ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ — **สาขา**

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ — **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนแม่กุ้งและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์พ่อกุ้ง
Effects of Salinity on Hormonal Changes of Previtellogenesis and Sperm Quality in The Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นายเอกชัย ดวงใจ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพร หมื่นพล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(อาจารย์ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....
(อาจารย์พนิดา อุนะกุล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพร หมื่นพล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนแม่กุ้งและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์พ่อกุ้ง

Effects of Salinity on Hormonal Changes of Previtellogenesis and Sperm Quality in The Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นายเอกชัย ดวงใจ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2558

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกชัย ดวงใจ 2558: ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนแม่กุ้งและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์พ่อกุ้ง ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพร หมื่นพล, Ph.D. 184 หน้า

ตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_2\alpha$ ในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย (น้ำหนักประมาณ 40 กรัม อายุ 120 วัน) ในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ จาก 2 กลุ่มทดลอง เลี้ยงในกระชัง (5x5 ม.) ที่ความเค็มน้ำ 15 และ30 ppt ในบ่อดิน และวิเคราะห์อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg และ FAMeT gene โดยวิธี RT-PCR ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ Vg และ FAMeT gene ขนาด 357 และ 314 คู่เบส ตามลำดับ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNAs ของยีนทั้งสองชนิด วิเคราะห์ผลใช้ 1st cDNA ของเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ผลการศึกษา พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_2\alpha$ ในน้ำเลือดกุ้งทดลอง และอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg และ FAMeT gene ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนกุ้งขาวแวนนาไมจากสองกลุ่มทดลอง มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_2\alpha$ รวมทั้งค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg และFAMeT gene สูงกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังทำการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม (น้ำหนักประมาณ 35 กรัม อายุ 120 วัน) โดยใช้วิธีแบบดั้งเดิมและวิธีโคเมท แอสเสย์ จากตัวอย่างกุ้งทดลอง 2 กลุ่ม กลุ่มแรก; ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ กลุ่มสอง; ใช้ตัวอย่างสเปิร์มจากกุ้งเพศผู้ซึ่งเมื่อผสมกับกุ้งเพศเมียได้ปริมาณนอร์เพลียสแตกต่างกัน 4 กลุ่ม ผลการศึกษา พบว่า คุณภาพสเปิร์มซึ่งวิเคราะห์ผลด้วยวิธีแบบดั้งเดิมไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในแต่ละพารามิเตอร์ (ปริมาณสเปิร์มสุทธิ, %การตายของสเปิร์ม, % เส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม และระยะเวลาในการสร้างถุงสเปิร์ม) ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโคเมท แอสเสย์ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ใน 6 พารามิเตอร์ ได้แก่ Healthy cell, Comet Length, Tail Length, %Tail Moment, %DNA in Tail และ Olive Moment จากทั้ง 2 กลุ่มทดลอง ผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าสามารถตรวจพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ โดยใช้ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_2\alpha$ ในน้ำเลือด และค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg และ FAMeT gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนกุ้งเพื่อใช้เป็นตัวชี้บ่งวัดทางชีวภาพสำหรับประเมินพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งจะเป็นประโยชน์ด้านการจัดการให้กุ้งสามารถพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ กระทั่งกุ้งวางไข่ได้เองในที่กักขังโดยไม่ถูกตัดก้านตา เช่นเดียวกับเทคนิคโคเมท แอสเสย์ พบว่า สามารถที่จะใช้ตรวจวัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในระดับสารพันธุกรรมซึ่งจะเป็นประโยชน์ในแง่ความสามารถในการคาดการณ์ได้ถึงคุณภาพของนอร์เพลียส

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ekachai Duangjai 2015: Effects of Salinity on Hormonal Changes of Previtellogenesis and Sperm Quality in The Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Doctor of Philosophy (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Assistant Professor Oraporn Meunpol, Ph.D. 184 pages.

Female *L. vannamei*, (40 g.bw, 120 days approx.) with previtellogenic ovaries were reared in cages (5x5 m^2) installed in two earthen ponds; one filled with 15 ppt and others filled with 30 ppt. Haemolymph, hepatopancreas and ovaries of shrimp were collected monthly for hormone analysis. P_4, E_2 and $PGF_{2\alpha}$ levels in shrimp haemolymph were measured by either RP-HPLC or RIA. Biological marker (primer) specific for 314 bp of FAMeT and 357 bp of Vg gene modified from NCBI has been developed from hepatopancrease of female *L. vannamei*. Vg and FAMeT gene expression level using 1stcDNA synthesis from hepatopancreas and ovary tissues were determined by RT-PCR. The results showed that the levels of Vg and FAMeT gene expression in ovaries and hepatopancreas of shrimp reared in 30 ppt were significantly higher than shrimp reared in 15 ppt. The mean expression level of Vg and FAMeT gene in hepatopancreas of shrimp was higher than in ovaries. Similarly, changes of P_4, E_2 and $PGF_{2\alpha}$ levels and also GSI of shrimp reared in 30 ppt were significantly higher than shrimp reared in 15 ppt ($P<0.05$). In conclusion, it was clearly shown that salinity played an important role over shrimp ovarian development which could be proved at different levels ie. morpholical changes (GSI), hormonal changes and gene expression levels changes. This study was also the first to use comet assay for gamete quality determination of males shrimp by compared the traditional techniques and comet assay technique to assess sperm quality obtained the different numbers of nuplius of four groups reared two months under 30 ppt conditions. These techniques also use to study the sperm quality obtained from different sea water (15 and 30 ppt) and rearing condition (cement and earthed pound). The results demonstrated that average total sperm counts, sperm dead (%), sperm diameter (%) and spermatophore formation measured by traditional techniques showed no significantly different results ($P>0.05$). Whereas comet assay as Healthy cell, Comet Length, Tail Length, %Tail Moment, %DNA in Tail and Olive Moment displayed significantly different results ($P<0.05$). The results showed that the biological marker (P_4 E_2 and $PGF_{2\alpha}$ levels and also Vg and FAMeT gene expression level) can use to determine the change of gonad development of females *L. vannamei*. The results also showed that comet assay is more powerful than traditional techniques due to its ability in measuring at deeper level ie., DNA quality of sperms while the latter techniques can reveal only superficial aspects of sperm quality.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง การแสดงออกของยีนควบคุมการเจริญพันธุ์ของกุ้งทะเลหลังให้อาหารกระตุ้นการเจริญพันธุ์ และการตรวจสอบคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารส่งเสริมการเจริญพันธุ์ด้วยวิธีโคเมทแอสเสย์ได้รับทุนสนับการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.)

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชลี ไพบูลย์กิจ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกสถาบันที่ให้คำแนะนำแนวทางการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบรูณ์ครบถ้วน และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์อรพร หมื่นพล (Ph.D.) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ (Ph.D.) อาจารย์ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ (Ph.D.) และอาจารย์พนิดา อุนะกุล (Ph.D.) อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จได้ด้วยดี

ขอบคุณ คุณวรรณวิภา สุทธิไกร และคุณราตรี จินตนา ที่โครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก คณะสัตวแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เจ้าหน้าที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา รวมทั้งนวพันธุ์ฟาร์ม อำเภอตะกั่วป่า จังหวัดพังงา ที่ให้คำแนะนำและเอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่ทดลอง

กราบขอบพระคุณบิดามารดาและสมาชิกในครอบครัวของข้าพเจ้าทุกคน คุณพ่อสมจิตต์ คุณแม่ทิวา ปั้นรูป และครอบครัว รวมทั้งคุณจิตรา ปั้นรูป และ ด.ญ. ดุษฎี ดวงใจ สำหรับกำลังใจแก่ข้าพเจ้าทำให้วิทยานิพนธ์ครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกชัย ดวงใจ

มกราคม 2558

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	44
อุปกรณ์	44
วิธีการ	49
ผลและวิจารณ์	82
ผล	82
วิจารณ์	126
สรุปและข้อเสนอแนะ	134
สรุป	134
ข้อเสนอแนะ	137
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	138
ภาคผนวก	162
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	184

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene specific primers (Forward และ Reverse) ของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งใช้ในการศึกษาครั้งนี้	61
2	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ 1st cDNA เพื่อใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไม	63
3	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของ 1st cDNA ที่ใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาว-แวนนาไม	65
4	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจาก PCR Product (DNA Purification) ของกุ้งขาวแวนนาไม	66
5	ส่วนผสม (components) ที่ใช้เชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM®-T Easy vector	67
6	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตรวจสอบ colony PCR ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการโคลนเพื่อตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์	69
7	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตัด plasmidDNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Eco*R I เพื่อยืนยันขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่โคลนเข้าใน pGEM®-T Easy vector	71
8	ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไม	73

ตารางผนวกที่

1	ค่าความถูกต้อง (Recovery, %) ของการตรวจวัดระดับฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย	163
2	ความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวน-นาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt (Mean±SD, n=5)	163

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
3	ความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวน-นาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และ ค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt (Mean±SD, n=5)	164
4	อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)	164
5	ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับ-อ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)	165
6	ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)	165
7	อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)	166
8	ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ กลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธีแบบดัง เดิม (Mean±SD, n=5)	167
9	ค่าตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ในกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)	168
10	ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)	168

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

11	ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ กลุ่มที่1 2 3 และ 4 คัดเลือกตัวอย่างสเปิร์มจากกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธีแบบดังเดิม (Mean ±SD, n=5)	169
12	ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย กลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน (Mean ±SD, n=5)	169
13	ค่าตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)	170
14	ค่า Comet parameter ใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)	170

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931)	6
2	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไข่กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นตัวแทนของกุ้งกลุ่มพีนีอิคเพศเมียระยะต่างๆ	10
3	ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเป็นตัวแทนกุ้งกลุ่มพีนีอิคภายใต้กล้อง electron micrographs	12
4	หลักการของวิธีเรดิโออิมมูโน แอสเสย์	25
5	พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการประเมินความเสียหายของสารพันธุกรรมในโปรแกรม comet assay [Score] Freeware Version 1.5)	31
6	แผนผังการควบคุมกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสในครัสตาเซียน	43
7	ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมสำหรับตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ด้วยวิธี RIA	56
8	ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RIA	57
9	ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมสำหรับตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$	58
10	ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RT-HPLC	59
11	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ β-actin primer ขนาด 234 คู่เบส (Sense primer: 5' GCGAGAA-ATCGTTCGTGAC 3', Anti-sense primer: 5' TCTGGTGGA-TGTTGAGGTAGTA 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม	60
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg primer ขนาด 357 คู่เบส (Sense primer: 5' GAA-CTGCTCC-TTTCACTGCCTTTG 3', Anti-sense primer: 5' TTCCCTCGTGG-TTGACCTTGTAT 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม	61
13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FAMeT Primer ขนาด 314 คู่เบส (Sense primer: 5'-CTCAGGGTCCGTCCACTCCA -3', Anti-sense primer: 5'- ACTGCCTC-ACATACAACTTCATTC - 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	การจำแนกคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้ตัวบ่งชี้วัดจากโปรแกรม comet assay (Tritek Comet [Score] Freeware Version 1.5)	80
15	กราฟแสดงความขนานกันระหว่างฮอร์โมน P_4 (A) และ E_2 (B) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย เจือจางอย่างอนุกรม 2 4 6 8 และ 16 เท่า เทียบขนานกับฮอร์โมน P_4 และ E_2 มาตรฐาน	84
16	เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน P_4 (ngP_4/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt รวมทั้งแสดงค่า GSI ของกุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 (Mean±SD, n = 5)	86
17	เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน E_2 (pgE_2/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt รวมทั้งแสดงค่า GSI ของกุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 (Mean±SD, n = 5)	88
18	ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1=0.0009331 2=0.01555 3=0.02592 4=0.0432 5=0.072 6=0.12 7=0.18 8=0.2 และ 9=0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RP-HPLC	89
19	เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ($\mu gPGF_{2\alpha}$/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt และค่า GSI กุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 (Mean±SD, n = 5)	91
20	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5)	93
21	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5)	94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์1st cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n=5)	96
23	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 และเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean± SD, n=5)	97
24	น้ำหนัก (กรัมต่อตัว) และความยาว (เซนติเมตรต่อตัว) เฉลี่ยเริ่มต้นและสุดท้ายของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean± SD, n=5)	99
25	ปริมาณสเปิร์มสุทธิ (cell/g B.W) คัดแยกจาก vas deferens และ spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5)	101
26	เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มซึ่งคัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงเวลาการบ่ม นาน 1 และ 3 ชั่วโมง (Mean±SD, n=5)	102
27	เปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม (3 กับ 5 ไมโครเมตร) คัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5)	104
28	คุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมคัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5)	106
29	คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ Comet Length (px) Comet Height (px) Comet Area (px) และ Comet Mean Intensity (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean± SD, n=5)	109
30	คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 4 พารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ Head Diameter (px) Head Mean Intensity (px) %DNA in Head และ Head Area (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5)	110

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 4 พารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ %DNA in Tail, Tail Moment, Olive Moment และ Tail Length (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5)	111
32	คุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 และ 2 ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay	112
33	คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 3 และ 4 ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay	113
34	คุณภาพสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean±SD, n=5)	116
35	คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปร-แกรม comet assay ได้แก่ ค่า Comet Length (px) Comet Height (px) Tail Length(px) และ Comet Mean Intensity(px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5)	119
36	คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์ จากโปร-แกรม comet assay ได้แก่ Comet Area(px), Olive Moment, %DNA in Tail และ Tail Moment เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5)	120
37	คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผล โดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปร-แกรม comet assay ได้แก่ %DNA in Head, Head diameter(px), Head mean Intensity(px) และ Head Area (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5)	121
38	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Comet length(px), Comet area (px), Comet mean intensity(px) และ Tail length (px)) ของคุณภาพสเปิร์ม กับปริมาณนอร์เพลียส โดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทาง ตรงข้ามกัน (Mean±SD, n=5)	123
39	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Tail mean intensity (px),%Tail moment, %DNA in tail และ Olive moment) ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณ นอร์เพลียสโดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทางตรงข้ามกัน (Mean±SD, n=5)	124

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
40	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Head area(px), Head diameter (px), %DNA in head และ Head mean intensity (px)) ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส โดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทางเดียวกัน (Mean±SD, n=5)	125

ภาพผนวกที่

1	แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2)(B) สังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนด PCR Cycle ต่างกัน 5 ระดับ	171
2	แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และค่า Density (INT/mm^2) (B) สังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCRโดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ	172
3	แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene(A) และค่า Density (INT/mm^2) (B) สังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ	173
4	แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และค่า Density (INT/mm^2)(B) สังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ β-actin primer ต่างกัน 5 ระดับ	174
5	แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene(A) และค่า Density (INT/mm^2)(B) สังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม โดยกำหนด PCR Cycle ต่างกัน 5 ระดับ	175

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
6	แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ	176
7	แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1st cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ	177
8	แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้น FAMeT Primer ต่างกัน 5 ระดับ	178
9	แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนด PCR Cycle ต่างกัน 5 ระดับ	179
10	แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ	180
11	แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1st cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ	181

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
12	แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และค่า Density (INT/mm^2) (B)ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ Vg Primer ต่างกัน 5 ระดับ	182
13	แถบดีเอ็นเอของ β-actin (A) FAMeT (B) และ Vg gene (C) ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR	183

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของความเค็มต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนแม่กุ้งและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์พ่อกุ้ง

Effects of Salinity on Hormonal Changes of Previtellogenesis and Sperm Quality in The Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

