development of channel cat fish, Trans. Am. Fish. Soc. **111**, 102-105



การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24

19-21 ตุลาคม 2541

ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์
กรุงเทพมหานคร

กำหนดการและบทคัดย่อ
PROGRAMME AND ABSTRACTS

ISBN 974-86505-5-3

**24th Congress on Science and
Technology of Thailand**

19-21 October 1998
at Queen Sirikit National Convention Center
Bangkok



วทท.-STT : The Best Domestic Convention Award 1993

720

B-147

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย **วิฑูรย์ แซ่โจ้ว**

สาขาวิชา:

☒ นาย ☐ น.ส. ☐ นาง ☐ ดร. ☐ อ. ☐ ผศ. ☐ รศ. ☐ ศ.☐ กายภาพ ☒ ชีวภาพ
☐ แพทย์ ☐ ทรัพยากร-แวดล้อม
☐ เกษตร ☐ วิศวกรรม
☐ วิทยาศาสตร์ ☐ ทั่วไปที่ทำงาน **ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร**

นครปฐม 73000

โทร. 034-255797

DETERMINATION OF ERYTHROCYTE VOLUME OF DIPLOID AND TRIPLOID ASIAN CATFISH (*Clarias macrocephalus*) USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Thanit Pewnim, Witoon Ngow and Chanarong Poolperim

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

Diploid (2n) Asian catfish (*Clarias macrocephalus*) were produced by artificial fertilization. A portion of fertilized eggs were subjected to a temperature shock at 4°C for 15 min thus yielded triploid (3n) catfish. Erythrocyte volume, as determined by SEM, of triploids was significantly higher than the diploids (353.5 ± 112.8 and $171.4 \pm 34.7 \mu\text{m}^3$ respectively)

การวัดปริมาตรของเม็ดเลือดแดงจากปลาดุกอุยโครโมโซม 2 ชุดและปลาดุกอุยโครโมโซม 3 ชุดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ธนิต ผิวนิม วิฑูรย์ แซ่โจ้ว และชาญณรงค์ พูลเพิ่ม

ทำการผลิตปลาดุกอุยโครโมโซม 2 ชุด (2n) โดยวิธีผสมเทียม และชักนำบางส่วนให้มีโครโมโซม 3 ชุด (3n) โดยการช็อคที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเลี้ยงปลาจนโตแล้ว นำเม็ดเลือดมาศึกษาและวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วัดขนาดและคำนวณปริมาตรได้ว่าปลา 3n มีปริมาตรมากกว่าปลา 2n อย่างมีนัยสำคัญ คือมีปริมาตรเท่ากับ 353.3 ± 112.8 และ $171.4 \pm 34.7 \mu\text{m}^3$ ตามลำดับ

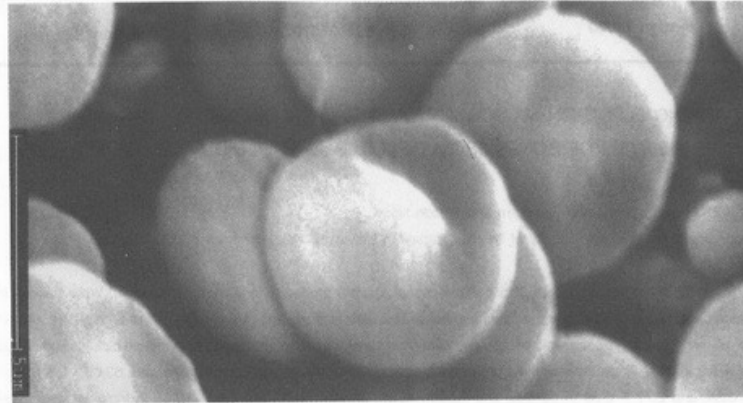
INDEX KEY WORDS: diploid, triploid, scanning electron microscope, erythrocyte

