

ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีนไวเทลโลจีนินและดัชนีความสมบูรณ์เพศ
ของปลาหมอข้างเหยียบในกวานพะเยา จังหวัดพะเยา

Seasonal Expression Levels of Vitellogenin Gene and Gonadosomatic Index in
Pristolepis fasciata in Kwan Phayao, Phayao Province

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์^{1/, 2*}

Dutrudi Panprommin^{1/, 2*}

^{1/}สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จ. พะเยา 56000

^{1/}Division of Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

^{2/}ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

^{2/}Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: Email: dutrudeep@yahoo.com

(Received: 24 May 2016; Accepted: 8 August 2016)

Abstract: The aims of this study were to amplify the partial cDNA sequence of vitellogenin gene (VTG) for determination the VTG seasonal expression and gonadosomatic index (GSI) of female *Pristolepis fasciata*. The sample fishes were collected from Kwan Phayao for 1 year period between June 2012 and May 2013. The 320-bp fragment of *P. fasciata* VTG (called *PVTG*) type Ab was amplified from the liver tissue of female fish using RT-PCR technique and VF1 and VR1 primers. A phylogenetic tree based on three types of VTG, including Aa, Ab and C from other teleost fishes was constructed for relationship analysis. The nodes were separated into 3 major branches following the type of VTG. The *PVTG* was grouped into the VTG type Ab. The seasonal expression levels of VTG were determined using real-time PCR. The VTG expression levels and GSI were significantly ($P < 0.05$) peaked in 2 periods, July and January. This result showed that the *P. fasciata* in Kwan Phayao could spawn one more time per year. The correlation analysis showed the VTG expression levels have a significant ($r_s = 0.58$; $P < 0.01$) direct relation with the GSI. From these results indicated that apart from the GSI, the seasonal expression of VTG could also reflect the spawning season of *P. fasciata* in Kwan Phayao.

Keywords: Vitellogenin gene, gonadosomatic index, *Pristolepis fasciata*, Kwan Phayao

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin; VTG) บางส่วน สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนตามฤดูกาล และดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI) ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียที่รวบรวมได้จากกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา เป็นเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 โดยนำเนื้อเยื่อตับของปลาเพศเมียมาเพิ่มปริมาณยีน VTG ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณยีน VTG ชนิด Ab ได้ โดยมีความยาว 320 คู่เบส ด้วยไพรเมอร์ VF1 และ VR1 และจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีน VTG ทั้งสามชนิด ได้แก่ Aa, Ab และ C ของปลากะตักแฉ่งชนิดต่าง ๆ ด้วยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่า สามารถแบ่งปลาออกเป็น 3 กลุ่มตามชนิดของยีน VTG และยีน VTG ที่เพิ่มปริมาณได้ของปลาหมอช้างเหยียบถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน VTG ชนิด Ab เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG และ GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ พบว่า ค่าทั้งสองนี้มีระดับสูงสุดใน 2 ช่วงเวลา คือในเดือนกรกฎาคมและมกราคมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบปี นอกจากนี้การศึกษาค่าความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG และ GSI ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน VTG มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า GSI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r_s = 0.58$; $P < 0.01$) จากผลการศึกษาดังนี้ จะเห็นได้ว่า นอกจากการใช้ค่า GSI แล้ว ยังสามารถใช้ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG ในการบ่งบอกถึงฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาได้อีกด้วย