คำนำ

การกระตุ้นการพัฒนาไข่และรังไข่แม่พันธุ์กุ้งทะเลที่ปฏิบัติกันทั่วไปในฟาร์มผลิตลูกกุ้งทะเลวัยอ่อน คือ การตัดตาเพื่อยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญของไข่ (Primavera, 1988; Primavera and Caballero, 1992) ส่งผลให้ระยะต่อมาแม่กุ้งจะมีการพัฒนาของไข่และรังไข่อย่างรวดเร็วในเวลาที่พร้อมเพรียงกัน การตัดตากุ้งแม้ว่าจะเป็นวิธีที่ได้ผลและยังสามารถควบคุมระยะการผลิตลูกพันธุ์กุ้งได้ตามความต้องการ แต่วิธีการดังกล่าวส่งผลกระทบด้านลบต่อสุขภาพแม่พันธุ์กุ้ง เช่น ทำให้แม่พันธุ์กุ้งเกิดการบอบช้ำทางร่างกาย โทรมและตายไว ทำให้การพัฒนารูปแบบการเลี้ยงกุ้งทะเลให้อยู่ภายใต้การควบคุมของมนุษย์ (domestication) ทำได้ยากไม่สามารถพัฒนาสายพันธุ์กุ้งให้ได้สายพันธุ์ที่โตเร็ว ต้านทานโรค และมีคุณสมบัติอื่น ๆ ตามที่อุตสาหกรรมต้องการได้ (Sainz-Hernández *et al*., 2008; Treerattrakool *et al*., 2008) ที่ผ่านมาพบความพยายามค้นหาวิธีอื่นที่เหมาะสมมากกว่าการตัดก้านตากุ้ง เช่น การนำสเตอรอยด์ ฮอร์โมนที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการพัฒนาของไข่และรังไข่ทั้งที่ผสมลงในอาหารโดยตรงหรือผ่านกระบวนทางด้านนาโนเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้งานได้ของฮอร์โมนในระบบการย่อยอาหารและการดูดซึมของกุ้งทะเล รวมทั้งการฉีดฮอร์โมนต่าง ๆ เช่น การฉีดสเตอรอยด์ ฮอร์โมน และฮอร์โมนในกลุ่มไบโอ-อามีน เช่น เซอโรโทนิน (Meunpol *et al*., 2007; Wang and Croll, 2006) เข้าสู่ร่างกายของกุ้งทดลองโดยตรง แต่วิธีการเหล่านี้มีข้อจำกัดในด้านต้นทุนของฮอร์โมนรวมทั้งเสียค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูงในการดำเนินการซึ่งไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาขยายผลสู่การผลิตกุ้งในเชิงอุตสาหกรรมได้

การศึกษาแนวทางเพื่อส่งเสริมให้กุ้งมีพัฒนาการของเซลล์ไข่และรังไข่ในช่วงต้นหรือช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ได้ด้วยตัวเองตั้งแต่ช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อหลีกเลี่ยงวิธีการตัดก้านตากุ้ง แต่ปัจจุบันความรู้ทางด้านนี้ยังขาดแคลนทำให้ไม่สามารถจัดการให้กุ้งพัฒนาของระบบสืบพันธุ์กระทั่งวางไข่ได้เองในที่กักขังโดยที่แม่พันธุ์กุ้งไม่ถูกตัดก้าน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตา ในขณะที่ปัจจุบันการตรวจสอบพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งทะเลพบการตรวจวัดเฉพาะช่วงการเจริญเติบโตช่วงปลาย และช่วงสุดท้าย ของระบบสืบพันธุ์กุ้งเท่านั้น เช่น สังเกตจากการเปลี่ยนแปลงขนาดและสีของรังไข่และไข่จากลักษณะภายนอกร่างกายกุ้ง (Primavera, 1988; Parnes *et al*., 2004) การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสารไวเทลโลเจนนินในน้ำเลือด (Wouters *et al*., 2001; Arcos *et al*., 2011) แต่วิธีการศึกษาข้างต้นขาดความรู้และความเข้าใจขั้นพื้นฐานด้านสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์กุ้ง โดยเฉพาะการเปลี่ยนของฮอร์โมนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ซึ่งมีความสำคัญสำหรับการส่งเสริมพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งทะเลให้ครบวงจร ทั้งนี้เนื่องมาจากแม่พันธุ์กุ้งที่จะมีการแสดงออกของระบบสืบพันธุ์ช่วงสุดท้ายจนสามารถวางไข่ได้ดีนั้น จำเป็นต้องมีความสมบรูณ์ทางด้านพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ช่วงต้นที่ดีมาก่อน นอกจากนี้การส่งเสริมพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในช่วงต้นยังเป็นหัวใจสำคัญของการที่จะทำให้แม่พันธุ์กุ้งทะเลเกิดการพัฒนาจนกระทั่งสามารถวางไข่สืบพันธุ์ในกักขังได้เอง โดยไม่ต้องตัดตา จึงมีความจำเป็นต้องตรวจวัดพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ช่วงต้นของกุ้งทะเลเพศเมีย ทั้งนี้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการวิเคราะห์พัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ให้มีความแม่นยำยิ่งมากขึ้น

ในเพศผู้ก็มีความสำคัญเช่นเดียวกับกุ้งทะเลเพศเมีย การติดตามพัฒนาการของสเปิร์มล้วนเป็นสิ่งจำเป็นในการสนับสนุนคุณภาพที่ดีของลูกกุ้งทะเล ที่ผ่านมาพบเฉพาะรายงานการตรวจวัดจากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงจากภายนอกตัวกุ้งเท่านั้น (Alfaro *et al*., 2003; Leung-Trujillo and Lawrence, 1987) วิธีการข้างต้นเป็นเพียงการตรวจวัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งจากการสังเกตเท่านั้น ไม่สามารถที่จะประเมินคุณภาพของสเปิร์มในระดับโมเลกุลดีเอ็นเอได้เมื่อเปรียบกับวิธี โคเมท แอสเสย์ ซึ่งจัดเป็นวิธีการวิเคราะห์คุณภาพของสเปิร์มในระดับสารพันธุกรรมที่ขาดและแตกหัก (DNA damage) (Gwo *et al*., 2003; Garron *et al*., 2012) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการตรวจสอบคุณภาพของสเปิร์มกุ้ง ซึ่งปัจจุบันวิธีนี้ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดสุขภาพของสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น (Wang *et al*., 2009; Mai *et al*., 2010)

นอกจากนี้ พัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งทะเลทั้งเพศผู้และเพศเมียยังได้รับอิทธิพลจากความเค็มของน้ำทะเล ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกายกุ้ง และความเค็มน้ำยังส่งผลต่อเนื่องไปยังพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์กุ้งทะเล (Vargas-Albores *et al*., 1993) โดยความเค็มที่เหมาะสมต่อการอยู่อาศัยของกุ้งขาวแวนนาไม คือ 15-25 ppt (Ponce-Palafor *et al*., 1997) การทดสอบผลของการถ่ายโอนน้ำเชื้อในกุ้งกุลาดำเพศผู้ไปยังกุ้งกุลาดำเพศเมียในสภาวะที่มีความเค็มสูง (52 ppt) พบว่า แม้จะถ่ายโอนน้ำเชื้อได้แต่เพศเมียไม่สามารถเกิดการพัฒนา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รังไข่ได้ ยกเว้นในกรณีที่เพศเมียถูกตัดก้านตา จึงสามารถเกิดการพัฒนารังไข่ได้ (Bray and Lawrence, 1998)

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของความเค็มต่อระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ รวมทั้งระดับการแสดงออกของ Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ รวมทั้งการตรวจวัดคุณภาพสารพันธุกรรมในระดับโมเลกุลดีเอ็นเอของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นในด้านการเปลี่ยน แปลงของฮอร์โมนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ รวมทั้งคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มต่างกัน เพื่อใช้เป็นแนวทางเบื้องต้นสำหรับจัดการการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมในพื้นที่กักขังโดยไม่ต้องตัดก้านตากุ้งในอนาคต ซึ่งเป็นเป้าหมายที่สำคัญระยะยาวของการเลี้ยงกุ้งทะ เลแบบยั่งยืน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

2. เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อระดับการแสดงออกของ Vg และ FAMeT gene ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

3. เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ด้วยเทคนิคแบบดังเดิม (Traditional techniques) และ โคเมท แอสเสย์ (Comet assay)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาวแวนนาไม

กุ้งขาวแวนนาไม หรือ Pacific white shrimp มีชื่อสามัญตามที่ Food and Agriculture Organization (FAO) รับรอง และใช้เรียกกันทั่วโลก คือ whiteleg shrimp เป็นกุ้งทะเลสายพันธุ์พื้นเมืองในทวีปอเมริกาใต้ (Holthuis, 1980) พบทั่วไปบริเวณชายฝั่งมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันออกจากตอนเหนือของประเทศเม็กซิโกจนถึงตอนเหนือของประเทศเปรู จากอดีตถึงปัจจุบันกุ้งชนิดนี้มีการเลี้ยงกันมากในประเทศเปรูเอกวาดอร์ เม็กซิโก ปานามา ฮอนดูรัส โคลัมเบียและบราซิล (Pérez Farfante and Kensley, 1997) ปัจจุบันกุ้งสายพันธุ์นี้ได้มีการเลี้ยงแพร่หลายในหลายประเทศ เช่น ในประเทศจีน ไต้หวัน (Tu *et al*., 1999) อินโดนีเซีย รวมทั้งประเทศไทย (ชลอ และพรเลิศ, 2547)

1.1. อนุกรมวิธาน

กุ้งขาวแวนนาไม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* ชื่อพ้อง *Penaeus vannamei* หรือมีชื่อเรียกภาษาท้องถิ่นของไทยหลากหลายชื่อ เช่น กุ้งขาว หรือกุ้งแวนนาไม (ชลอ และ พรเลิศ, 2547) กุ้งชนิดนี้ค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1931 โดย Booneในเวลาต่อมา Perez Farfante and Kensley (1997) ได้ลำดับลักษณะทางอนุกรมวิธานของกุ้งชนิดนี้ ดังนี้ Phylum: Arthropoda Subphylum: Crustacea Class: Malacostraca Order: Decapoda Suborder: Dendrobranchiata Family: Penaeidae Genus: *Litopenaeus* Species: *vannamei*

1.2. ลักษณะทั่วไป

กุ้งขาวแวนนาไม จัดอยู่ใน class malacostraca โดยคลาสนี้จัดเป็นคลาสที่ใหญ่ที่สุดในซับไฟลัม และจัดอยู่ในออเดอร์เดคพอดา (decapoda) หมายถึง สัตว์ที่มีขา 5 คู่ ลำตัวมี 8 ข้อปล้อง แยกเป็นส่วนหัวมี 1 ปล้อง กรีมีความยาว ประมาณ 0.8 เท่า ของความยาวเปลือก มีลักษณะกรีเป็นสันสูงและตอนปลายแคบคล้ายสามเหลี่ยม มีสีแดงอมน้ำตาล ด้านบน ประกอบด้วยฟันกรี จำนวน 8 ซี่ ด้านล่าง ประกอบด้วย ฟันกรี จำนวน 2 ซี่ ร่องบนของกรีสามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนความยาวของกรีจะยาวกว่าตาเล็กน้อย เปลือกหุ้มลำตัวจะมีโครงร่างเป็นไคตินหุ้มภายนอก (chitinus exoskeleton) ส่วนชั้นอิพิเดอร์มิสมีการสร้างคิวทิเคิล (cuticle) ซึ่งทำหน้าที่ห่อหุ้มป้องกันและลด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสูญเสียน้ำออกจากร่างกาย มีลักษณะเป็นสีขาวอมชมพูถึงแดง ลักษณะโครงสร้างของลำตัวในกุ้งชนิดนี้ ประกอบด้วย 2 ส่วน ส่วนแรก เรียกว่า เซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) ซึ่งเป็นส่วนที่มีการรวมเข้ากันระหว่างส่วนหัวกับส่วนอก ประกอบด้วย ระยางค์ต่าง ๆ ในแต่ละส่วน ดังนี้ (1) ส่วนหัว ประกอบด้วย ระยางค์ 5 คู่ ได้แก่ หนวด 2 คู่ (antenna and antennule) ขากรรไกรล่าง (mandible) 1 คู่ มีลักษณะเป็นฟันบดแข็ง ขากรรไกรบน (maxilla) 2 คู่ มีหน้าที่ช่วยจับอาหาร (2) ส่วนอก ประกอบด้วย ระยางค์ 8 คู่ คือ ระยางค์ที่ช่วยในการกิน(maxilliped) ขนาดเล็ก 3 คู่ ขาเดิน 5 คู่ ขาเดินคู่แรกเปลี่ยนเป็นก้ามหนีบ (cheliped) ใช้จับ อาหาร และส่วนที่สอง เรียกว่า แอบโดเมน (abdomen) ส่วนนี้ประกอบด้วยระยางค์ 6 คู่ ได้แก่ ขาว่ายน้ำ (pleopod หรือ swimmeret) 5 คู่ ใช้ว่ายน้ำ คู่สุดท้ายเป็นแพนหาง (uropod) โดยลักษณะเด่นของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งสังเกตเห็นได้ชัดเจนจากภายนอก คือ ผิวลำตัวเรียบเกลี้ยงเป็นมัน ลำไส้สามารถ มองเห็นชัดกว่ากุ้งขาวอื่นๆ โตเต็มวัยสมบูรณ์เต็มที่ของกุ้งชนิดนี้จะมีความยาวทั้งหมด ประมาณ 230 มิลลิเมตร (ภิญโญ, 2545; ปิยะบุตร, 2546; Motoh, 1981)



ภาพที่ 1 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei,* Boone, 1931)

ที่มา: ผู้วิจัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3. อุปนิสัยการกินอาหาร

ในธรรมชาติกุ้งในกลุ่มพีนีอิดจะหากินทุกระดับความลึกของน้ำ กุ้งไม่ฝังตัวอยู่กับตะกอนดินพื้นท้องน้ำ กินอาหารได้ทุกประเภท โดยจำแนก 85 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวกสัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเชียนและกลุ่มหอย และอีก 15 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นพวกเศษซากพืชซากสัตว์ สาหร่าย โพลีขีด เศษปลา และอินทรียวัตถุต่าง ๆ เป็นต้น (Zhang *et al*., 2006)

1.4. วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

กุ้งขาวแวนนาไมมีวงจรชีวิตทั้งหมดอยู่ในน้ำทะเล เมื่อกุ้งเจริญเติบโตถึงวัยเจริญพันธุ์ เพศเมียจะมีขนาด 45-50 กรัม ในขณะที่เพศผู้จะมีขนาด 35-43 กรัม อาศัยอยู่ตามแนวปะการังตามพื้นท้องน้ำ โดยปกติพ่อแม่พันธุ์กุ้งจะอาศัยอยู่ในน้ำทะเลลึกซึ่งเป็นระดับความลึกที่พ่อและแม่กุ้งจะผสมพันธุ์กัน (Dore and Frimodt, 1987) เมื่อเพศเมียมีพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะสุดท้าย กุ้งจะปล่อยฟีโรโมนออกมาส่งผ่านกระแสน้ำไปกระตุ้นเพศผู้ให้เข้ามาเกี้ยวพาราสี จากนั้นเพศผู้จะปล่อยถุงเก็บน้ำเชื้อ (sperm sac) ไว้ในถุงเก็บสเปิร์ม (opened thelycum) ของตัวเมียเป็นระยะเวลาหนึ่ง ประมาณ 4-6 ชั่วโมง ก่อนที่เพศเมียจะปล่อยไข่ (spawn) (Misamore and Browdy, 1996; Yano *et al*., 1988) โดยไข่ที่ออกมาในครั้งแรกประมาณ 1,357 -2,500 ฟองต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม แต่ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดของกุ้งเป็นสำคัญ โดยแม่กุ้งขนาดน้ำหนักระหว่าง 60 ถึง 120 กรัม จะวางไข่อยู่ในช่วงระหว่าง 1,250 ถึง 2,500 ฟองต่อน้ำหนักตัว 1 กรัม ประมาณ 10-12 ชั่วโมง (Ibarra *et al*., 2009; Wyban *et al*., 1987)