B-147

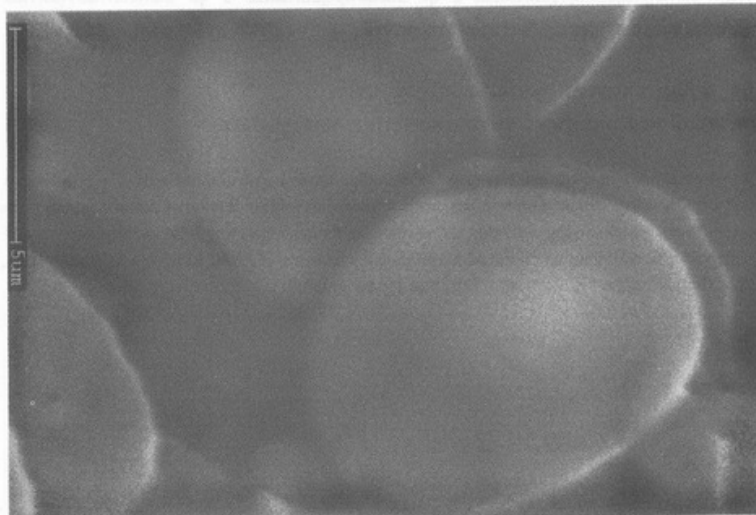
721

การวัดปริมาณของเม็ดเลือดแดงจากปลาตุกอุยโครโมโซม 2 ชุดและปลาตุกอุยโครโมโซม 3 ชุด
โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ชื่อเรื่อง (ไทย)

**B**

รูปที่ 1 ขนาดเม็ดเลือดแดงของปลาดีปลอยด์ (2n)



รูปที่ 2 ขนาดเม็ดเลือดแดงของปลาเทริปลอยด์ (3n)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว)

เอกสารอ้างอิง

Fast, A.W., Pewnim, T., Keawtabtim, R., Saijit, R. & Vejaratpimol, R. (1995)
Comparative growth of diploid and triploid Asian catfish (*Clarias macrocephalus*)
in Thailand, J. World Aqua. Soc. 26, 390-395.

722

B-148

ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย อนันต์ ผินนิม

สาขาวิชา:

☐ นาย ☐ น.ส. ☐ นาง ☒ ดร. ☐ อ. ☒ ผศ. ☐ รศ. ☐ ศ.

☐ กายภาพ ☒ ชีวภาพ

☐ แพทย์ ☐ ทรัพยากร-แวดล้อม

ที่ทำงาน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

☐ เกษตร ☐ วิศวกรรม

นครปฐม 73000

โทร. 034-255797,

☐ วิทยาศาสตร์ ☐ ทั่วไป

SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND ENERGY DISPERSIVE X-RAY MICROANALYSIS OF BONES FROM DIPLOID AND TRIPLOID ASIAN CATFISH

Thanit Pewnim, Chanarong Poolperm and Witoon Ngow

Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Nakornpathom 73000, Thailand

Diploid(2n) Asian catfish (*Clarias macrocephalus*) were produced by artificial fertilization. While triploid(3n) Asian catfish were produced in the same manner except their fertilized eggs were subjected to a cold-shock at 4°C for 15 min. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis of bones obtained from mature diploids and triploids revealed that Ca, P, and Al were three prominent elements. Their percentage compositions were 63.66 ± 0.64 , 33.56 ± 0.84 , and 2.77 ± 0.89 in diploids, and 62.86 ± 0.81 , 31.45 ± 1.01 , and 5.68 ± 0.68 in triploids, respectively.

การวิเคราะห์กระดูกของปลาตุ๋นโครโมโซม 2 ชุด และปลาตุ๋นโครโมโซม 3 ชุด โดยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและระบบวิเคราะห์พลังงานเอกซเรย์

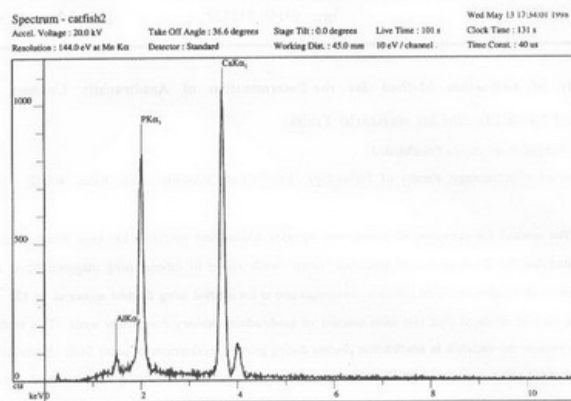
อนันต์ ผินนิม ชาญณรงค์ พูลเพิ่ม และวิฑูรย์ แซ่โจ้ว

