

**Thesis Title** The Study of the Sex Hormonal Profile and the Gonad Development of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey) by Sustained Release Hormone Dosage Forms

**Author** Mr. Kriangsak Meng-Umphan

**Ph.D.** Biotechnology

**Examining Committee**

Assoc. Prof. Dr. Aranya Manosroi	Chairperson
Assoc. Prof. Dr. Jiradej Manosroi	Member
Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand	Member
Asst. Prof. Dr. Umnat Mevatee	Member
Dr. Apichart Termvidchakorn	Member

## ABSTRACT

The objectives of this research were to investigate chromosomal karyotyping of the Mekong giant catfish (MGC; *Pangasianodon gigas*, Chevey), to examine the annual sex hormonal profile and gonad development, age determination, the *in vitro* release study and stability of the artificial hormones suspended in soybean oil sustained release formulation and the effects of the formulated artificial hormones on maturation induction of MGC reared in earthen ponds. The chromosomal karyotyping were performed from peripheral blood lymphocytes of the MGC from earthen pond

and two reservoir locations. All locations showed identical karyotype comprising of 5 metacentric (M), 13 submetacentric (SM), 7 subtelocentric (ST) and 5 acrocentric (A) with a diploid chromosome number of 60. The XX and XY of homogametic and heterogametic chromosomes of male and female MGC were also demonstrated. For the release study through artificial membrane and stability study of testosterone (T), estradiol (E2), domperidone (DOM) and gonadotropin releasing hormone analog (GnRH<sub>a</sub>), the HPLC technique was validated to be the proper method to assay these compounds suspended in soybean oil. The retention time (RT) of E2, T, DOM and GnRH<sub>a</sub> were 4.8, 5.21, 11.60 and 15.50 mins, respectively. E2 and T gave less percentage release than DOM and GnRH<sub>a</sub>. After 50 hrs., about 60 % GnRH<sub>a</sub> were released. DOM and T gave the release of only 1 % of the initial while estradiol gave only 0.01 %. The stability of E2 and T suspension in soybean oil was higher than DOM and GnRH<sub>a</sub>. At 4 °C, all compounds gave the highest stability compared to room temperature (25 °C) and 45 °C. For the study on annual sex hormonal profiles and gonad development as well as age determination of the MGC caught from the Mekong river and reared in earthen ponds, the reproductive parameters and hormonal levels of the MGC from earthen ponds during January to April, May to August and September to December corresponded to the preparatory, spawning and post-spawning period, respectively. The preliminary study of the effects of GnRH<sub>a</sub> in soybean oil suspension on sexual development of a close related fish to MGC, *Pangasius hypophthalmus*, (one and a half years old, 0.9 kg body weight), was performed. After 150 and 240 days of injection with GnRH<sub>a</sub> at 100 to 300 µg/kg in combination with DOM at 5 to 20 mg/kg, T and E2 levels were higher than before injection. GSI values and oocyte development treated with GnRH<sub>a</sub> and DOM were

better than those treated with T or E2 at 20 mg/kg and the control group. Moreover, the reproductive parameters were related to the annual reproductive cycle i.e., June and September (spawning season), February and November (pre and post spawning season). *P. hypophthalmus* could reach maturation within 1.5 years old by injecting with hormone suspended in soybean oil. The 9-year-old MGC, weighed 14 kg at Maejo University, in Chiang Mai treated with 300 µg/kg of GnRHa in combination with 20 mg/kg of DOM showed better development in sex hormone levels after 15 and 60 days of the injection than before the treatment and the control group. This 9-year-old MGC also showed better ovulation and spermatation than the 7-year-old MGC at the Charan Farm in Chiang Rai. This was clearly observed from volume and density of sperms and eggs obtained after 82 days of the treatment during spawning season. The 9-year-old males produced high volume of sperms in all treatments with active motility. Eggs could be only stripped from fish treated with 300 µg/kg of GnRHa in combination with 20 mg/kg of DOM. The sperm from the 10-year-old MGC male at Maejo University treated with 50 µg/kg of GnRHa could fertilize with eggs from female MGC at the Phayao fisheries station and 600 fingerling of MGC were obtained. At Maejo University, the first successful fertilized eggs of the 10-year-old MGC reared in earthen pond were achieved on July 17, 2002 and 11 MGC fingerlings survived. The highest cumulative spawning and spermatation number was from those treated with 50 µg/kg GnRHa and the lowest one was from the control group treated with 0.9 % NaCl. Information from this study will be beneficial for the artificial breeding of MGC by hormone manipulation in order to reduce the age of maturity, the broodstock management to solve the diminishing number of wild endangered fish, and the development of breeding techniques of MGC in the future.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาระดับฮอร์โมนเพศและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ปลาบึก  
(*Pangasianodon gigas*, Chevey) ให้สู่วัยเจริญพันธุ์ด้วยรูปแบบ  
ฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้น

ชื่อผู้เขียน

นายเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน

วท.ค.