คำสำคัญ: ยีนไวเทลโลจีนิน ดัชนีความสมบูรณ์เพศ ปลาหมอช้างเหยียบ กว๊านพะเยา

คำนำ

กว๊านพะเยาเป็นแหล่งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในภาคเหนือ และใหญ่เป็นอันดับ 4 ของประเทศไทย รองลงมาจากบึงบอระเพ็ด หนองหาน และบึงละหาน ตามลำดับ กว๊านพะเยามีความสำคัญต่อคนพะเยาเป็นอย่างมาก ทั้งเพื่อการอุปโภคและบริโภค การใช้เป็นแหล่งน้ำดิบเพื่อการผลิตน้ำประปา การเกษตรและการประมง ตลอดจนเป็นแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของจังหวัดพะเยา แต่อย่างไรก็ตามน้ำเสียจากกิจกรรมเหล่านี้ถูกปล่อยลงสู่กว๊านพะเยาโดยตรงโดยไม่ผ่านกระบวนการบำบัดแต่อย่างใด ทำให้คุณภาพน้ำในกว๊านพะเยาอยู่ในสภาพพอใช้ (กรมควบคุมมลพิษ, 2557) มีการปนเปื้อนของโลหะหนักบางชนิด (Tupwongse *et al.*, 2007) และสารฆ่าแมลง (Sapbamrer and Hongsibsong, 2014) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นได้ (Hanson *et al.*, 2007; Ebrahimi and Taherianfard, 2011)

ยีนไวเทลโลจีนิน (vitellogenin; VTG) มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการสังเคราะห์โปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นในขบวนการสร้างไข่แดงในสัตว์มีกระดูกสันหลัง รวมถึงปลาด้วยเช่นกัน เพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน มีมวลโมเลกุลประมาณ 300-700 kDa (Johnsen *et al.*, 1999) โดยทั่วไปถูกสังเคราะห์ขึ้นในตับของปลาเพศเมียตัวโตเต็มวัยที่พร้อมวางไข่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยเฉพาะ 17β -estradiol (E2) (Wallace, 1985) นอกจากนี้ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; GSI) มักนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาด้วยเช่นกัน โดยมีสมมติฐานว่า ช่วงที่สัตว์น้ำเริ่มวางไข่จะมีค่า GSI สูงสุด แล้วหลังจากนั้นจะลดลงภายหลังจากวางไข่ไปแล้ว (ธนิษฐา และอมรศักดิ์, 2550)

ปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciata*) เป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในท้องถิ่นของจังหวัดพะเยา นิยมบริโภคทั้งเนื้อและไข่ปลา เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาติดีและมักนำไข่ปลาชนิดนี้ไปประกอบอาหาร จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาลดน้อยลง (ศิริลักษณ์ และณัฐวุฒิ, 2557) นอกจากนี้ปลาหมอ

ช้างเหยียบยังเป็นปลากินเนื้อและสัตว์น้ำขนาดเล็ก (สุริดา และเมธา, 2548) ซึ่งมีความสำคัญต่อความสมดุลของระบบนิเวศในกัวนพะเยาอีกด้วย

ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไวเทิลโลจีนินบางส่วนสำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีนดังกล่าวและดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียที่รวบรวมได้จากกัวนพะเยา จังหวัดพะเยา ตลอดจนถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนไวเทิลโลจีนินและดัชนีความสมบูรณ์เพศ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการทรัพยากรสัตว์น้ำในกัวนพะเยาต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างปลาและการสกัด Total RNA

ทำการรวบรวมปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกัวนพะเยา จังหวัดพะเยา ด้วยเครื่องมือประมงประเภทข่าย ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 โดยรวบรวมปลาทุกเดือน เดือนละ 6 ตัวอย่าง ทำการสลับปลาด้วยสารละลาย MS-222 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 g/l จากนั้นชั่งน้ำหนักปลา และรังไข่เพื่อคำนวณหาดัชนีความสมบูรณ์เพศ (%GSI: น้ำหนักรังไข่ / น้ำหนักปลา × 100) (Hun-Han, 1978) แล้วนำเนื้อเยื่อตับบางส่วนมาสกัด Total RNA โดยใช้ TRI Reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) และกำจัดดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนใน Total RNA ด้วย DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, Darmstadt, Germany) จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ Total RNA ที่สกัดได้ด้วยวิธี 1.0% formaldehyde-agarose gel electrophoresis และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรตามลำดับ

การสังเคราะห์ first-strand cDNA

นำ Total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาแต่ละตัวอย่าง ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัม มา