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม 73000

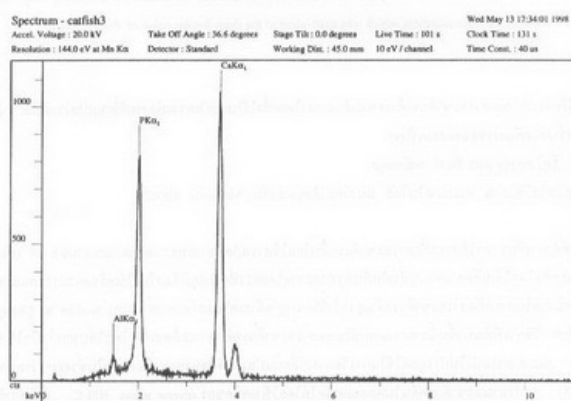
ทำการผลิตปลาตุ๋นโครโมโซม 2 ชุด (2n) โดยวิธีผสมเทียม และชักนำบางส่วนให้มีโครโมโซม 3 ชุด (3n) โดยการช็อคที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเลี้ยงปลาจนโตแล้วนำกระดูกปลาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและระบบวิเคราะห์พลังงานเอกซเรย์ พบว่าปลา 2n และปลา 3n มีธาตุแคลเซียม ฟอสฟอรัส และอะลูมิเนียม เป็นองค์ประกอบหลัก ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของธาตุทั้งสามในปลาดีปลอยด์ และปลาทริพลอยด์คือ 63.66 ± 0.64 , 33.56 ± 0.84 , 2.77 ± 0.89 และ 62.86 ± 0.81 , 31.45 ± 1.01 , 5.68 ± 0.68 ตามลำดับ

INDEX KEY WORDS: diploid, triploid, SEM, X-ray microanalysis, bone

ชื่อเรื่อง (ไทย) การวิเคราะห์กระดูกของปลาตุ๊กตาสีโครโมโซม 2 ชุด และปลาตุ๊กตาสีโครโมโซม 3 ชุด
โดยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและระบบวิเคราะห์พลังงานเอกซเรย์



รูปที่ 1 สเปกตรัมของธาตุในปลาติปฟลอยด์



รูปที่ 2 สเปกตรัมของธาตุในปลาทวีปฟลอยด์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เอกสารอ้างอิง

- Thititananukij, S., Vejaratpimol, R., Pewnim, T. & Fast, A.W. (1996) Ethidium bromide nuclear staining and fluorescence microscopy : an alternative method for triploidy detection in fish, J. World Aqua. Soc. 27, 213-217

ผลผลิต (Output) จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

Pewnim, T. (1999) "The Benefit of Producing Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*)" *INIT Newsletter Osaka Municipal Technical Research Institute* 3: 9

Pewnim, T., W. Ngow and C. Poolperm (1998) "Determination of Erythrocyte Volume of Diploid and Triploid Asian Catfish (*Clarias macrocephalus*) using Scanning Electron Microscope" *Proceedings of 24th Congress on Science and Technology of Thailand*: page 720 -721

Pewnim, T., W. Ngow and C. Poolperm (1998) "Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Microanalysis of Bones from Diploid and Triploid Asian Catfish" *Proceedings of 24th Congress on Science and Technology of Thailand*: 722 - 723

สุรัชย์ นิมจิรวัดณ์ (2541) "ผลงานและโครงการวิจัยของ ผศ. ดร. ธนิต ผิวนิม" *จุลสารสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร*. 5: 12

ธนิต ผิวนิม (2541) "การตรวจสอบโครโมโซม 3 ชุด (Triploid Fish) โดยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์ไมโครสโคปี." *จุลสารสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร* 5: 8-10