หลังจากการปฏิสนธิไข่ก็จะฟักออกเป็นตัวอ่อน เรียกว่า นอร์เพลียส (nauplius) ตัวอ่อนระยะนี้ จะมีการเจริญเติบโตและพัฒนาไปเรื่อยๆ ในขณะเดียวกันก็จะถูกกระแสน้ำพัดพาเข้าสู่ชายฝั่งทะเลซึ่งความเค็มของน้ำจะค่อยๆ ลดลงจาก 30-35 ppt ของน้ำทะเลลึกมาเป็น 15-25 ppt ของน้ำทะเลแถบชายฝั่งหรือแถบป่าชายเลน นอร์เพลียสใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวอ่อนระยะเรียกว่าโปรโตซูเอี้ย (protozoea) ตัวอ่อนระยะนี้จะใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ก็จะเปลี่ยนไปเป็นตัวอ่อนระยะไมซิส (mysis) จะใช้เวลาประมาณ 72 ชั่วโมง ในการเปลี่ยนไปเป็นระยะโพสท์ลาร์วา (postlarva) ระยะโพสท์ลาร์วานี้ที่พัฒนามาจากระยะไมซิสในวันแรกจะเรียกว่า โพสท์ลาร์วา 1 (postlarva1 หรือ PL1) ในวันที่ 2 ก็จะกลายเป็น PL2 แต่ละวันก็จะเปลี่ยนไปเป็น PL3, PL4 จนถึงวันที่ 12 เป็น PL12 (Andriantahina *et al*., 2012; Piña *et al*., 2005) การเปลี่ยนแปลงระยะต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ๆ เหล่านี้ดำเนินควบคู่ไปพร้อมๆ กับการลอกคราบเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะการว่ายน้ำ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงชนิดของอาหารในระยะนอร์เพลียสจะไม่กินอาหาร สำหรับในระยะซูเอี้ยและไมซิสจะเริ่มกินอาหารประเภทแพลงตอนพืชพอถึงระยะปลายของไมซิสหรือระยะต้นของโพสท์ลาร์วา ตัวอ่อนจะเริ่มกินแพลงตอนสัตว์ หลังจากระยะ PL15ไปแล้วก็จะเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (juvenile) ซึ่งจะกินเวลาประมาณ 3-4 เดือน ระยะนี้กุ้งจะอยู่ในบริเวณชายฝั่งหรือป่าชายเลนที่เป็นน้ำกร่อย และมีขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 35-40 กรัม ในระหว่างการเจริญเติบโตกุ้งจะค่อยๆ ว่ายน้ำออกไปในท้องทะเลลึกซึ่งความเค็มจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับน้ำทะเลปกติ กุ้งจะค่อยๆโตขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเวลาผ่านไป 5-6 เดือน จะเรียกว่าอยู่ในระยะตัวโตวัยโตเต็มวัย ก็เริ่มมีการสร้างสเปร์มและไข่ พร้อมที่จะวางไข่ได้ เรียกว่าระยะพร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้น้ำหนักตัวกุ้งในระยะนี้ หากเป็นตัวผู้จะประมาณ 38-43 กรัม หากเป็นตัวเมีย ประมาณ 45-50 กรัม (AQUACOP, 1983; Wyban *et al*., 1987; Yano, 1988; ประจวบ, 2530)

2. การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิดเพศเมีย

ในกุ้งกลุ่มพีนีอิด Tan-Fermin and Pudadera (1989) ได้จำแนกระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์อ้างอิงตามลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาภายใต้กล้อง stereomicroscope ได้ 4 ระยะ ดังนี้

ระยะพรีวิเทลโลจินิค โอโอไซต์ (previtellogenic oocyte) โอโอโกเนีย หรือไพรมารีโอโอไซต์ มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ประกอบด้วย นิวคลีโอไล (nucleoli) จำนวนมากอยู่รอบๆ เซลล์ไข่มีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 55 ไมโครอน เซลล์ไข่ยังไม่มีการสะสมไกลโคโปรตีนและสารประกอบไขมันใดๆ ไม่ปรากฏว่ามีฟอลลิเคิลเซลล์รอบเซลล์ไข่แต่ถ้าเซลล์ไข่มีขนาดใหญ่กว่า 55 ไมโครอน ฟอลลิเคิลเซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปลูกบาศก์ (cuboidal shape) ไข่และนิวเคลียสระยะนี้ย้อมติดสีน้ำเงิน (basophilic cytoplasm)

ระยะวิเทลโลจินิค โอโอไซต์ (vitellogenic oocyte) ลักษณะสำคัญของไข่ระยะนี้ คือ มีการสะสมของไข่แดง ทำให้เมื่อย้อมสีจะติดทั้งสีน้ำเงินและชมพู (basophilic and acidophilic staining) ของ eosin และ haematoxylin แท่งโครมาติน (chromatin) กระจายอยู่ทั่วนิวคลีโอพลาสมของนิว-เคลียส ฟอลลิเคิลเซลล์เปลี่ยนรูปร่างจากลูกบาศก์เป็นทรงกลม

ระยะคอร์ติคอลรอด (cortical rod stages) ลักษณะสำคัญระยะนี้ คือ ประกอบด้วยคอร์ติ-คอลรอด ซึ่งมีรูปร่างคล้ายกับทรงกระบอกในไซโตพลาสม ด้านนอกติดกับฟอลลิเคิลเซลล์เรียงตัวความยาวและขยายจนเกือบถึงนิวเคลียส ซึ่งเป็นขบวนการพัฒนาของไข่ไม่มีการสะสมไขมันใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คอร์ติคอลรอด แต่อาจจะมีการสะสมของไกลโคโปรตีน ฟอลลิเคิลเซลล์เริ่มหดตัดและแยกลักษณะไม่ออกจากเซลล์ไข่

ระยะอะทรีทิค โอโอไซต์ (atretic oocyte) คือไข่ที่ถูกปล่อยไปจากฟอลลิเคิลเซลล์แล้ว ฟองไข่มีลักษณะเป็นเม็ดกลม และเมื่อปล่อยออกมานอกตัวกุ้งเซลล์ไข่จะเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 270 -280 ไมโครเมตร จมไม่ติดวัตถุ

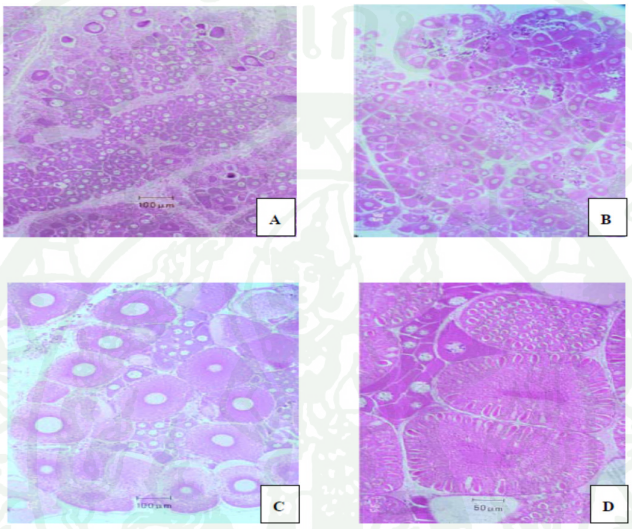
นอกจากนี้ Yano (1995) รายงานเพิ่มเติมว่า โดยทั่วไปแล้วในกุ้งพีนีอิคเพศเมียพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ยังสามารถจัดแบ่งออกได้ 2 ช่วง ดังนี้

ช่วงแรก เรียกว่า กระบวนการไวเทลโลเจเนซีส เริ่มจากการผลิตโปรตีนสารตั้งต้น (ไวเทลโลเจนิน) ของโปรตีนไข่แดงในเนื้อเยื่อที่เฉพาะเจาะจงแล้วผ่านการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลง เสร็จสมบรูณ์แล้วจึงลำเลียงผ่านน้ำเลือดเพื่อเปลี่ยนรูปกลายเป็นสารโปรตีนไวเทลลิน (Lee *et al*., 1997) ใช้เป็นแหล่งของสารอาหารในระหว่างการพัฒนาของเอมบริโอ (Jasmani *et al*., 2000) ซึ่งในกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกเป็นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ (primary vitellogenesis) เซลล์ไข่ (oocytes) จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กน้อย เนื่องจากยังไม่มีการสะสมโปรตีนไวเทลลิน (Quackenbush, 1991) ภายในรังไข่ ขั้นต่อมาเป็นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ(secondary vitellogenesis) เซลล์ไข่จะเริ่มเจริญกระทั่งสมบรูณ์เต็มที่ โดยมีขนาดเพิ่มจาก 50 เป็น 300 ไมโครเมตร (Quackenbush, 2001) รอบเซลล์ไข่เริ่มมีผนัง secondary follicle cell 1 ชั้น (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) และมีการสะสมโปรตีนไข่แดง (yolk protein) ภายในเซลล์ไข่ โปรตีนในไข่แดง ประกอบด้วย คาโรทีนอยด์ น้ำตาล และไขมัน ซึ่งจะกลายเป็นอาหารให้กับตัวอ่อน ขณะที่อยู่ในเซลล์ไข่ในระยะพัฒนาของเอมบริโอ โดยครัสเตเชียนจะพบโปรตีนในไข่แดง มากถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนรวมทั้งหมดในเซลล์ไข่ ในขณะที่สัตว์กลุ่มแมลงการสังเคราะห์โปรตีนในไข่แดงได้มาจากไขมันในร่างกายและรังไข่ ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ครัสเตเชียนบางชนิดสามารถสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ไข่แดงที่รังไข่ได้ แต่สำหรับกุ้งขาวแวนนาไม ตับและตับอ่อนจะเป็นแหล่งซึ่งทำหน้าที่สังเคราะห์ แล้วลำเลียงนำมาเก็บสะสมที่รังไข่ โดยลำเลียงผ่านท่อของรังไข่ที่เชื่อมกับตับและตับอ่อน (Quackenbush, 2001) โดยตรง

ช่วงที่สอง เรียกว่า กระบวนพัฒนาระบบสืบพันธุ์ขั้นสุดท้าย ในช่วงนี้ระยะแรกจะเกิดการตกไข่ (ovulation) เมื่อ secondary follicular epithelium บริเวณรังไข่หดตัวลง (Charniaux-Cotton

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

and Payen, 1988) ต่อมา Germinal vesicle breakdown (GVBD) เกิดขึ้นภายหลังจากที่เกิดการตกไข่แล้ว แต่โอโอไซต์จะยังคงอยู่ในระยะ meiosis หรือเกิดกระบวนการยับยั้ง meiotic metaphase และยังคงอยู่ใน cytoplasmic membrane ของเซลล์ไข่ในรังไข่ เพื่อรอการผสมพันธุ์ครั้งต่อไป (Yano, 1995)



ภาพที่ 2 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของไข่กุ้งกุลาดำซึ่งเป็นตัวแทนของกุ้งกลุ่มพีนีอิคเพศเมียระยะต่างๆ โดย A คือไข่ระยะที่ 1 หรือระยะท้องว่าง (underdeveloped or spent stage) B คือไข่ระยะที่ 2 หรือ พรีวิเทลโลจินิค โอโอไซต์ (previtellogenic oocytes) C คือ ไข่ระยะที่ 3 หรือ วิเทลโลจินิค โอโอไซต์ (vitellogenic oocytes) D คือ ไข่ระยะที่ 4 หรือคอร์ติคอลรอด (cortical rod stages)

ที่มา: Hall *et al*. (2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิดเพศผู้

กุ้งขาวแวนนาไมจัดเป็นกุ้งกลุ่มพีนีอิดอีกชนิดหนึ่ง มีเพศแยก ในกุ้งพีนีอิดเพศผู้จะมีท่อส่งน้ำเชื้อเปิดออกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 และบริเวณโคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 กุ้งมีอวัยวะเพศที่มีแผ่นเชื่อมติดกัน เรียกว่า พีแตสมา (petasma) จะมีลักษณะคล้ายตะข้อและกุ้งชนิดนี้จะพร้อมที่จะผสมพันธุ์เมื่ออายุ 6 เดือน ขึ้นไป

3.1. อวัยวะสืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิดเพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิดเพศผู้ (King, 1948; Motoh, 1981) ประกอบด้วย

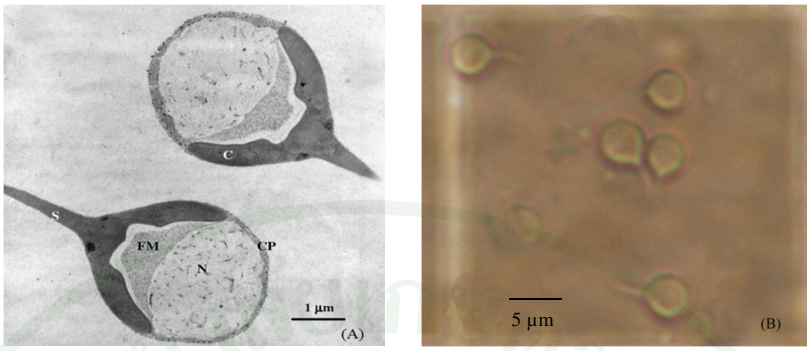
1. อัณฑะ(testes)ในกุ้งเพศผู้ อัณฑะจะมีลักษณะค่อนข้างใส ไม่มีสี ประกอบด้วย พูเล็กๆ 7 คู่ คู่แรกเป็นพูสั้นๆ ยื่นไปด้านหน้าของลำตัวและอีก 6 คู่ แผ่ออกด้านข้างของลำตัว ประกอบด้วย หลอดสร้างสเปิร์ม (seminiferous tubule)

2. ท่อนำสเปิร์ม (vas deferens) ในกุ้งพีนีอิดเพศผู้ อวัยวะส่วนนี้จะประกอบด้วย 4 ส่วน ดังนี้ ส่วนต้น (proximal vas deferens) ลักษณะท่อกลมและแคบ ส่วนที่ 2 (medial vas deferens) รูปร่างโค้งงอ มีผนังหนาขึ้น ส่วนที่ 3 (distal vas deferens) เป็นส่วนที่แคบมากและยาวเปิดออกส่วนที่ 4 และส่วนที่ 4 (muscular portion) ซึ่งต่อกับส่วนของถุงเก็บสเปิร์มและภายในท่อนำสเปิร์มจะพบดักต์ (duct) มีลักษณะเป็นท่อขนาดใหญ่ (primary lumen) จะพบกลุ่มสเปิร์มที่มีการพัฒนาแตกต่างกัน และท่อขนาดเล็กยาวเรียว สีขาวขุ่นภายในดักต์ไม่พบกลุ่มของสเปิร์มเชื่อมต่อกันถุงเก็บสเปิร์ม

3. ถุงเก็บสเปิร์ม (terminal ampule) ในส่วนนี้จะบรรจุไปด้วยถุงสเปิร์มมีจำนวนสเปิร์มมารวมกันเป็นกลุ่มอยู่กลางถุง ล้อมรอบด้วยสารหุ้มสเปิร์มสิ้นสุดบริเวณโคนขนเดินคู่ที่ 5 ภายในสเปิร์มที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ รูปร่างคล้ายลูกโป่งและเปิดออกไปปยังฐานของ coxopod ของขาเดินคู่ที่ 5

4. พีแตสมา (petasma) ติดอยู่กับขาว่ายน้ำคู่ที่ 1 ของกุ้งเพศผู้ มีลักษณะเป็นตะข้อเพื่อให้ผสมพันธุ์กับกุ้งเพศเมีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเป็นตัวแทนกุ้งกลุ่มพีนีอิคภายใต้กล้อง Electron micrographs โดย C = hemispherical cap, N= nucleus containing a network of chromatin threads, S = spike, FM = filamentous meshwork between the nucleus and the hemispherical cap, CP = cytoplasmic particles forming a hemispherical rim.