สังเคราะห์ first-strand cDNA ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iScript™ Select cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) เพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการเพิ่มปริมาณยีน VTG และ β -actin และศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VTG ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน VTG และ β -actin บางส่วนด้วยเทคนิค RT-PCR

เนื่องจากในฐานข้อมูลต่าง ๆ ยังไม่มีการรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG และ β -actin ของปลาหมอช้างเหยียบ ดังนั้นจึงต้องทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณยีน VTG ใช้ไพรเมอร์ VF1 (5'-CAGGTNTTRGCWCARGAYTG-3') และ VR1 (5'-CCYTCATCCAGTCNRCAAC-3') ที่ได้จากการทำ alignment ของยีน VTG ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ จากฐานข้อมูล (Barucca *et al.*, 2006) และยีน β -actin ใช้ไพรเมอร์ actinf (5'-CAGGGAGAAGATGACCCAGAT-3') และ actinr (5'-GATACCGCAGGACTCCATACC-3') (Scholz and Gutzeit, 2000) โดยยีน β -actin ใช้เป็นยีนอ้างอิงในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VTG

ในปฏิกิริยา RT-PCR ที่มีปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Taq buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTPs ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 10 μ M primers ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, 1 U Taq DNA polymerase (Fermentas, Vilnius, Lithuania) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร และ first-strand cDNA ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสถานะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 30 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธี 1.5% agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ของยีน *VTG* และ *β -actin* ไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งทางด้าน 5' และ 3' ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้โปรแกรม BLASTn และ BLASTx (Altschul *et al.*, 1990) ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ ตามลำดับเพื่อให้ทราบชนิดของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β -actin* ที่ได้ใส่ในฐานข้อมูล GenBank

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG*

ทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ของปลาหมอช้างเหยียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* ทั้งสามชนิดของปลากระดุกแข็งชนิดต่าง ๆ ในบริเวณเดียวกัน โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA version 4.0 (Tamura *et al.*, 2007) วิธี Neighbor joining (NJ) และกำหนดค่า Bootstrap ที่ 1000 replicates

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ด้วยเทคนิค real-time PCR

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *VTG* และ *β -actin* ทั้งทางด้าน 5' และ 3' ที่ได้มาประกอบเข้าด้วยกันด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 บนฐานข้อมูล GenBank เพื่อใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ดังนี้ PVTG-1fq (5'-AGTAATCTGCCGTACCAGCACCCAG-3') และ P β VTG-1rq (5'-GTTGGAAGCATGGAGAGCGATGCC-3') โดยใช้ยีน *β -actin* เป็นยีนอ้างอิงที่มีไพรเมอร์ ดังนี้ PACT-1fq (5'-

ACTTGGCTGGTCGGGACCTCAC-3') และ PACT-1rq (5'-TTTCGGCTGTGGTGGTGAAGGAGT-3') จากนั้นทำปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้เครื่อง MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x iQ™ SYBR® Green Supermix ปริมาตร 13 ไมโครลิตร, 5 μ M primers ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร และ first-strand cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยมีสถานะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 40 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที โดยทำปฏิกิริยาตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละยีน จากนั้นทำการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001) โดยใช้ค่าระดับการแสดงออกของยีน *VTG* ของเดือนที่สูงที่สุดเป็น reference

การศึกษความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ตามฤดูกาลของปลาหมอช้างเหยียบ

ทำการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบในแต่ละเดือน โดยทดสอบสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson product moment correlation) หรือสหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman rank correlation) ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของข้อมูลที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($P < 0.01$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการแสดงออกของยีน *VTG* และค่า GSI ด้วยวิธี one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

ผลการทดลอง

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG และ β -actin บางส่วน

จากการเพิ่มปริมาณยีน VTG และ β -actin บางส่วนจากเนื้อเยื่อตับของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมีย พบว่า มีความยาวเท่ากับ 320 และ 478 คู่เบส ตามลำดับ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ไปเก็บไว้ในฐานข้อมูล GenBank ภายใต้ Accession number KU575010 และ KU575011