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญญา มโนสร้อย

ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. จีระเดช มโนสร้อย

กรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร. เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์

กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อำนาจ มีเวที

กรรมการ

ดร. อภิชาติ เต็มวิชากร

กรรมการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะของโครโมโซม ระดับฮอร์โมนเพศและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี การหาอายุ การศึกษาการปลดปล่อยและความคงตัวของฮอร์โมนสังเคราะห์แขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลือง และผลของตำรับฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้นต่อการเร่งการเจริญพันธุ์ในปลาบึก (*Pangasianodon gigas*, Chevey) ที่เลี้ยงในบ่อดิน จากการศึกษาลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวในปลาบึกที่ได้จากบ่อดินและแหล่งน้ำสองแหล่ง พบว่าทั้งสาม

แหล่งประกอบด้วยโครโมโซมแบบ metacentric (M) 5 คู่, submetacentric (SM) 13 คู่, subtelocentric (ST) 7 คู่ และ acrocentric (A) 5 คู่ มีจำนวนโครโมโซม  $2N=60$  โครโมโซมในเพศเมียเป็นแบบ XX และในเพศผู้เป็นแบบ XY ในการศึกษาคุณสมบัติการซึมผ่านเมมเบรน สังเคราะห์และความคงตัวของฮอร์โมน testosterone (T), estradiol (E2), domperidone (DOM) และ gonadotropin releasing hormone analog (GnRHa) สามารถวิเคราะห์สารเหล่านี้ด้วยเครื่อง HPLC โดยค่า retention time (RT) ของฮอร์โมน E2, T, DOM และ GnRHa มีค่าเท่ากับ 4.8, 5.21, 11.60 และ 15.50 นาที ตามลำดับ อัตราการซึมผ่านเมมเบรนของ E2 และ T น้อยกว่า DOM และ GnRHa หลังจาก 50 ชั่วโมง GnRHa สามารถซึมผ่านได้ 60 % ในขณะที่ DOM และ T ซึมผ่านได้ 1 % ส่วน E2 ซึมผ่านได้ 0.01 % พบว่าความคงตัวของ E2 และ T แฉวณลอยในน้ำมันถั่วเหลืองดีกว่า DOM และ GnRHa ฮอร์โมนทั้งหมดที่เก็บไว้ที่ 4°C มีความคงตัวดีกว่าเมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25°C) และ 45°C ระดับฮอร์โมนเพศในรอบปี ด้ชนีการเจริญพันธุ์และอายุของปลาบึกจากบ่อดินและจากแม่น้ำโขงมีความสัมพันธ์กับฤดูกาลเจริญพันธุ์ โดยเดือนมกราคม-เมษายนเป็นช่วงก่อนฤดูวางไข่ เดือนพฤษภาคม-สิงหาคมเป็นช่วงฤดูวางไข่ และเดือนกันยายน-ธันวาคมเป็นช่วงหลังฤดูวางไข่ ได้ศึกษาเบื้องต้นของผลฮอร์โมน GnRHa แฉวณลอยในน้ำมันถั่วเหลืองในปลาที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงปลาบึกคือปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) (อายุปีครึ่ง น้ำหนักตัว 0.9 กก.) พบว่าการใช้ฮอร์โมน GnRHa ที่ความเข้มข้น 100 - 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ร่วมกับ DOM 5 - 20  $\text{mg}/\text{kg}$  หลังฉีดนาน 150 และ 240 วัน ระดับฮอร์โมน T และ E2 เพิ่มขึ้นกว่าก่อนฉีด การพัฒนาของดัชนีความสมบูรณ์เพศและการพัฒนาของไข่ของปลาที่ฉีดด้วย GnRHa ดีกว่าปลาที่ฉีดด้วย T หรือ E2 ที่ความเข้มข้น 20  $\text{mg}/\text{kg}$  และชุดควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าฤดูกลางวางไข่ของปลาสวายในรอบปีได้แก่เดือนมิถุนายน-กันยายนเป็นฤดูกลางวางไข่

เดือนกุมภาพันธ์และเดือนพฤศจิกายนเป็นฤดูก่อนและฤดูหลังการวางไข่ และได้ชี้ให้เห็นว่าสามารถกระตุ้นการวางไข่และการผสมพันธุ์ในปลาอายุปีครึ่งด้วยการฉีดฮอร์โมนได้ ผลการฉีดฮอร์โมน GnRHa ความเข้มข้น 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ผสม DOM 20  $\text{mg}/\text{kg}$  แฉวนลอยในน้ำมันถั่วเหลืองในปลาบึกอายุ 9 ปี น้ำหนัก 14 กก. เลี้ยงที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ พบว่ามีระดับฮอร์โมนเพศเพิ่มขึ้นก่อนการวางไข่หลังฉีดเป็นเวลานาน 15 และ 60 วัน เมื่อเทียบกับก่อนฉีดและชุดควบคุม ปลาบึกอายุ 9 ปีนี้มีการวางไข่และมีน้ำเชื้อดีกว่าปลาบึกอายุ 7 ปี ที่จรัลฟาร์มจังหวัดเชียงราย ทั้งนี้สังเกตได้จากปริมาตรไข่และความหนาแน่นสูงของน้ำเชื้อที่มีปริมาณมากและเคลื่อนไหวดีหลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 82 วัน ในระหว่างฤดูวางไข่รีดน้ำเชื้อได้ทุกชุดการทดลอง ไข่สามารถรีดได้เฉพาะจากปลาบึกที่ฉีดด้วย GnRHa 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ผสม DOM 20  $\text{mg}/\text{kg}$  น้ำเชื้อจากปลาบึกอายุ 10 ปีที่ฉีดด้วย 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ของ GnRHa ที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้สามารถผสมกับไข่ปลาบึกที่ได้จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยาและได้ลูกปลาบึกจำนวน 600 ตัว ส่วนไข่ที่ได้จากปลาบึกที่เลี้ยงที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประสบความสำเร็จครั้งแรกในการผสมเทียมเมื่อวันที่ 17 กรกฎาคม 2545 และได้ลูกปลาบึก 11 ตัว พบว่าปลาบึกที่สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อสะสมสูงสุดเป็นปลาที่ฉีดด้วย GnRHa 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  และต่ำสุดในปลาบึกจากชุดควบคุมที่ฉีดด้วย 0.9% NaCl ข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะผสมเทียมปลาบึกเพื่อการลดอายุการเจริญพันธุ์ การจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกจากการเลี้ยงเพื่อทดแทนพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่ลดลง และการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาบึกต่อไปในอนาคต