ที่มา: Dougherty and Dougherty (1989) (A), ผู้วิจัย (B)

3.2. โครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การสร้างสเปิร์มของกุ้งพีนีอิคเพศผู้จะมีตลอดทั้งปี โดยสเปิร์มของกุ้งกลุ่มนี้เคลื่อนที่ไม่ได้ (non-flagellate) โครงสร้าง ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนตัว (body หรือ head) รูปร่างกลมมีขนาดใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-5 ไมครอน ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วน acrosome ส่วนสุดท้าย spike คล้ายหนามแหลม อาจจะทำหน้าที่เจาะเซลล์ไข่และจะถูกสลัดทิ้งหลังจากสเปิร์มเข้าไปในเซลล์ไข่แล้ว สเปิร์มของกุ้งในกลุ่มพีนีอิคจะมีขนาด โดยประมาณ 5.56-6.68 ไมโครเมตร เคลื่อนไหวไม่ได้ (non-motile flagellum) เหมือนกับสเปิร์มของสัตว์ชนิดอื่นๆ สเปิร์มของกุ้งที่สมบูรณ์จะเก็บอยู่ในถุงเก็บสเปิร์ม อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ทั้ง 2 ข้าง ถุงเก็บสเปิร์มจะมีจำนวนสเปิร์มแตกต่างกันไปตามขนาดและอายุของกุ้ง โดยปกติในถุงเก็บสเปิร์มหนึ่งๆ จะมีจำนวนสเปิร์มโดยประมาณ 15.20-22.6 ล้านเซลล์ นอกจากนั้นถุงสเปิร์มในกุ้งตัวเดียวกันจะมีจำนวนของสเปิร์มในถุงทั้ง 2 ข้างนั้นใกล้เคียงกัน (Adiyodi, 1985; Heitzmann *et al*., 1993)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3. การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์

Castille and Lawrence (1989) ได้จัดจำแนกความสมบูรณ์เพศของอวัยวะสืบพันธุ์กุ้งพีนีอิคเพศผู้จากการสังเกตภายนอกร่างกาย สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังนี้ ระยะที่ 1 (immature stage) ถุงสเปิร์มไม่สามารถมองเห็นได้จากภายนอกร่างกาย ระยะที่ 2 (developing stage) ถุงสเปิร์มมอง เห็นได้เพียงบางส่วนจากภายนอกร่างกาย และระยะสุดท้าย (mature stage) ถุงสเปิร์มมองเห็นได้อย่างชัดเจนจากภายนอกร่างกาย และสามารถหลุดออกมาได้ง่ายเมื่อมีบางอย่างไปกระตุ้น เช่น การบีบเค้นออกมา เช่นเดียวกับ Leung-Trujillo and Lawrence (1991) ได้จำแนกพัฒนาการถุงสเปิร์มในถุงเก็บสเปิร์มในกุ้งพีนีอิค 3 ชนิด ได้แก่ กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนนาไมและกุ้งแชบ๊วย โดยแบ่งการพัฒนาของกุ้งเหล่านี้ ออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ ระยะที่ 1 ถุงสเปิร์มยังไม่พัฒนาพบมีลักษณะขุ่นเล็กน้อย น้ำเชื้อยังเป็นของเหลวเคลื่อนตัวออกจากถุงเก็บสเปิร์ม และไม่พบสเปิร์มในถุงเก็บสเปิร์ม ระยะที่ 2 ถุงสเปิร์มก่อนการพัฒนาพบมีของเหลวลักษณะข้นและหนืดมากกว่าระยะแรก แต่พบลักษณะของถุงสเปิร์มเล็ก บาง และแข็งกระจายอยู่ในของเหลวซึ่งสามารถมอง เห็นได้มีขนาดโดยประมาณ 1-3 มิลลิเมตร แต่ยังไม่พบสเปิร์ม ระยะที่ 3 ถุงสเปิร์มหลังการพัฒนาจะสามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนและพบสเปิร์มรวมกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่ พบส่วนที่เรียกว่า wing แต่ถุงสเปิร์มยังไม่แข็งและยังมีลักษณะบางเบาสีขาว ระยะสุดท้าย คือ ระยะสมบูรณ์เพศเป็นระยะที่การสร้างถุงสเปิร์มเสร็จสมบรูณ์ ถุงสเปิร์มมีลักษณะที่แข็งและมีสีเหลืองถึงสีทองอ่อนๆ พร้อมที่จะนำไปผสมกับกุ้งเพศเมีย

ในรายงานการศึกษาของ Heitzmann *et al*. (1993) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไม หลังจากปล่อยถุงสเปิร์มออกไป กุ้งจะใช้ระยะเวลาประมาณ 1-10 วัน ในการสร้างสเปิร์มขึ้นมาใหม่ โดยจะสร้างสเปิร์มระหว่างเดือนที่เกิดการลอกคราบ ลักษณะถุงสเปิร์มจากโปร่งแสงประมาณวันที่ 1-6 จากนั้นจะเริ่มเห็นว่ามีสีเกิดขึ้นประมาณวันที่ 6-12 หลัง ต่อมาจะเห็นเป็นสีขาวขุ่นชัดเจน ประมาณวันที่ 10-14 โดยปกติในถุงเก็บสเปิร์มหนึ่งๆ จะมีจำนวนประมาณ 15.5-22.6 ล้านเซลล์ สเปิร์มที่ผิดปกติ 52.80-74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กุ้งกุลาดำ บุญรัตน์ (2539) ได้แนะนำว่า กุ้งชนิดนี้สามารถสร้างถุงสเปิร์มขึ้นมาได้ใหม่ โดยมีความสัมพันธ์กับระยะการลอกคราบซึ่งถุงสเปิร์มมีสีขาวขุ่นและสามารถเห็นได้อย่างเด่นชัดโดยปรากฏให้เห็นภายในถุงเก็บสเปิร์มในระยะเวลา 2-3 วัน หลังจากลอกคราบ เช่นเดียวกับ Leung-Trujillo and Lawrence (1991)ได้รายงานไว้ว่า กุ้งพีนีอิคในกลุ่มนี้ถ้าไม่ตัดก้านตากุ้งจะใช้เวลาในการสร้างถุงสเปิร์ม เสร็จสิ้นระยะเวลาประมาณ 2-4, 4-6 และ5-7 วัน สำหรับกุ้งแชบ๊วย กุ้งขาวแวนนาไม และกุ้งฟ้า ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4. การเสื่อมคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิคเพศผู้

การเสื่อมคุณภาพสเปิร์มกุ้งพีนีอิคจะเกิดขึ้นในกุ้งที่เลี้ยงในที่กักขังมากกว่ากุ้งธรรมชาติโดยลักษณะที่เกิดขึ้น คือ สเปิร์มจะค่อยๆ ตายตามทางเดินของสเปิร์มและถุงสเปิร์มจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีดำเกิดขึ้น (Chamberlain *et al*., 1983) สอดคล้องในรายงานการศึกษาของ Leung-Trujillo and Lawrence (1987) พบว่า การเสื่อมคุณภาพสเปิร์มในกุ้งแชบ๊วยในบ่อเลี้ยงพบการเสื่อมถอยเกิดขึ้นใน 3 สัปดาห์แรกของการเลี้ยง โดยกุ้งจะมีจำนวนสเปิร์มทั้งหมดประมาณ 39.70 - 54.40 ล้านเซลล์ แยกออกเป็นสเปิร์มที่ผิดปกติ จำนวน 68 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 และ 7 ไม่พบมีสเปิร์มในถุงสเปิร์ม

สอดคล้องในรายงานการศึกษาของ Chamberlain *et al*. (1983) พบมากกว่า 70 เปอร์-เซ็นต์ในกุ้ง *Penaeus stylirostris* และ *Penaeus setiferus* ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงๆ หลายเดือนกุ้งจะมีการบวมน้ำของท่อนำสเปิร์มส่วนต้น (proximal) และส่วนกลาง (medial vas deferens) และ 58 เปอร์-เซ็นต์ ของกุ้งทั้ง 2 ชนิด ถุงสเปิร์มจะมีสีดำเข้ม (melanize) การเกิดสีดำนี้เกิดขึ้นได้บ่อยในกุ้งเพศผู้ที่ได้ปล่อยถุงเก็บสเปิร์มออกไปเพื่อผสมเทียม Wang *et al*. (1995) รายงานว่า สเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ที่มีลักษณะไม่สมบูรณ์นั้นจะมีลักษณะพิเศษ คือ สเปิร์มไม่มี spike และย้อมไม่ติดสีย้อม (Trypan blue) นอกจากนั้นยังพบอีกว่า และถ้าถุงสเปิร์มปรากฏสีขาวขุ่นชัดเจนจะเป็นถุงสเปิร์มที่สมบูรณ์ แต่ถ้ามีลักษณะคล้ำดำจะเป็นถุงสเปิร์มผิดปกติซึ่งเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย Male reproductive tract degenerative syndrome (MRTDS) ซึ่งสาเหตุหลักของโรคนี้ส่วนใหญ่เกิดจากที่อุณหภูมิของน้ำสูงต่อเนื่องกว่าปกติ

เช่นเดียวกับในรายงานการศึกษาของ Talbot *et al*. (1989) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสเปิร์มในกุ้งแชบ๊วยเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ นาน 1 35 53 76 และ 131 วัน พบว่า การเสื่อมสภาพของสเปิร์มจะเริ่มปรากฏตั้งแต่วันที่ 35 ของการทดลอง โดยถุงเก็บสเปิร์มจะเริ่มแข็งตัวและเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีน้ำตาล ภายในถุงมีสารหล่อเลี้ยงสเปิร์มเพียงเล็กน้อย และพบสเปิร์มที่ตายแล้วเป็นจำนวนมาก ถุงเก็บสเปิร์มมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย สเปิร์มมีขนาดเล็กลงจากสภาพปกติตลอดระยะเวลา 39-45 วัน ท่อนำสเปิร์มทั้ง 3 ส่วน ภายนอกยังคงเป็นปกติแต่เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า สเปิร์มในท่อนำสเปิร์มส่วนกลางเสื่อมและมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในเวลา 76-131 วัน อวัยวะสืบพันธุ์ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นสีเหลืองซึ่งความเสียหายของถุง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เก็บสเปิร์ม Brown *et al*. (1979) รายงานว่า สาเหตุเกิดจากการติดเชื้อ *Vibrio* sp. เป็นผลทำให้เกิดการเสื่อมของสเปิร์มเกิดขึ้น

4. ปัจจัยส่งเสริมพัฒนาการระบบสืบพันธุ์ในกุ้งพีนีอิด

พ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลหลายชนิดมีความต้องการหลากหลายปัจจัยที่จะเอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตอยู่รอดอยู่ได้กระทั่งขยายแพร่พันธุ์ ความต้องการดังกล่าวนี้อาจแตกต่างกันไปตามลักษณะเฉพาะตัวของกุ้งทะเลในแต่ละสายพันธุ์ ปัจจัยที่สำคัญต่อความสมบูรณ์เพศของกุ้งทะเล คือ สิ่งแวดล้อม และการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน รวมทั้งสภาวะทางโภชนาการของพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งปัจจัยทั้งหลายเหล่านี้มีส่วนสำคัญต่อพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ การผสมพันธ์ คุณภาพของไข่ และลูกกุ้ง (Millamena *et al*., 1993; Benzie, 1997)

4.1. ปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม

ปัจจัยแวดล้อมที่สำคัญซึ่งมีผลต่อการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งพีนีอิด ได้แก่ แสง ความเค็ม และอุณหภูมิของน้ำ รวมทั้งลักษณะของบ่อเลี้ยง

4.1.1. แสง

ในธรรมชาติกุ้งทะเลจะอาศัยอยู่ในทะเลลึก ทำให้ความเข้มของแสงที่ส่องผ่านลงไปในน้ำต่ำ กุ้งทะเลจึงได้รับแสงปริมาณน้อยส่งผลให้ระบบสืบพันธุ์ของกุ้งมีการพัฒนา ดังนั้นในการเลี้ยงกุ้งในบ่อทดลองจำเป็นที่จะต้องมีการควบคุมความเข้มแสงให้เหมาะสมโดย Primavera (1988) รายงานว่า กุ้งที่ได้รับแสงจากธรรมชาติที่ส่องผ่านหลังคา หรือแสงจากหลอดไฟที่สร้างขึ้นทำให้เกิดความสมบูรณ์เพศกุ้งในบ่อเลี้ยงได้ ระดับความเข้มของแสงควรอยู่ในระดับต่ำ ประมาณ 70 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ($\mu W/cm^2$) ทำให้กุ้งกุลาดำเกิดความสมบูรณ์เพศและเกิดการวางไข่ได้ทั้งในกุ้งที่ตัดก้านตาและไม่ตัดก้านตา นอกจากนั้นการคลุมบ่อเลี้ยงให้มืดจะช่วยลดความเข้มแสงในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ได้ประมาณ 200 ลักซ์ หรือน้อยกว่านี้ Primavera and Cabalero (1992) ศึกษาผลจากแสงธรรมชาติและแสงสีต่างๆ ที่มีผลต่อการพัฒนาไข่ของกุ้งกุลาดำ พบว่า ระดับความเข้มของแสงและระยะเวลาที่ได้รับแสง สามารถกระตุ้นให้แม่กุ้งมีไข่แก่ ในขณะที่สีของแสงไม่มีผล สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในกุ้งแชบ๊วย (Caillouet, 1972) ซึ่งพบว่า บ่อเลี้ยงที่ใช้แสงสีน้ำเงิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เขียว และขาวแสงเหล่านี้ไม่สามารถกระตุ้นให้กุ้งเกิดการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ได้ แต่ในกุ้งกุลาดำบางส่วนซึ่งเลี้ยงในบ่อที่มีแสงสีน้ำเงินและแสงธรรมชาติ พบว่า กุ้งสามารถพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ได้ (Pudadera and Primavera, 1981)

4.1.2. ความเค็มของน้ำ

ความเค็มของน้ำทะเลมีส่วนสำคัญในการดำรงชีพของกุ้ง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกาย โดยความเค็มจะประกอบด้วยอนุภาคเล็กๆ ของเกลือหลายชนิด เกลือแร่ที่มีมาก คือ โปแตสเซียม โซเดียม แมกนีเซียม แคลเซียม และคลอไรด์ ซึ่งเกลือแรต่างๆ เหล่านี้ จะเป็นตัวที่กุ้งนำเข้าไปในร่างกายและใช้เป็นโครงสร้างของร่างกายภายนอก แต่น้ำกร่อยและน้ำจืดซึ่งมีความเค็มต่ำกว่าน้ำทะเลจะมีความเข้มข้นของแร่ต่างๆ เหล่านี้ลดลง โดยปกติกุ้งทะเลในกลุ่มพีนีอิคซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่ม euryhaline จะมีการปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกายตามความเค็มของน้ำทะเลได้ในช่วงกว้าง ซึ่งสาเหตุที่ไม่ค่อยพบกุ้งทะเลในกลุ่มพีนีอิคตัวเต็มวัยหรือกุ้งที่สมบูรณ์เพศในบริเวณน้ำกร่อยแถวชายฝั่ง เพราะกุ้งตัวเต็มวัยปรับสภาพความเข้มข้นของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกายได้น้อยกว่ากุ้งวัยรุ่น แต่การที่กุ้งเคลื่อนออกสู่ทะเลลึกเมื่อเริ่มถึงวัยเจริญพันธุ์นั้นยังมีเหตุผลอื่น นอกเหนือไปจากปัญหาในเรื่องการปรับสมดุลเช่นเพื่อการพัฒนาการของไข่ เพื่อการวางไข่และเพื่อการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกเพราะในทะเลลึกที่มีความเค็มสูงจะส่งผลในด้านนี้มากกว่าที่ระดับความเค็มต่ำ (Vargas-Albores *et al*., 1993) ในรายงานการศึกษาโดย สิทธิโชค (2545) ศึกษาผลของความเค็มต่างระดับและเกลือแร่บางชนิดต่อการพัฒนารังไข่และการว่างไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่า ในแม่กุ้งทดลองที่เลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 10 และ20 ppt ในน้ำเลือดของกุ้งทดลองมีความเข็มข้นของเกลือแร่สูงกว่าในน้ำเลี้ยง ขณะที่แม่พันธุ์กุ้งทด ลองซึ่งเลี้ยงในน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt กุ้งทดลองมีความเข้มข้นของเกลือแร่ในน้ำเลือดใกล้เคียงกับน้ำทะเลที่ใช้ทดลองเลี้ยง ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าระดับความเค็มของน้ำทะเลที่เหมาะสมในการช่วยส่งเสริมพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์กุ้งเพศเมียกระทั่งว่างไข่และฟักออกเป็นตัวได้ คือ ระดับความเค็มที่ในช่วงระหว่าง 28-32 ppt