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ของยีน VTG ของปลาหมอช้างเหยียบไปเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn และ BLASTx ตามลำดับ พบว่ายีน VTG ของปลาหมอช้างเหยียบที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นชนิด Ab โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีน VTG ของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*; Accession number JQ283442) มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน VTG ของปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*;

Accession number X92804) พบว่า ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 1416-1521 ซึ่งอยู่ในตำแหน่งของโดเมน lipovitellin II (LVII)

จากการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงและตรวจสอบตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนที่เป็นไปได้ของยีน β -actin ของปลาหมอช้างเหยียบด้วยโปรแกรม BLASTx พบว่า ตรงกับลำดับกรดอะมิโนที่ 116-274 ของปลากา (*Labeo calbasu*; Accession number AF393832)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG

เนื่องจากยีน VTG มีทั้งหมด 3 ชนิด คือ Aa, Ab และ C จึงทำการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG ทั้งสามชนิดนี้ในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ โดยสร้างแผนภูมิต้นไม้ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามชนิดของยีน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG ของปลาหมอช้างเหยียบที่เพิ่มปริมาณได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของยีน VTG ชนิด Ab (ภาพที่ 1)

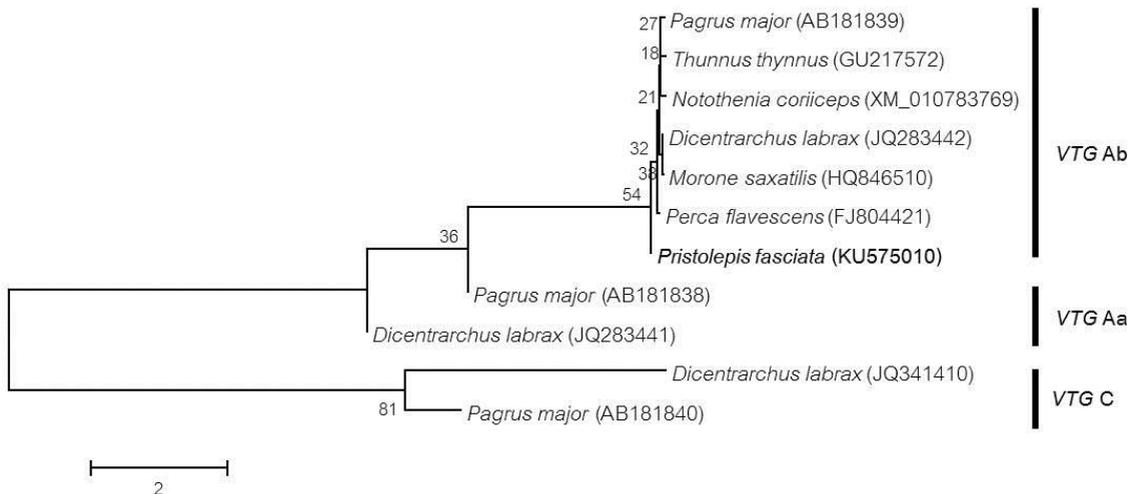


Figure 1. Phylogenetic tree of nucleotide sequences of three types of VTG, including Aa, Ab and C from other teleost fishes was constructed using the neighbor joining method. The VTGs sequences of fishes and their GenBank accession numbers are shown. The number presented the bootstrap value from 1000 replicates. The number of scale is shown the sequence divergence

ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG ของปลาหมอช้างเหยียบ

เมื่อทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน VTG ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว้านพะเยา เป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่า มีระดับการแสดงออกสูงสุดใน 2 ช่วงเวลา คือ ช่วงแรกมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มขึ้นจากเดือนพฤษภาคม ($0.31 \pm 0.09\%$) จนถึงเดือนกรกฎาคม ($1.00 \pm 0.19\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในเดือนกรกฎาคม และช่วงที่สองมีระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มขึ้นจากเดือนตุลาคม ($0.03 \pm 0.02\%$) จนถึงเดือนมกราคม ($0.99 \pm 0.14\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม ซึ่งหลังจากเดือนกรกฎาคมและมกราคมแล้วระดับการแสดงออกของยีนนี้จะลดลงทันทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 2A)