4.1.3. อุณหภูมิของน้ำ

โดยธรรมชาติของสัตว์น้ำจะสามารถปรับลักษณะการกินอาหารได้ตามการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำที่อาศัยอยู่ กล่าวคือ ถ้าอุณหภูมิต่ำหรืออากาศหนาวสัตว์น้ำจะกิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารลดลง ในทางตรงข้ามถ้าอุณหภูมิน้ำเริ่มสูงขึ้น หรืออากาศร้อนขึ้นสัตว์น้ำจะเริ่มกินอาหารได้เพิ่มมากขึ้น โดยความสมดุลของสารอาหารมีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย โดยเฉพาะพลังงานและโปรตีนถ้าขาดหรือเกิน ก็จะส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย ส่งผลให้การผลิตลดต่ำลงซึ่งเป็นผลโดยตรงกับระบบสืบพันธุ์ Crocos and Kerr (1986) ได้ศึกษาปัจจัยภายนอกต่อการวางไข่ของกุ้งกุลาลาย พบว่า การเลี้ยงแม่พันธ์กุ้งในน้ำอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส กุ้งไม่มีพัฒนาการของรังไข่ แต่จะพัฒนาได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับ Pascual *et al*. (1998) รายงานว่า ที่อุณหภูมิน้ำทะเลระหว่าง 26 ถึง 27 องศาเซลเซียส จะช่วยลดความผิดปกติของจำนวนสเปิร์มในระบบสืบพันธุ์ของกุ้งทดลองได้ในช่วงระยะเวลา 30 วัน และจำนวนสเปิร์มจะเริ่มผิดปกติมากขึ้นเมื่อระดับอุณหภูมิสูงขึ้นมากกว่า 30 องศาเซลเซียส การศึกษาของ Perez-Velazques (2001) ในกุ้งขาวแวนนาไม ขนาด 48 กรัม พบว่าการเลี้ยงกุ้งในน้ำที่มีอุณหภูมีสูง เป็นระยะเวลา 42 วัน จะพบความผิดปกติของสเปิร์มสูงโดยที่อุณ-หภูมิ 26 องศาเซลเซียส มีสเปิร์มมีทั้งหมด 18.6 ล้านเซลล์ สเปิร์มมีความผิดปกติ 36.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส พบว่า สเปิร์มมีความผิดปกติ ถึง 99.7 เปอร์เซ็นต์ และที่ 32 องศาเซลเซียสไม่พบสเปิร์มที่มีลักษณะปกติกอยู่เลย เช่นเดียวกับในรายงานของ Bray *et al*. (1989) ได้ศึกษาคุณภาพของสเปิร์มในที่กักขัง พบว่า ระยะเวลา 30 วัน สเปิร์มที่นับได้นั้นต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญในชุดการทดลองที่เป็นอุณหภูมิ

4.1.4. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งควรอยู่ระหว่าง 7.8-8.3 ในน้ำทะเลที่มีปริมาณ organic carbon น้อยกว่า 10-12 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้กุ้งจะโตช้าลงและมีอัตราการตายสูงถ้าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำต่ำกว่า 6.4 และถ้าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำต่ำกว่า 5.0 อัตราการตายของกุ้งจะสูงยิ่งขึ้น

4.1.5. ออกซิเจน

ออกซิเจนในบ่อจะขึ้นกับอุณหภูมิ อินทรียสาร และแพลงก์ตอนพืชในบ่อ ซึ่งการรักษาปริมาณออกซิเจนในบ่อให้เพียงพอสำหรับกุ้งเป็นสิ่งจำเป็น ตามปกติแล้วน้ำในบ่อที่เลี้ยงกุ้งไม่ควรจะมีออกซิเจนต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งจะส่งผลให้กุ้งไม่กินอาหารและเติบโตไม่ดีเท่าที่ควร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.6. แอมโมเนีย

แอมโนเนียในบ่อนั้นมีอยู่ในรูปทั้งแอมโมเนีย (NH_3) และแอมโมเนียมไอออน (NH^+_4) โดยปกติและแอมโมเนียไอออนนั้นไม่เป็นพิษต่อกุ้งเพราะไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ โดยแอมโมเนียในน้ำจะมีปริมาณหรือน้อยขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่าง ถ้าความเป็นกรดเป็นต่างของน้ำสูงขึ้น แอมโมเนียจะมีประมาณเพิ่มมากขึ้น เช่น ปริมาณแอมโมเนียในน้ำจะเพิ่มขึ้นเป็น10 เท่า ถ้าความเป็นกรดเป็นด่างเพิ่มขึ้นจาก 7 เป็น 8 โดยแอมโมเนียที่กุ้งขับออกจะมีปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับขนาดของกุ้ง โดยกุ้งขนาดเล็กจะขับแอมโมเนียออกในปริมาณที่สูงกว่ากุ้งขนาดใหญ่ ปริมาณของแองโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร (Liu and Chen, 2001; 2004)

4.2. ปัจจัยด้านโภชนาการ

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์กุ้ง นอกเหนือจากระบบฮอร์โมนและสภาวะแวดล้อมอื่นๆ ที่กล่าวมาข้างต้นโดยส่งผลถึงการเจริญของระบบสืบพันธุ์ การผสมพันธุ์ คุณภาพของไข่และคุณภาพลูกกุ้ง รวมทั้งมีความสำคัญต่อกุ้งเพศผู้ในวัยเจริญพันธุ์ ทำให้มีคุณภาพของน้ำเชื้อที่แน่นอน ส่วนด้านความต้องการทางโภชนาการของพ่อพันธุ์กุ้ง พบว่า ยังไม่มีงานวิจัยใดได้ศึกษาวิธีการสร้างอาหารทดลองเพื่อเลี้ยงกุ้งทะเลให้มีความสมบูรณเพศได้เร็วขึ้นและมีคุณภาพของระบบสืบพันธุ์ที่ดี เหมือนกับการศึกษาในอาหารของกุ้งทะเลเพศเมียเพื่อเร่งให้ไข่แก่ สุกเร็ว และทำให้ปริมาณไข่มายิ่งขึ้น (Adiyodi, 1985; Harrison, 1990)

4.2.1. โปรตีน

ความต้องการโปรตีน พบว่า กุ้งกลุ่มพีนีอิคจะมีความต้องการโปรตีนจะสูงขึ้นเมื่อกุ้งมีความสมบูรณ์เพศ หรือมีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ โดยอาหารทดลองส่วนมากจะมีระดับโปรตีนประมาณ 50% ซึ่งน้อยกว่าระดับโปรตีนที่พบในอาหารธรรมชาติ ในสภาพที่ไม่มีอาหารธรรมชาติควรเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารที่มีโปรตีน 40-50 % สำหรับกุ้งวัยอ่อน 45-50% สำหรับกุ้งวัยรุ่นถึงตัวเต็มวัย และ 50-53% สำหรับพ่อแม่กุ้ง (Wouters *et al*., 2001; Ceballos-Vazquez *et al*., 2003; Coman *et al*., 2007) ในรายงานการศึกษาในกุ้งก้ามกรามเพศผู้ Johnsamuel *et al*. (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายงานว่า พัฒนาการของระบบสืบพันธุ์สัณฐานวิทยาของถุงน้ำเชื้อ และสีของถุงน้ำเชื้อมีคุณภาพเมื่อให้อาหารประเภท หอยแครง หมึกกล้วย และอาหารเม็ดสำเร็จรูป สอดคล้องกับ Palacios *et al*. (1999) รายงานว่า ความแตกต่างของระดับโปรตีนในตับและตับอ่อนและรังไข่ระหว่างกุ้งขาวแวนนาไมตัวเมียในธรรมชาติ ที่มีความสมบูรณ์เพศดีเปรียบเทียบกับกุ้งที่มีความสมบูรณ์เพศปานกลาง โดยโปรตีนที่ประกอบในตับและตับอ่อนและรังไข่ของแม่กุ้งที่สมบูรณ์เพศดีจะมีปริมาณสูงมากกว่า และแม่กุ้งจะไม่วางไข่เมื่อมีระดับโปรตีนในเนื้อเยื่อต่ำ

4.2.2. คาร์โบไฮเดรต

ความต้องการคาร์โบไฮเดรต Deshimaru and Yone (1978) รายงานว่า สารอาหารคาร์โบไฮเดรตไม่มีความสำคัญต่อพ่อแม่พันธุ์กุ้ง แม้ว่าจะเป็นแหล่งพลังงานโดยส่วนมากจะใช้แป้งในการทำอาหาร คาร์โบไฮเดรตเป็นสารเหนียวที่ดีที่สุดในการสร้างอาหาร

4.2.3. วิตามินและแร่ธาตุ

วิตามินมีหน้าที่สังเคราะห์กระบวนการเผาผลาญสารอาหารในร่างกาย และยังมีบทบาทในการดูซึมสารอาหาร การขาดวิตามินกระบวนการต่างๆ ทีมีผลต่อการสร้างพลังงานการเจริญเติบโต ระบบสืบพันธุ์หรือระบบภูมิคุ้มกันก็อาจทำงานได้ไม่สมบูรณ์ โดย He *et al*. (1992) รายงานว่า วิตามินที่ละลายในไขมันได้ A D และ E มีส่วนช่วยในการเติบโตของกุ้งสอด คล้องกับการศึกษาในกุ้งแชบ๊วย Chamberlain (1988) พบว่า วิตามิน E มีส่วนช่วยส่งเสริมให้จำนวนสเปิร์มปกติและอัตราการสมบูรณ์เพศสูงขึ้น

4.2.4. กรดไขมัน

ความต้องการกรดไขมันชนิดจำเป็นสำหรับใช้ในการสร้างฟอสโฟลิปิดในเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำหน้าที่ให้ความยืดหยุ่น และการควบคุมการซึมผ่านของสารอาหารประเภทไขมัน ฟอสโฟลิปิดจากกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูงมีความยืดหยุ่นและควบคุมการซึมผ่านดีกว่าฟอสโฟลิแดจากกรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวต่ำ ยิ่งกรณีของสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิต่ำ กรดไขมันที่มีความไม่อิ่มตัวสูงยิ่งมีความจำเป็นมากขึ้น(Stickney and Andrews, 1971) สัตว์น้ำเค็มรวมทั้งปลาหลายชนิดและกุ้งลายเสือไม่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนคาร์-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บอนอะตอมและจำนวนพันธะคู่ในโมเลกุลของโอเมกา-3ให้เป็น EPA (eicosapentaenoic acid) หรือ DHA (docoashexaenoic acid) (Kanasawa *et al*, 1979) จึงต้องการ EPA หรือ DHA หรือทั้ง EPA และ DHA เนื่องจาก EPA และ DHA มีความไม่อิ่มตัวสูงกว่าโอเมการ-3 สัตว์น้ำจึงใช้ประโยชน์ได้มากกว่าและต้องการในอาหารน้อยกว่า โดยทั่วไปต้องการน้อยกว่าโอเมการ-3 ประ-มาณ 1 เท่า ในรายงานการศึกษาของ Brown *et al*. (1979) พบว่า กุ้งขาวแวนนาไมในบ่อทอลองที่ได้รับอาหารที่มีคุณค่าครบถ้วนเข้าไปจะนำไปพัฒนาระบบสืบพันธุ์ให้สมบูรณ์และลดการเสื่อมถอยของคุณภาพของสเปิร์ม สอดคล้องกับให้อาหารสดที่มีโปรตีนสูงกับพ่อแม่พันธุ์กุ้ง เช่น หอยแมลงภู่ หมึก และหอยกะพง โดยส่งเสริมในเรื่องการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ได้เป็นอย่างดีและพบว่า หอยกะพงเหมาะ-สมที่สุด เนื่องจากว่าหอยกะพงสามารถให้ได้ทั้งเปลือกและให้ได้ในสภาพเป็นๆ พ่อแม่พันธุ์กุ้งจะสามารถกัดแทะได้ตลอดเวลาตามต้องการ และเปลือกในถังเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ยังช่วยรักษาและควบคุมสภาพความเป็นกลางของน้ำให้มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ในระหว่าง 7-8 ส่วน หอยที่ยังไม่ถูกกินมีประโยชน์ในเรื่องของการกรองน้ำและขจัดแบคทีเรีย และตะไคร่น้ำ ซึ่งจะทำให้คุณภาพน้ำดีอยู่เสมอ

4.3. ปัจจัยด้านฮอร์โมน

พัฒนาการระบบสืบพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่มพีนีอิคมีฮอร์โมนควบคุมหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเปปไทด์ ฮอร์โมน กลุ่มสเตอรอยด์ฮอร์โมน ตลอดจนฮอร์โมนในกลุ่มไขมันซึ่งฮอร์โมนแต่ละกลุ่มจะมีหน้าที่แตกต่างกันในขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ตั้งแต่เริ่มการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ การสร้างและสะสมไข่แดง การเจริญของไข่ขั้นสุดท้าย การตกไข่ และการวางไข่ ซึ่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (Fingerman, 1987) ประกอบด้วย

4.3.1. กลุ่มเปปไทด์ ฮอร์โมน

เปปไทด์ ฮอร์โมน Vitellogenesis inhibiting hormone หรือ Gonad inhibiting hormone (VIH or GIH) จัดเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนในกลุ่ม Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) ประกอบด้วย Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) Molt Inhibiting Hormone (MIH) และ Mandibular Organ Inhibiting Hormone (MOIH) ฮอร์โมนในกลุ่มนี้สร้างและหลั่งจาก X-organ /sinus gland complex ในก้านตากุ้ง เปปไทด์ฮอร์โมนในกลุ่ม CHH family มีโครงสร้างคล้ายกันที่ระดับหนึ่ง คือ กรดอะมิโน cysteine ตำแหน่งที่ 6 ซึ่ง CHH family ประกอบ ด้วย 72 ถึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

78 กรด อะมิโน (amino acid residues) และมีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular Weight: MW) โดยประมาณ 7000 ถึง 9500 Dalton เมื่อทำการวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลของ VIH จากสารสกัดก้านตาของครัสตาเซียนเพศเมีย พบว่า ประกอบด้วย 20-31 กรดอะมิโน นอกจากนี้ยังพบได้ทั้งสองเพศ และไม่จำกัดชนิด VIH มีคุณสมบัติทนความร้อน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 5000 ดอลตัน (Wongsawang *et al*., 2005; Yano *et al*., 1988) Okumura and Aida (2000) รายงานว่า VIH ที่ตรวจพบในก้านตาของกุ้งก้าม กรามจะออกฤทธิ์ยับยั้งการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ เช่นเดียวกับในรายงานการศึกษาในกุ้งกุลา ลาย Khayat (1998) พบว่า CHH ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ รวมทั้งควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ควบคุมกระบวนการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต และไขมันในของครัสตาเซียนสอด คล้องกับการศึกษาของ Chamberlian and Lawrence (1981) พบว่า การตัดก้านตาในกุ้งขาวแวนนาไมผลที่เกิดขึ้นทำให้ขนาดของอวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นและมีการจับคู่ผสมพันธุ์บ่อยขึ้น