ดัชนีความสมบูรณ์เพศตามฤดูกาลของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศของปลาหมอช้างเหยียบในกว้านพะเยา เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยรวบรวมปลาทุกเดือน เดือนละ 6 ตัวอย่าง ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 58.85 ± 17.56 กรัม พบว่า มีค่าสูงสุด 2 ช่วง เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีน VTG ซึ่งช่วงแรกมีค่าสูงสุดในเดือนกรกฎาคม โดยเพิ่มจากเดือนมีนาคม ($2.63 \pm 0.15\%$) จนถึงเดือนกรกฎาคม ($10.05 \pm 2.61\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และช่วงที่สองมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม โดยเพิ่มจากเดือนตุลาคม ($2.17 \pm 0.58\%$) จนถึงเดือนมกราคม ($6.83 \pm 0.71\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งภายหลังจากที่ปลาหมอช้างเหยียบวางไข่แล้ว ค่า GSI จะลดลงทันทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 2B)

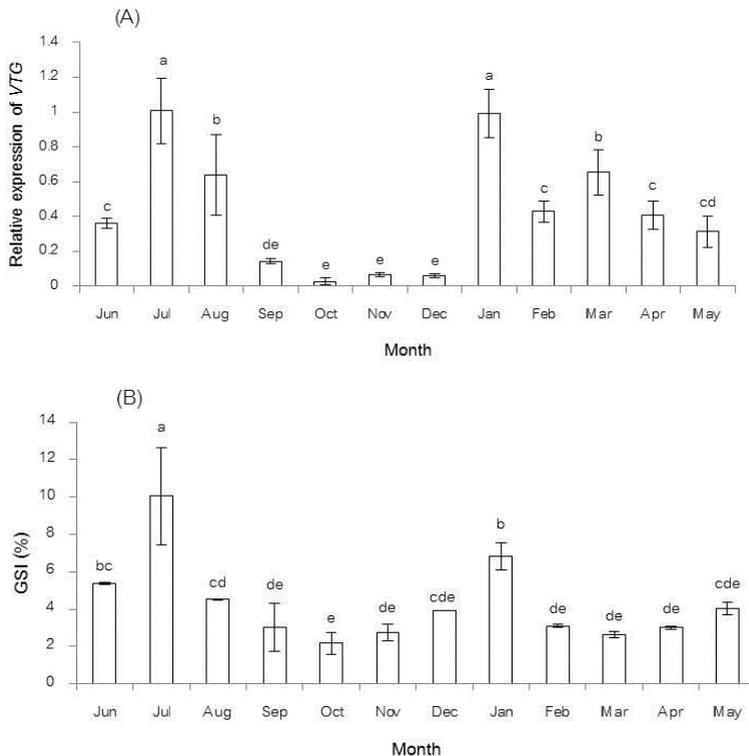


Figure 2. Mean values of relative expression levels of vitellogenin gene (A) and gonadosomatic index (B) in *Pristolepis fasciata* (n = 6 in each month) in Kwan Phayao. Different letters indicate statistically significant differences ($P < 0.05$)

ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาล ของยีน VTG และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล พบว่า ข้อมูลครั้งนี้มีการกระจายไม่เป็นโค้งปกติ ดังนั้น สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมนมีความเหมาะสมสำหรับการ วิเคราะห์สหสัมพันธ์ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งระดับการ แสดงออกของยีน VTG มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงหรือ โดยตรงกับค่า GSI อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r_s = 0.58$; $P < 0.01$) เมื่อระดับการแสดงออกของยีน VTG เพิ่มขึ้น ค่า GSI ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน และในทางกลับกัน เมื่อ ระดับการแสดงออกของยีน VTG ลดลง ค่า GSI ก็ จะลดลงด้วยเช่นเดียวกัน โดยระดับการแสดงออกของยีน VTG และค่า GSI จะมีค่าสูงเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูกลางฤดู และภายหลังจากที่ปลาหมอช้างเหยียบวางไข่แล้วนั้น ค่า ทั้งสองจะลดลงทันที

วิจารณ์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG บางส่วน

ในปลาโดยทั่วไปพบยีน VTG ทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ชนิด Aa, Ab และ C (Yilmaz *et al.*, 2015) หรือ ชนิด I, II และ III (Wang *et al.*, 2000) ซึ่งจากการศึกษา ครั้งนี้พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีน VTG ของปลาหมอ ช้างเหยียบเทศเมี่ยงได้เป็นชนิด Ab หรือชนิด II นั้นเอง นอกจากนี้ยีน VTG แต่ละชนิดยังประกอบด้วย 3 โดเมน คือ โดเมน lipovitellin I (LVI), phosvitin (PV) และ lipovitellin II (LVII) (Wallace, 1985) ซึ่งยีน VTG ชนิด Ab ที่เพิ่มปริมาณได้นั้นอยู่ในตำแหน่งของโดเมน lipovitellin II โดยโดเมน lipovitellin ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร จำพวกกรดอะมิโนและไขมันที่สำคัญต่อการพัฒนาของ ตัวอ่อน (Patiño and Sullivan, 2002)

ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน VTG

จากแผนภูมิต้นไม้ที่แสดงความสัมพันธ์เชิง วิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTG ทั้งสาม ชนิดในปลากระดูกแข็งชนิดต่าง ๆ พบว่า ยีน VTG ทั้งสาม ชนิดถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน โดยยีนที่เพิ่ม

ปริมาณได้ของปลาหมอช้างเหยียบถูกจัดอยู่ในกลุ่มยีน VTG ชนิด Ab เป็นการยืนยันชนิดได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยีน VTG ชนิด C ถูกแยกต่างหากออกจากชนิด Aa และ Ab อย่างชัดเจน เนื่องจากชนิด C มีความยาวที่ สั้นที่สุด เพราะไม่มีโดเมน phosvitin (Wang *et al.*, 2000)

ความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาล ของยีน VTG และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบ

จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่า ระดับการ แสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG และค่า GSI ของปลา หมอช้างเหยียบมีค่าสูงสุดใน 2 ช่วงเวลาเดียวกัน คือ ในช่วงเดือนกรกฎาคมซึ่งเป็นฤดูฝน โดยปลาส่วนใหญ่มัก วางไข่ในช่วงนี้และเดือนมกราคม แสดงว่าปลาหมอ ช้างเหยียบในกว๊านพะเยามีการวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้ง ในรอบปี สอดคล้องกับการศึกษาของศิริลักษณ์ และ ณ์รัฐวุฒิ (2557) ได้ศึกษาฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอ ช้างเหยียบในกว๊านพะเยา ระหว่างเดือนมิถุนายน 2555 ถึงเดือนพฤษภาคม 2556 จากปลาเทศเมี่ยง จำนวน 307 ตัว พบว่า ค่า GSI มีค่าค่อนข้างสูงตลอดทั้งปี โดยสูงสุดในเดือนสิงหาคม แสดงให้เห็นว่า ปลาหมอช้างเหยียบใน กว๊านพะเยามีการวางไข่ได้ตลอดทั้งปีหรือมากกว่า 1 ครั้ง ในรอบปีเช่นเดียวกัน โดยน้ำหนักของปลาหมอช้างเหยียบ เทศเมี่ยง ทั้ง 72 ตัวที่ใช้ในการศึกษาค้นนี้มีน้ำหนักเฉลี่ย 58.85 ± 17.56 กรัม ซึ่งถือว่าอยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์ สามารถใช้เป็นตัวแทนในการศึกษานี้ได้ เนื่องจากมี น้ำหนักใกล้เคียงกับการศึกษาของสุจิตา และเมธา (2548) คือ 39.39 ± 29.93 กรัม นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 18.00-170.00 กรัม ตามการศึกษาของศิริลักษณ์ และ ณ์รัฐวุฒิ (2557) อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามเดือนที่มีค่า GSI สูงสุดของการศึกษานี้มีความแตกต่างจากการศึกษาของ ศิริลักษณ์ และ ณ์รัฐวุฒิ (2557) ซึ่งอาจมีสาเหตุ เนื่องมาจากจำนวนและน้ำหนักของปลาดูอย่างที่แตกต่างกัน