4.3.2. กลุ่มสเตอรอยด์ ฮอร์โมน

สเตอรอยด์ ฮอร์โมน (vertebrate-type steroids hormones) สามารถพบได้ในสิ่ง มีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย (bacteria) เห็ดรา (fungi) ครัสตาเซียน สัตว์กลุ่มแมลง หอยฝาเดียว (gastropods) และหอยสองฝา (bivalves) (Bose *et al*.,1997) โดยแหล่งหลักที่สามารถตรวจพบสเตอรอยด์ ได้แก่ น้ำเลือด เนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ท่อขับถ่าย และรังไข่ เป็นต้น ซึ่งสเตอรอยด์ที่ตรวจพบสามารถจำแนกออก เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีองค์ประกอบของโครงสร้างเป็น C_{18} เช่น testosterone androsterone และกลุ่มที่มีองค์ประกอบโครงสร้างเป็น C_{21} เช่น estradiol corticosteroids และ progesterone (P_4) (Darvas *et al*., 1997; LaFont, 1991)

การสังเคราะห์สเตอรอยด์ ฮอร์โมน มีสารตั้งต้นทั้งคอเลสเตอรอล หรือ สเตอรอลตัวอื่นๆ สัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีสเตอรอยด์ที่แตกต่างกันหลายกลุ่มแต่สเตอรอยด์ ที่ตรวจพบปริมาณมาก คือ เอคไดสเตียรอยด์ ฮอร์โมน (ecdysteroids) พบได้มากในกลุ่มแมลงรองลง มาเป็น สเตอรอยด์ (vertebrate-type steroids) พบได้ในกลุ่มครัสตาเซียน โดยสเตอรอยด์ ฮอร์โมน ทั้งที่พบในกลุ่มแมลงและสัตว์กลุ่มครัสตาเซียน เช่น androgens estrogens progestins glucoand mineralocorticoids และอนุพันธ์ของ vitamin D แหล่งที่สังเคราะห์สเตอรอยด์ ฮอร์โมน ทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ เนื้อเยื่อตับและตับอ่อน รังไข่ และเม็ดน้ำเลือด รายงานการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเครย์ฟิช พบ P_4 ตัวรับหรือจับ (P_4 receptors) และแอสตราไดออลตัวรับหรือจับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(estradiol receptors) ในรังไข่และตับและตับอ่อน ผลการวิจัยยังชี้ให้เห็นอีกว่า ฮอร์โมน 2 ตัวนี้ มีหน้าที่ต่างกันในขบวน การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียนที่มีเพศต่างกัน การสังเคราะห์สเตอรอยด์ ฮอร์โมน ก็มีความแตกต่างกัน เช่น เทสโทสเตอร์มักจะพบในเพศผู้มากกว่าเพศเมีย (Paolucci *et al*., 2002)

หน้าที่ของสเตอรอยด์ ฮอร์โมน Watanbe *et al*. (2006) รายงานว่า ทั้งในสัตว์และพืช สเตอรอยด์ ฮอร์โมน มีหน้าที่หลักในการควบคุมการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์และการรักษาสภาพสม ดุลของร่างกาย (homeostasis) อย่างไรก็ตาม ไม่ใช่สเตอรยด์ทุกตัวจะเป็นฮอร์โมน เหนือทำหน้าที่เป็น paracrine factors สเตอรอยด์ฮอร์โมนบางตัว (เช่น bile acids และbile alcohols) ยังมีหน้าที่เกี่ยว ข้องกับการช่วยย่อยไขมัน (Schroepfer, 2000) นอกจากนั้น Hsu *et al*. (2006) รายงานว่า สเตอรอยด์ ฮอร์โมน มีหน้าที่เป็น non-hormonal functions ระหว่าง embryonic development ซึ่งจะเห็นได้ว่าการจะจัดสเตอรอยด์เป็นฮอร์โมนหรือไม่ต้องขึ้นกับว่าสเตอรอยด์นั้นว่ามี specific receptor (nuclear or membrane-bound) ที่อวัยวะเป้าหมายหรือไม่และมีการเปลี่ยน แปลงระดับสเตอรอยด์ไปตามสภาวะสรีรวิทยาของสัตว์

การศึกษาของ Fairs *et al*. (1990) รายงานว่า พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งกลุ่มพีนีอิคถูกควบคุมโดยสเตอรอยด์ ฮอร์โมนคล้ายกับปลาและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สเตอรอยด์ฮอร์โมน ที่ควบคุมเหล่านี้เป็นสารชีวภาพที่ออกฤทธิ์ในเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งกุลาดำทุกระยะ ในระหว่างที่เกิดกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สอดคล้องกับในรายงานการศึกษาของ Tsukimura and Kamemoto (1991) พบว่า 17 แอลฟา-ไฮดรอกซิลโปรเจสเตอโรน(17α-OHP_4) เมทธิล ฟาร์นีโซเอท (MF) และ juvenile hormone III ช่วยเพิ่มขนาดของไข่กุ้งขาวแวนนาไมในห้องปฏิบัติการ เช่นเดียวกับ Yano (1985) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมน P_4 ให้แก่กุ้งตะกาด พบว่า ฮอร์โมน P_4 สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ได้ ซึ่งรายงานการศึกษาในกุ้งคุรุม่าที่ได้รับฮอร์โมน 17α-OHP_4 พบว่า ฮอร์โมนชนิดนี้ออกฤทธิ์กระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่งสารโปรตีนไข่แดง

ในรายงานการศึกษาของ Meunpol *et al*. (2007) พบว่า ฮอร์โมนที่สามารถกระตุ้นพัฒนา การของไข่ตั้งแต่ระยะการสร้างและสะสมไข่แดง จนถึงการตกไข่ระยะสุดท้ายของแม่กุ้งในห้อง ปฏิบัติการ เช่น P_4 17α-OHP_4 และ PGE_2 (Meunpol *et al.,* 2005) และเมื่อให้อาหารเม็ดที่มีส่วน ผสมของแคปซูลฮอร์โมน P_4 แก่แม่กุ้งขาวแวนนาไมก่อนการตัดตา พบว่า แม่กุ้งทดลองมีค่าประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่ดีกว่าแม่กุ้งกลุ่มควบคุมที่รับอาหารสดเพียงอย่างเดียวและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระหว่างการทดลองเบื้องต้น พบว่า หลังการให้อาหารเม็ดผสมแคปซูลฮอร์โมนเป็นเวลา 1 เดือน แม่กุ้งจำนวนหนึ่งสามารถพัฒนาจนวางไข่ได้โดยไม่ต้องตัดตา ทำให้เห็นความเป็นไปได้ที่จะสามารถเลี้ยงแม่กุ้งด้วยอาหารผสมแคปซูลฮอร์โมนในสูตรดังกล่าว เพื่อให้ไข่และรังไข่ของแม่กุ้งมีการพัฒนาโดยไม่ต้องตัดตา

4.3.3. กลุ่ม Lipid derivatives Lipid derivatives

เป็นกลุ่มฮอร์โมนซึ่งสังเคราะห์มาจากกรดไขมัน เช่น ฮอร์โมนในกลุ่ม เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากการรวมตัวของหมู่ไอโซพรีน (อะตอมคาร์บอน 5 อะตอมต่อกัน) หลายหน่วย ฮอร์โมนกลุ่มนี้พบในระบบต่างๆที่เกี่ยวข้องทางด้านสรีระวิทยาของสัตว์โดยเฉพาะแมลงฮอร์โมนที่สำคัญในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ คือ ฮอร์โมน เมทธิลฟาร์นีโซเอท (methyl farnesoate; MF) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเซสควิเทอร์พีนอยด์ (sesquiterpenoid) โครงสร้างจะประกอบด้วย คาร์บอน 15 อะตอม ที่เกิดจากการรวมตัวของ isoprene 3 หน่วย โดยมีหมู่เมทธิลเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งสุดท้าย (Charmantier *et al*., 1997) MF มีโครงสร้างทางเคมีคล้าย juvenile hormone lll (Laufer *et al*., 1987) ในครัสตาเชียน MF สังเคราะห์และหลั่งจากแมนดิบูลาร์ออร์แกน (mandibular organ) โดยออกฤทธิ์เป็นเสมือน gonadotropin และ morphogen มีหน้าที่กระตุ้นระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Laufer *et al*., 1988, Rotllant *et al*., 2000)

นอกจากนี้ Charmantier *et al*. (1997) รายงานว่า MF เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน ฮอร์โมนชนิดนี้สังเคราะห์จากแมนดิบูลาร์ออร์-แกนของครัสตาเชียน นอกจากนั้นฮอร์โมน MF ยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของจูวีไนล์ ฮอร์โมน เป็นฮอร์โมนที่พบได้ทั่วไปในน้ำเลือดของแมลง สอดคล้องในรายงานการศึกษาของ Laufer *et al*. (1987) พบว่า MF ที่ตรวจพบในครัสตาเชียนจะมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ juvenile hormone lll bในแมลง ในแมลง ฮอร์โมน MF จะสังเคราะห์มาจาก corpora allate และจะถูกเปลี่ยนให้เป็น juvenile hormone โดยอาศัยเอ็นไซม์ epoxydase ซึ่ง juvenile hormone ทำหน้าที่เช่นเดียว กับฮอร์โมน MF ในครัสเตเชียนมีหน้าที่เกี่ยว กับการควบคุมกระบวนการเผาผลาญของโปรตีน การควบคุมสมดุลของสารภายในร่างกายควบคุมระบบสืบพันธุ์และการลอกคราบ จากผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่า MF มีผลต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกราม (Sagi *et al*., 1991) และกุ้งขาวแวนนาไม (Tsukimura and Kamemoto, 1991)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

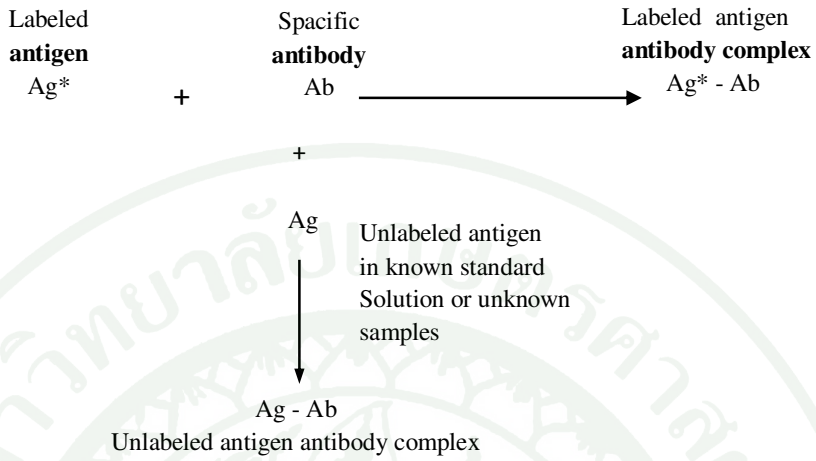
5. เรดิโออิมมูโน แอสเสย์ (Radioimmunoassay: RIA)

วิธีการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ โดยใช้สารกัมมันตรังสี (isotope) นักวิทยาศาสตร์ได้เริ่มให้ความสนใจ ตั้งแต่ ปี ค.ศ.1943 โดย อาศัยแนวคิดของ Hevesy ซึ่งต่อมาได้พัฒนาต่อเนื่องมาเป็นลำดับ กระทั่งปี ค.ศ. 1960 Rosalyn Sussman Yalow และ Solomon Aaron Berson ได้คิดวิธีวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน อินซูลินในร่างกายของมนุษย์ได้สำเร็จ เรียกว่า RIA ซึ่งเป็นวิธีการที่มีความไว (sensitivity) ความถูกต้อง (accuracy) ความจำเพาะ (specificity) และความแม่นยำสูงกว่าวิธีวิเคราะห์เคมีอื่นๆ ทำให้ Yalow และ Berson ได้รับรางวัลโนเบลในสาขาการแพทย์ในปี ค.ศ. 1977 นอกจากนั้นวิธี RIA จะสามารถวิเคราะห์หาปริมาณอินซูลินฮอร์โมนในร่างกายแล้ว ปัจจุบันวิธีนี้ยังสามารถวัดปริมาณความเข้มข้นฮอร์โมนได้ปริมาณที่ต่ำ โดยสามารถวัดได้ระดับพิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (10^{-12}) (pg/ml) (Werner *et al*., 1974; Berson and Yalow, 1971)

5.1 หลักการของ RIA

RIA จัดอยู่ในวิธีการตรวจทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ที่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ ได้นำมาตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน วิตามิน ระดับความเข้มข้นของยา สารที่ผลิตจากเซลล์มะเร็ง (Thompson *et al*., 1980; Rubery *et al*., 1982) ด้านการศึกษาวิจัยและพัฒนาได้ศึกษาเกี่ยวกับปริมาณของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น P_4 17α-OHP_4 และ PGE_2 ในครัสตาเชียน (Meunpol *et al.,* 2005, 2010; Tahara and Yano, 2003) หลักการขั้นพื้นฐานเกี่ยวกับการวิเคราะห์ด้วยวิธี RIA คือ การวิเคราะห์แบบ saturation analysis ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์โดยกำหนดให้มีการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร 2 ชนิดจนถึงจุดสมดุล โดยมีสารชนิดใดชนิดหนึ่งถูกใช้ไปจนหมดก่อน กล่าวคือ นำแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณ (Ag) กับแอนติเจนชนิดเดียวกัน (Ag*) แต่ปิดฉลาก (labelled antigen) ด้วยสารกัมมันตรังสี (isotope) ซึ่งทราบปริมาณแล้ว จากนั้นแอนติเจนทั้งสองแบบ (Ag และ Ag*) จะทำการแย่งจับกับแอนติบอดีซึ่งมีปริมาณคงที่และมีความจำเพาะกับแอนติเจนทั้งสองแบบในการหาปริมาณของแอนติเจนในเลือดทำได้โดยการแย่งจับในสภาวะที่สารตัวอย่างกับสภาวะการแย่งจับกับสารละลายมาตราฐาน สามารถสรุปหลักการของ RIA (Berson and Yalow, 1971) ได้ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 หลักการของวิธีเรดิโออิมมูโน แอสเสย์

ที่มา: Berson and Yalow (1971)

5.2 ชนิดของ RIA

การวิเคราะห์ฮอร์โมนในสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยสารกัมมันตรังสี สามารถแบ่งออกได้ 2 ประเภท ตามลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวัด (ligand) กับตัวยึดเกาะ(binder) (Ashkar and Colombetti, 1983; Collins, 1985; Faires and Boswell, 1981) ดังนี้

5.2.1 Competitive binding radioassay

การวิเคราะห์ผลในประเภทนี้และเป็นที่รู้จักนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ วิธี RIA และวิธี Competitive Protein Binding Assay (CPBA) หลักการของวิธีวิเคราะห์นี้ใช้การทำปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน (Ag) และแอนติบอดี (Ab) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่มีการจับตัวกันอย่างแน่นหนา เพราะใช้ความพอดีของรูปร่างโมเลกุลจับกันแบบ key-lock ด้วย co-valent bond วิธี RIA ประกอบ 7 ส่วนสำคัญ ดังต่อไปนี้

1. แอนติเจนบริสุทธิ์ คือ สารที่ต้องการวัดปริมาณมีอยู่ในตัวอย่างที่ต้องการวัด เช่น ฮอร์โมนในซีรัม นอกจากนี้ยัง หมายถึง สารแอนติเจนมาตรฐานที่ผ่านขบวนการทำให้บริสุทธิ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับแอนติเจนในตัวอย่างสารมาตรฐานนี้จะนำมาใช้สร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) สำหรับอ่านค่าความเข้มข้นของแอนติเจนในตัวอย่าง (unknown samples)

2. แอนติเจนติดสลากสารกัมมันตรังสี (radioisotope labeled antigen) สารนี้มีคุณสมบัติทางเคมีและอิมมูโนโลยีเทียบเท่ากับแอนติเจนที่บริสุทธิ์ทุกประการ ในวิธี RIA จะใส่สารตัวนี้ลงไปในหลอดทดลองจำนวนมากเกินพอ (excess)

3. แอนติบอดีที่มีความจำเพาะและความชอบต่อแอนติเจนสูงโดยจะใส่ลงในหลอดทดลองจำนวนจำกัด (limited) คือ น้อยที่สุดเท่าที่จะทำให้การวิเคราะห์ได้ผลดี

4. ภาวะภายในหลอดทดลองที่เหมาะสม (optimal condition) เพื่อให้ Ag และ Ab เข้าจับกันจนถึงภาวะสมดุล (equilibrium condition) ภาวะภายในหลอดทดลองที่สำคัญในการทำ RIA คือ ภาวะความเป็นกรด-ด่าง (acid-base balance) ชนิดของน้ำยาที่เหมาะสมกับแอนติเจนนั้น การจัดอุณหภูมิและเวลาของการทำปฏิกิริยา (incubation temperature and incubition time)

5. วิธีการแยก (separation techniques) แอนติเจน-แอนติบอดี คอมเพล็กซ์ หมายถึง วิธีการแยกเบาว์นฟอร์ม (B) ออกจากฟรีฟอร์ม (F) ภายหลังการเกิดภาวะสมดุลของปฏิกิริยา

6. การนับวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่องนับวัดปริมาณรังสี (radioactivity counting sys-tem) และการประมวลผล (data processing) ที่มีประสิทธิภาพสูงและเชื่อถือได้

7. การควบคุมคุณภาพ (quality controls)ของการวิเคราะห์ ที่ให้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือ

5.2.2 Non-competitive binding radioassay

ปฏิกิริยาของ RIA ประเภทนี้ไม่มีการแย่งชิงกันเข้าทำปฏิกิริยาของสารที่ต้องการวัดกับตัวยึดเกาะ วิธีการที่จัดอยู่ในประเภทนี้และเป็นที่รู้จักกันแพร่หลาย ได้แก่

1. Radiometricassay (RMA) เช่น การทำ T_3-uptake test หรือ T_3-resin uptake สารที่ติดสลากจะเข้าไปจับกับ binder ที่มีความชอบต่อกันสูง แล้วหาปริมาณ binder ออกมาเป็นค่านับวัดปริมาณรังสี หรือ เปอร์เซ็นต์ หรือ อัตราส่วน หรือ ดัชนี วิธีการวิเคราะห์เช่นนี้เป็น semi-quantitative method

2. Immunoradiometricassay (IRMA) วิธีนี้เป็นการใช้ Ag และ Ab เข้าทำปฏิกิริยากัน แต่แตกต่างจากวิธี RIA คือ จะติดสลากสารกัมมันตรังสีเข้าที่แอนติบอดี (Ab*) และจะกำหนด การใส่ Ab* เข้าไปในหลอดทดลองในจำนวนมากเกินพอ (excess) ทำให้ Ag ถูก saturate

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วย Ab* วิธีการนี้นิยมใช้ในการวิเคราะห์สารที่ติดสลากได้ยาก แต่สร้าง Ab ได้ง่าย และการติดสลาก Ab ทำได้สะดวกเหมาะกับการปฏิบัติ วิธี IRMA นิยมใช้ในการวิเคราะห์หา virus HAA (hepatitis associated antigens) ferritiin ส่วนวิธีการแยก B ออกจาก F ของ IMRA นิยมใช้ solid phase absorption technique เนื่องจาก Ab มีคุณสมบัติในการจับติดกับ solid phase ด้วย covalent bond

5.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ RIA

วิไลวรรณ (2550) ได้ทำการศึกษา การใช้วิธี RIA เพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนสารอะทราซีนในสิ่งแวดล้อม ซึ่งการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาชุดตรวจวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชอะทราซีนในน้ำด้วย หลักการของวิธี RIA โดยใช้แอนติบอดีชนิดโพลิโคลนอลเคลือบบนหลอดทดลอง และใช้อนุพันธ์ของอะทราซีนติดฉลากด้วยสารรังสี คือ ไอโอดีน-125 เป็นตัวติดตามผลการเกิดปฏิกิริยา พบว่า วิธีที่พัฒนใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานาน 2 ชั่วโมง มีความไวในการวิเคราะห์ 0.15 ppb ซึ่งต่ำกว่าค่าที่ยอมให้มีได้ในน้ำดื่ม ไม่เกิน 3 ppb และมีความถูกต้อง แม่นยำ ในการวิเคราะห์สูง จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองการปนเปื้อนของอะทราซีนในแหล่งน้ำทั่วไป ทำให้การใช้น้ำเพื่อการอุปโภคและบริโภคของประชาชนมีความปลอดภัยมากขึ้น

ในรายงานการศึกษาของ ประภาภรณ์ (2550) ได้ทำการศึกษา ผลของฮอร์โมน P_4 ที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรินต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้วิธี RIA เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 ในน้ำเลือดของแม่พันธุ์กุ้งขาว-แวนนาไมเพื่อติดตามพัฒนาการของพัฒนารังไข่กุ้งทดลอง หลังจากที่เตรียมไมโครแคปซูลของฮอร์โมน P_4 ผสมลงในอาหารให้กุ้งกินนาน 4 สัปดาห์ ผลการศึกษา พบว่า ปริมาณฮอร์โมน P_4 ในเลือดมีความแปรผันตามปริมาณฮอร์โมนที่ผสมลงในอาหาร โดยปริมาณฮอร์โมน P_4 ในเลือดสูงที่ สุดในสัปดาห์แรกภายหลังจากได้รับอาหารทดลอง (0.77 ± 0.12 ng/ml) จากนั้นจะค่อย ๆ ลดต่ำลงจนกระทั่งคงที่ในสัปดาห์ที่ 4 (0.04 ± 0.02 ng/ml) เมื่อศึกษาปริมาณฮอร์โมน P_4 ในแต่ละระยะการพัฒนาของรังไข่และไข่ ในแม่กุ้งกลุ่มควบคุมฮอร์โมน P_4 มีระดับต่ำสุดที่รังไข่ระยะที่ 1 และจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นจนถึงระยะที่ 4 แต่ในแม่กุ้งทดลอง ฮอร์โมนขึ้นสูงในรังไข่ระยะแรก คาดว่าเนื่องมา จากการที่แม่กุ้งได้รับอาหารฮอร์โมนต่อเนื่องมาเป็นระยะเวลา 1 เดือน จากนั้นระดับฮอร์โมนในเลือด จะลดต่ำลงในรังไข่ระยะที่ 2 และ 3 และกลับสูงขึ้นอีกในรังไข่ระยะที่ 4

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในขณะที่ เสาวลักษณ์ (2548) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดฮอร์โมน P_4 และ 17α-OHP_4 จากแม่เพรียง (*Perinereis* sp.) ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ โดยในการศึกษาได้ใช้ RIA เพื่อตรวจวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 และ 17α-OHP_4 ในเนื้อเยื่อรังไข่กุ้ง พบว่า ในรังไข่ของแม่กุ้งกุลาดำมีปริมาณของฮอร์โมน P_4 และ 17α-OHP_4 จะมีความสัมพันธ์กับระยะพัฒนาการของรังไข่ โดยฮอร์โมนทั้งสองตัวมีปริมาณเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจากรังไข่ระยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 4 อย่างต่อเนื่อง และในรายงานการศึกษาของ Tahara and Yano (2003) ได้ทำการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ และ PGE_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้ง *Penaeus japonicus* โดยใช้วิธี RIA ผลการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ เพิ่มขึ้นเฉพาะพัฒนาการของเซลล์ไข่ระยะที่ 1 และ2 เท่านั้น โดยระดับความเข้นข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ เท่ากับ 66.7 และ 303 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ในพัฒนาการของเซลล์ไข่ระยะที่ 1 และ 2 ตามลำดับ หลังจากนั้นเมื่อไข่ได้มีพัฒนาการไข่ระยะที่ 3 และ4 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ จะเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่อง เท่ากับ 35.27 และ125.25 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตรในพัฒนาการของรังไข่ระยะที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของฮอร์โมน PGE_2 จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (4037.70 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ในพัฒนาการของรังไข่ระยะที่ 2 หลังจากนั้นระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน PGE_2 จะเริ่มลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อไข่ได้มีพัฒนาการรังไข่เข้าสู่ระยะที่ 3 และ 4

ในรายงานการศึกษาของ ชนญญา (2541) ทำการศึกษาเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมของฮอร์โมนที่สกัดจากต่อมใต้สมองของกบนาต่อขบวนการพัฒนาของไข่กบนา (*Rana tigerina*) ผลการศึกษา พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารที่สกัดจากต่อมใต้สมองกบนา เหมาะสมในการกระตุ้นการสร้างสเตรอยต์ ฮอร์โมน คือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาระดับของฮอร์โมน E_2 และP_4 ที่สร้างจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดต่างกัน 0.1 มม. โดยศึกษาในฟอลลิเคิล ที่มีขนาดตั้งแต่ 0.8-1.7 มิลลิเมตร เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารที่สกัดจากต่อมใต้สมองความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี RIA ผลการศึกษา พบว่า ฮอร์โมน E_2 มีปริมาณสูงสุด (1,359 พิโคกรัมต่อฟอลลิเคิล) ในไข่ที่มีขนาด 1.4 มิลลิเมตร และระดับของฮอร์โมนชนิดนี้จะค่อย ๆ ลดลงในไข่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น คือ ขนาด 1.5-1.7 มิลลิเมตร ในขณะที่ ฮอร์โมน P_4 เริ่มสร้างในไข่ที่มีขนาด 1.1 มิลลิเมตร และระดับของฮอร์โมนชนิดนี้จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งไข่มี ขนาด 1.7 มิลลิเมตร จึงจะมีปริมาณฮอร์โมนมากที่สุด คือ 1139 พิโคกรัมต่อฟอลลิเคิล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. โคเมท แอสเสย์ (comet assay)

โคเมท แอสเสย์ เป็นวิธีที่พัฒนาขึ้นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1984 โดยนักวิจัยชาวสวีเด็น ชื่อ Östling and Johansson และปรับประยุกต์ต่อมาโดย Singh และคณะ ในปี ค.ศ. 1988 วิธีการนี้มีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น single cell gel electrophoresis หรือ microgel ซึ่งจะใช้การตรวจวิเคราะห์คุณภาพของสารพันธุกรรม (โมเลกุลดีเอ็นเอ) ในระดับในระดับชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ โดยอาศัยการหลักการเคลื่อนตัวของสารพันธุกรรมขนาดต่างกันซึ่งเกิดจากความเสียหายของ single strand และ double strand DNA ที่ขาดและแตกหัก (DNA damage) โดยธรรมชาติของเซลล์เอง หรือถูกทำลายจากปัจจัยแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตนั้นอาศัยอยู่ ซึ่งทำการวิเคราะห์ระยะทางการเคลื่อนตัวของสารพันธุกรรมที่เคลื่อนตัวออกจากนิวเคลียสหลักไปในทิศทางเดียวกับการไหลของกระแสไฟฟ้ากระแสตรง (AC) จากขั้วบวกไปยังขั้วลบ ทำให้มองเห็นการกระจายตัวของสารพันธุกรรมที่ถูกทำลาย หรือเสื่อมสภาพมีลักษณะคล้ายดาวหาง (Singh *et al*., 1988; Speit *et al*., 1998; Avishai *et al*., 2002) โดยผลที่วิเคราะห์ได้จากภาพถ่ายของโคเมท แอสเสย์ เซลล์ ภายหลังผ่านกระบวนการย้อมด้วยสารเรืองแสง (เอทิเดียมโบรไมด์) ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ UV filter ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร กำลังขยาย 100 เท่า (Sriussadaporn *et al*., 2003; Speit *et al*., 1998)

โดยผลสามารถแบ่งออกได้ 2 ส่วน คือ ส่วนแรก คือ ส่วนหัว (head) เป็นพื้นที่ของสารพันธุกรรมคุณภาพดีส่วนใหญ่จะไม่ถูกทำลาย รวมกลุ่มเป็นก้อน ส่วนที่สอง คือ ส่วนหาง (tail) เป็นพื้นที่ของสารพันธุกรรมซึ่งมีคุณภาพไม่ดี ถูกทำลาย และมีรูป แบบการเคลื่อนตัวออกและกระจายตัวคล้ายดาวห่าง (Gichner, 2003) ปัจจุบันวิธี โคเมท แอสเสย์ ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการทดสอบเบื้องต้นเพื่อประเมินความเสียหาย หรือตรวจสอบคุณภาพของสารพันธุกรรมของเซลล์ต่างๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์สืบพันธุ์ (ชาตรี, 2550) และเซลล์พืช (มณธิรา, 2550; ประดิษฐา, 2551) นอกจากนั้น วิธีโคเมทแอสเสย์ยังเป็นวิธีที่มีขั้นตอนการทดสอบไม่ยุ่งยาก การดำเนินงานง่าย รวดเร็ว มีความไวสูง และใช้ต้นทุนในการวิเคราะห์ต่ำ รวมทั้งใช้ตัวอย่างเซลล์ปริมาณน้อย (McCarthy *et al*., 1997)

6.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนตัวของสารพันธุกรรมในวิธีโคเมท แอสเสย์

ศิริพร (2531) รายงานว่า มีองค์ประกอบและส่วนผสมหลายอย่างในวิธีโคเมท แอสเสย์ ซึ่งจะช่วยให้การเคลื่อนตัวของสารพันธุกรรมขนาดต่างกันดำเนินไปอย่างสมบรูณ์ ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ขนาดของดีเอ็นเอ โดยโมเลกุลดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะผ่านเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก ดังนั้นในเวลาเท่ากันและสภาวะเดียวกันดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็ก

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอที่มีรูปร่างที่ต่างกันแม้จะมีน้ำหนักโมเลกุลที่เท่ากัน เมื่ออยู่ในสภาวะเดียวกันจะเคลื่อนที่ผ่านเจลด้วยความเร็วที่ต่างกัน เช่น ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวง (super helical circular) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่คลายเกลียว (nick circular DNA)

3. ความเข้มของเจล (gel concentration: pore size of the gel) เจลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีช่องว่างระหว่างโมเลกุล (pore) น้อย ทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านได้ช้ากว่าเจลที่มีความเข้มข้นต่ำ

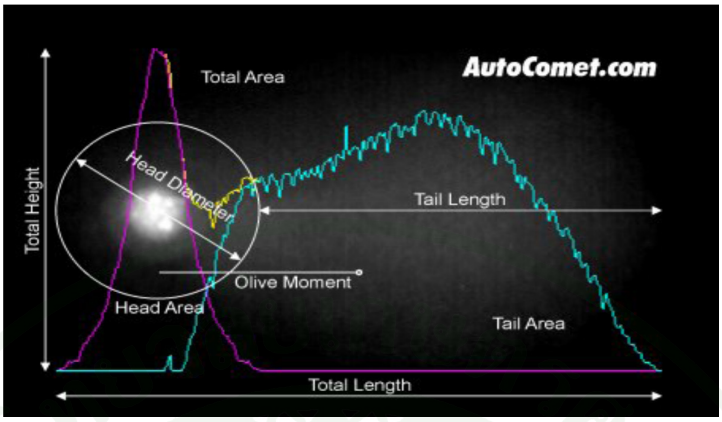
4. ความต่างศักย์ไฟฟ้า (applied voltage) อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความต่างศักย์ไฟฟ้า ในสภาวะที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าต่ำๆ ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่เร็วขึ้นเมื่อความต่างศักย์ไฟฟ้ามากขึ้น (ประมาณ 1 โวลท์ต่อเซนติเมตร) แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอโมเลกุลใหญ่ๆ จะเพิ่มมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการแยกดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลลดลง

5. ทิศทางของกระแสไฟฟ้า (direction of the electric field) ดีเอ็นเอที่มีขนาดอยู่ในช่วงไม่เกิน 100 กิโลเบส จะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วเดียวกันถ้าอยู่ในสนามไฟฟ้าที่มีทิศทางเดียวกันและคงที่

6. ส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิ (base composition and temperature) พบว่าส่วนประกอบของเบสและอุณหภูมิไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล ณ ช่วงอุณหภูมิ 4-30 องศาเซลเซียส

7. บัฟเฟอร์ (buffer) การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าขึ้นอยู่กับความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ถ้ามีการเตรียมความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ผิด เช่น เจือจางมาก ตัวนำกระแสไฟฟ้าจะนำกระแสไฟฟ้าได้ไม่ดี และดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้ามาก ในกรณีที่เตรียมความเข้มข้นของบัฟเฟอร์สูงมากเกินไปจะทำให้การนำกระแสไฟฟ้ามีประสิทธิภาพดี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 พารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการประเมินความเสียหายของสารพันธุกรรมในโปรแกรมโค-เมท แอสเสย์

ที่มา: Tritek (2013)

6.2 การวิเคราะห์ภาพเซลล์โคเมท แอสเสย์

การวิเคราะห์ภาพของเซลล์โคเมท แอสเสย์ ภายใต้เงื่อนไขตามที่ได้บรรยายในโปรแกรมสำเร็จรูป comet score ประกอบด้วยรายละเอียดต่างๆ (ภาพที่ 5) โดยคำจำกัดของพารามิเตอร์และสูตรคำนวณที่ใช้ในประเมินความเสียหายของสารพันธุกรรม โดยโปรแกรมสำเร็จรูป Comet Score freeware v 1.5 ประกอบด้วย

1. Tail length คือ ความยาวของส่วนหางของโคเมท เซลล์ ซึ่งจะบ่งชี้ถึงความเสียหายที่เกิดขึ้นของสารพันธุกรรม (โมเลกุลดีเอ็นเอ) Tail Length = Tail Extent (Tail from Center), Tail Extent + Head Extent /2

2. Olive Tail Moment คือ ค่ากราฟแท่งที่ได้จากผลของระยะทางระหว่างจุดศูนย์กลางจากส่วนหัวและหางของโคเมท เซลล์ กับ Tail DNA (%)

Olive Tail Moment = (Tail.mean - Head.mean) X Tail DNA (%) /100.