เนื่องจาก VTG เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง โปรตีนไข่แดงเพื่อเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อน ดังนั้นในช่วง ฤดูกาลวางไข่ พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน VTG และค่า GSI สูงสุดในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลาดุกอุย (Panprommin *et al.*, 2008) ปลาสลัด และปลาไส้ตัน

ตาขาว (Panprommin *et al.*, 2015) โดยระดับการแสดงออกของยีน VTG สามารถบ่งบอกได้ถึงระยะของพัฒนาการของไข่ได้ (Mikawa *et al.*, 2006)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG และค่า GSI ของปลาหมอช้างเหยียบโดยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน VTG และค่า GSI มีความสัมพันธ์โดยตรงกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Panprommin *et al.* (2015) พบว่า ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG และค่า GSI ของปลาสร้อยและปลาได้ต้นตาขาวมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาคั้งนี้จะเห็นได้ว่านอกจากการใช้ดัชนีความสมบูรณ์เพศในการบ่งบอกถึงฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา แล้ว ยังสามารถใช้ระดับการแสดงออกตามฤดูกาลของยีน VTG ได้อีกด้วย นอกจากนี้กรมประมงได้กำหนดให้ตั้งแต่วันที่ 16 พฤษภาคม ถึง 15 กันยายน ของทุกปีเป็นฤดูปลามีไข่ในน่านน้ำจืดในท้องที่ทั่วประเทศ ห้ามมิให้ผู้ใดทำการประมงด้วยเครื่องมือทำการประมง หรือด้วยวิธีใด ๆ ทั้งสิ้น เพื่อให้ปลาได้มีโอกาสผสมพันธุ์ วางไข่ และขยายพันธุ์ต่อไปได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยาแล้ว พบว่า สอดคล้องกับช่วงเวลาที่ยกมาที่กำหนดบางช่วงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามก็คาดว่าน่าจะเพียงพอให้ปลาชนิดนี้ได้มีโอกาสขยายพันธุ์ต่อไปได้

สรุป

ยีน VTG ที่เพิ่มปริมาณได้จากเนื้อเยื่อตับของปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียเป็นชนิด Ab ซึ่งระดับการแสดงออกของยีนดังกล่าวมีศักยภาพในการบ่งบอกถึงความสมบูรณ์เพศและฤดูกาลวางไข่ได้เช่นเดียวกับค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ เนื่องจากค่าทั้งสองนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อกัน โดยปลาหมอช้างเหยียบเพศเมียในกว๊านพะเยาสามารถวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งในรอบปี คือ ในช่วงเดือนกรกฎาคมและมกราคม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ภายใต้โครงการ “การบริหารจัดการทรัพยากรประมงในกว๊านพะเยา เพื่อให้เกิดการใช้ประโยชน์เชิงอนุรักษ์อย่างยั่งยืน” และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณหัวหน้าห้องปฏิบัติการกลาง และคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กรมควบคุมมลพิษ. 2557. รายงานประจำปี สำนักจัดการคุณภาพน้ำ พ.ศ. 2557. กรมควบคุมมลพิษ, กรุงเทพฯ. 116 หน้า.
- ธนัชฐา ทรรพนันท์ ใจดี และ อมรศักดิ์ สวัสดิ์. 2550. คู่มือชีววิทยาประมงภาคปฏิบัติ. บริษัท มิสเตอร์ก๊อบปี่ (ประเทศไทย) จำกัด, กรุงเทพฯ. 92 หน้า.
- ศิริลักษณ์ วลัยบุษย์เพียร และ ณัฐวุฒิ งามสม. 2557. ฤดูกาลวางไข่ของปลาหมอช้างเหยียบ (*Pristolepis fasciata*) ในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา. แก่นเกษตร 42(ฉบับพิเศษ 1): 768-772.
- สุจิตา ไส้ะปิ่น และ เมธธา คชาภิชาติ. 2548. ชีววิทยาบางประการของปลาหมอช้างเหยียบในกว๊านพะเยา จังหวัดพะเยา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2548. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Barucca, M., A. Canapa, E. Olmo and F. Regoli. 2006. Analysis of vitellogenin gene

- induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various Mediterranean fish species. *Environmental Research* 101: 68-73.
- Ebrahimi, M. and M. Taherianfard. 2011. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor river. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10(1): 13-24.
- Hanson, R., D.K. Dodoo, D.K. Essumang, J. Blay, Jr., and K. Yankson. 2007. The effect of some selected pesticides on the growth and reproduction of fresh water *Oreochromis niloticus*, *Chrysichthys nigrodigitatus* and *Clarias gariepinus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 79(5): 544-547.
- Htun-Han, M. 1978. The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: gonosomatic index, hepatosomatic index and condition factor. *Journal of Fish Biology* 13: 369-378.
- Johnsen, H.K., H. Tveiten, N.P. Willassen and A.M. Arnesen. 1999. Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology* 124 B: 355-362.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta Ct) method. *Methods* 25: 402-408.
- Mikawa, N., T. Utoh, N. Horie, A. Okamura, Y. Yamada, A. Akazawa, S. Tanaka, K. Tsukamoto, I. Hirono and T. Aoki. 2006. Cloning and characterization of vitellogenin cDNA from the common Japanese conger *Conger myriaster* and vitellogenin gene expression during ovarian development. *Comparative Biochemistry and Physiology* B 143(4): 404-414.
- Mouchel, N., V. Trichet, A. Betz, J.-P.L. Pennec and L. Wolff. 1996. Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene* 174: 59-64.
- Panprommin, D., S. Pithakpol, S. Valunpion and K. Soontompravit. 2015. Correlation of spawning season and maturational parameters, expression levels of vitellogenin genes in *Notopterus notopterus* and *Anemichthys armatus* in Kwan Phayao, Thailand. *Kasetsart University Fisheries Research Bulletin* 39(3): 1-14.
- Panprommin, D., S. Poopuang and P. Srisapomee. 2008. Molecular characterization and seasonal expression of the vitellogenin gene from Günther's walking catfish *Clarias microcephalus*. *Aquaculture* 276: 60-68.
- Patiño, R. and C.V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26(1): 57-70.
- Sapbamrer, R. and S. Hongsihong. 2014. Organophosphorus pesticide residues in vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao Lake of Northern Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 60-67.
- Scholz, S. and H.O. Gutzeit. 2000. 17- α -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 50: 363-373.

- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tupwongse, V., P. Parkpian, P. Watcharasit and J. Satayavivad. 2007. Determination of levels of Mn, As, and other metals in water, sediment, and biota from Phayao Lake, Northern Thailand, and assessment of dietary exposure. *Journal of environmental science and health. A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 42(8): 1029-1041.
- Wallace, R.A. 1985. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. pp. 127-177. *In: L.W. Browder (ed.). Developmental Biology. vol. i. Plenum Press, New York.*
- Wang, H., T. Yan, J.T. Tan and Z. Gong. 2000. A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosphitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene* 256: 303-310.
- Yilmaz, O., F. Prat, A.J. Ibañez, H. Amano, S. Koksoy and C.V. Sullivan. 2015. Estrogen-induced yolk precursors in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*: Status and perspectives on multiplicity and functioning of vitellogenins. *General and Comparative Endocrinology* 221: 16-22.
-