Extent Tail Moment = Tail Length X Tail DNA (%) /100.

3. สารพันธุกรรม Head DNA (%) คือ Head.OptInten / (Head.OptInten + Tail.OptInten) X 100.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. Tail DNA (%) คือ 100 – Head DNA (%)

5. Head intensity คือ ความเข้มส่วนหัวของโคเมท เซลล์ แสดงถึงสารพันธุกรรมที่ไม่ถูกทำลาย

6. Tail intensity คือ ความเข้มในส่วนหางจะแสดงถึงสารพันธุกรรมที่ถูกทำลาย

สูตรคำนวณคุณภาพของสารพันธุกรรม (โมเลกุลดีเอ็นเอ)

ร้อยละการถูกทำลายดีเอ็นเอ

(Sriussadaporn *et al*. 2003) $\frac{\sum_{i=1}^{n}(T/(T+H)}{n}X100$

โดย T คือ พื้นที่ส่วนหางของโคเมท เซลล์

H คือ พื้นที่ส่วนหัวของโคเมท เซลล์

n คือ จำนวนโคเมทเซลล์ที่ทำการสุ่มตรวจสอบ

6.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับวิธีโคเมท แอสเสย์

ในรายงานการศึกษาของ ทัศนีย์ และคณะ (2550) ได้ศึกษาผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสต่อสุขภาพของสัตว์น้ำ โดยดำเนินการวิเคราะห์เป็นพิษของคลอร์ไพริ-ฟอส ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.01 0.05 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทดสอบผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นกับเซลล์เม็ดเลือดในกุ้งพีนีอิคโดยใช้วิธีโคเมท แอสเสย์ กุ้งทดลองได้ทำการบมกับคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดและเจือจางเซลล์เม็ดเลือดให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วนำมาวิเคราะห์ตามกระบวนการของวิธีโคเมท แอสเสย์ ซึ่งผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า วิธีโคเมท แอสเสย์ สามารถใช้ประเมินผลกระทบที่เกิดจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสฟอรัสต่อเซลล์เม็ดเลือดกุ้งพีนีอิคได้

เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ ชาตรี (2552) ได้ทำการศึกษา การหาดรรชนีทางชีวภาพในหอย แมลงภู่เพื่อวัดการปนเปื้อนของสารปรอท บริเวณแท่นผลิตปิโตรเลียมในอ่าวไทย ในการ ศึกษาได้นำวิธีโคเมทแอสเสย์ มาใช้เพื่อการตรวจสอบและประเมินผลกระทบจากสารปรอทที่เกี่ยว ข้องกับการตอบสนองของสารพันธุกรรมในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ในพื้นที่รอบบริเวณแท่นผลิตปิโตรเลียมในอ่าวไทย โดยการดำเนินการทดลองเริ่มจากเลี้ยงหอยแมลงภู่ในห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิบัติการ จากนั้นให้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารปรอทต่อสารพันธุกรรม ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ ในหลอดทดลอง โดยให้เม็ดเลือดและสเปริ์มของหอยแมลงภู่สัมผัสกับสารปรอทในความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.001 - 10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร) ที่เวลา 10 30 และ 60 นาที จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ผลผ่านสองพารามิเตอร์ คือ Tail length และ Tail moment ผลการศึกษา พบว่า ความเสียหายของสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้นในระดับที่สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของสารปรอท และพบความเสียหายของสารพันธุกรรมในระดับต่ำสุด ที่ความเข้มข้นของสารปรอท 0.001 ไมโครกรัมต่อลิตร นาน 10 นาที โดยสเปริ์มของหอย มีแนวโน้มที่จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสารปรอทมากกว่าเซลล์เม็ดเลือด

สอดคล้องกับประดิษฐา (2551) ได้ทำการศึกษาการใช้วิธีโคเมท แอสเสย์ เพื่อการติดตามและการประเมินผลกระทบของก๊าซชีวภาพ และน้ำชะมูลฝอยต่อสิ่งมีชีวิต โดยใช้ระดับการทำลายสารพันธุกรรมของพืชเป็นตัวชี้วัดครั้งนี้ ผลการวิจัย พบว่า การทำลายสารพันธุกรรมของพืชมีแนว โน้มสูงขึ้น เมื่อพืชได้สัมผัสกับก๊าซชีวภาพที่มีความเข้มข้นสูงมากขึ้น และมีระยะเวลาในการสัมผัสมากขึ้น จะพบระดับการถูกทำลายของสารพันธุกรรมของใบพลูด่างสูงสุดที่ระดับความเข้มข้นของมีเทนในบรรยากาศร้อยละ10 ที่ระยะเวลาสัมผัส 288 ชั่วโมง มีค่าระดับการถูกทำลายร้อยละ 62±0.20 ซึ่งในแต่ละระดับความเข้มข้นของมีเทนระดับการถูกทำลายสารพันธุกรรมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ในรายงานการศึกษาของ Rozgaj *et al.* (2002) ราย งานว่า การใช้วิธีโคเมท แอสเสย์ เพื่อทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมการแลกเปลี่ยนซิสเตอร์โครมาติด และการทดสอบไมโครนิวเคลียสในลิมโฟไซต์ของคน โดยใช้สาร cadmium chloride ความเข้มข้น 10^{-4} 10^{-3} และ 5×10^{-3} กรัมต่อลิตร พบว่า วิธีโคเมท แอสเสย์ สามารถใช้เป็นวิธีประเมินความผิดปกติของโครโมโซมซึ่งได้รับผลกระทบจาก $CdCl_2$ เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Kleinsasser *et al.* (2006) รายงานว่า การใช้วิธีโคเมท แอสเสย์ เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารเคมีและวัสดุอุดฟัน 3 ชนิด คือ urethanedimetha-crylate (UDMA), dimethacry-late (TEGDMA) triethyleneglycol และ 2-hydroxyethylmethacry-late (HEMA) ผลทดลองพบว่า TEGDMA ความเข้มข้น $2.5x10^{-2}$ โมลาร์ UDMA ความเข้มข้น $6.4x10^{-2}$ โมลาร์ และ HEMA ความเข้มข้น $6.1x10^{-2}$ โมลาร์ มีผลให้สารพันธุ-กรรมเกิดความเสียหาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณยีนในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยา PCR เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในงานวิจัยทางด้านพันธุวิศวกรรม เนื่องจากเป็นวิธีที่ช่วยเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมหรือดีเอนเอให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นหลายเท่า จากดีเอนเอต้นแบบที่มีอยู่อย่างจำกัด วิธีนี้ถูกคิดค้นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดย Kary Mullis และมีรายงานว่าผู้ที่นำวิธีนี้มาใช้เป็นครั้งแรกใน ปี ค.ศ. 1985 โดย Saiki และคณะ ซึ่งได้ทำการเพิ่มปริมาณยีนเฉพาะบริเวณยีนเบต้าโกลบิน จากดีเอ็นเอที่สกัดจากเม็ดเลือดขาวของคนไข้โรค sickle cell anemia และคนปกติ (Bartlett and Stirling, 2003; Saiki *et al*., 1985; 1988) จุดเด่นของปฏิกิริยา PCR คือ สามารถย่นระยะเวลาและลดขั้นตอนการทำงานในการเพิ่มปริมาณยีน จากเดิมที่ต้องตัดต่อยีนเข้ากับพลาสมิด แล้วจึงเพิ่มปริมาณพลาสมิดในเซลล์ แล้วจึงแยกสกัดพลาสมิด ออกจากเซลล์และแยกยีนออกมาตามลำดับซึ่งต้องใช้เวลาและมีขั้นตอนมากและยุ่งยาก วิธีพีซีอาร์ลดเวลาในการทำงานได้มากเนื่องจากไม่ต้องทำการ โคลนนิ่ง (cloning) และไม่ต้องแยกดีเอ็นเอบริสุทธิ์จากปฏิกิริยาพีซีอาร์เพราะดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ดีพอ (Cheng *et al*., 1994)

ปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์และนักวิจัย ได้นำวิธีนี้มาใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทั้งในรูปแบบพื้นฐานและการประยุกต์ใช้ตามความเหมาะสมปฏิกิริยา PCR อาศัยหลักการของการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลองซ้ำ กันหลายๆ รอบ ซึ่งอาศัยการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ที่มีความสามารถทนร้อนในระยะแรกๆของวิธีพีซีอาร์จะใช้เอนไซม์ Klenow fragment ซึ่งไม่สามารถทนความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานได้ ในทุกขั้นตอนของการ denature-tion ที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จึงต้องมีการเติมเอ็นไซม์ใหม่ในขั้นตอน primer extention ต่อมาได้มีการค้นพบเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีความ สามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง ซึ่งแยกสกัดได้จากแบคทีเรีย *Thermus aquaticus* (Taq) ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อน จึงได้มีการนำ *Taq* DNA polymerase มาใช้แทนเอนไซม์ Klenow fragment (Chien *et al*., 1976; Lawyer *et al*., 1993; Cheng *et al*., 1994) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยปฏิกิริยา PCR ต้องอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนซึ่งปฏิริยาจะเกิดขึ้นได้ในหลอดทดลองต้องประกอบด้วย ดีเอ็นเอต้นแบบ และ dNTPs เป็นซับสเตรท โดยปฏิกิริยา 1 รอบ จะประกอบด้วยขั้นตอน (Rychlik *et al*.,1990; Lawyer *et al*., 1993; Sharkey *et al*., 1994; Chien *et al*., 1976) ดังต่อไปนี้

1. Denaturation step เป็นการทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่ (double strand) แยกออกเป็นสาย เดี่ยว (single strand) ที่อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. Annealing step ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเส้นเดี่ยวทั้งสองเส้นที่มีลำดับเบสคู่สมกัน โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40-60 องศาเซลเซียส

3. Extension step เป็นขั้นตอนการนำนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสมเข้ามาต่อที่ปลาย 3' OH ของไพรเมอร์ โดยการทำงานของ เอนไซม์ Taq DNA polymerase ซึ่งต้องการอุณหภูมิประมาณ 70-73 องศาเซลเซียส

องค์ประกอบที่สำคัญขั้นพื้นฐานของปฏิกิริยา PCR (Sambrook and Russel, 2001) มีดังนี้

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์คุณภาพดีและดีเอ็นเอที่คุณภาพไม่ดีนักได้มาจากการสกัดโดยตรงจากแหล่งต่างๆ เช่น แบคทีเรีย พืช สัตว์และตัวอย่างเลือดต่างๆ

2. Oligonucleotide primer ที่นิยมใช้จะมีขนาด 20-24 นิวคลีโอไทด์ มีองค์ประกอบของเบส G และ C อยู่ระหว่าง 40-60 เปอร์เซ็นต์ โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ร่วมกันควรมีส่วนประกอบของ G+C เท่ากัน และไม่ควรให้ไพรเมอร์ทั้ง 2 มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน เพราะจะจับกันเองได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ

3. เอนไซม์ DNA polymerase ทำหน้าที่ในการเติม deoxyribonucleotide ตรงตำแหน่งปลายด้าน 3'ของดีเอ็นเอ ซึ่งต้องมีคุณสมบัติในการทนอุณหภูมิสูง ซึ่งปัจจุบันใช้ *Taq* DNA polymerase

4. บัฟเฟอร์สำหรับทำปฏิกิริยา เป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase

5. dNTP ประกอบด้วย dATP,dTTP,dCTPและ dGTP เป็นสารที่ DNA polymerase นำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอ

6. แมกนีเซียมคลอไรด์ เป็นส่วนที่ช่วยเสริมการทำงานของ DNA polymerase

8. บทบาทฮอร์โมนในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในครัสตาเซียน

ครัสตาเซียนเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์สัตว์จะเริ่มกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) พบฮอร์โมนหลายชนิดแสดงบทบาทควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ให้สามารถดำเนินไปอย่างสมบูรณ์ โดยเฉพาะกลุ่ม neuropeptide hormones ชื่อ vitellogenesis inhibiting hormone (VIH) หรือ Gonad inhibiting hormone (GIH) ฮอร์โมนตัวนี้จัดอยู่ในกลุ่ม crustacean

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hyperglycemic hormone (CHH) family ตัวอย่างเช่น CHH, molt-inhibiting hormone (MIH) และ mandibular organ-inhibiting hormone (MOIH) ฮอร์โมนในกลุ่มนี้สร้างและหลั่งจาก X-organ/sinus gland complex ในก้านตาครัสตาเซียน โดยหน้าที่แล้ว neuropeptide hormones กลุ่มนี้ทำหน้าที่ยังยั้งการหลั่ง Gonad Stimulating Hormone (GSH) จาก thoracic ganglia และ brain โดยหน้าที่ของ GSH คือ ควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในครัสตาเซียน (Wongsawang *et al*., 2005; Yano *et al*., 1988)

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในครัสตาเซียนเพศเมีย ประกอบด้วย 3 ช่วง ซึ่งแต่ละช่วงพบบทบาทของฮอร์โมนสืบพันธุ์หลายกลุ่มเข้ามาส่งเสริมและสนับสนุน ดังนี้

ช่วงแรก: การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ (early vitellogenesis)

ขั้นตอนนี้เซลล์ไข่จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กน้อย เนื่องจากเป็นช่วงเริ่มต้นในการแบ่งเซลล์ (gametocyte) ที่มีโครโมโซมสองชุด (diploid) หรือชุดเดียวให้กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว การเกิดเซลล์สืบพันธุ์เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) หรือไมไทซิส (mitosis) และสิ้นสุดขั้นตอนนี้เมื่อสัตว์จะเริ่มการสะสมอาหารภายในรังไข่เพียงเล็กน้อย (Quackenbush, 1991; Yano, 1995; Charniaux- Cotton and Payen, 1988) ในขั้นตอนนี้ Martin *et al*. (2007) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์กันเองภาย ในกลุ่มของ vertebrate-type steroids 3 ชนิด คือ estradiol (E_2) 17α-OH P_4 และ Testosterone (I) ต่อการเจริญของไข่กุ้งก้ามกราม พบว่า ตลอดการศึกษาพบ E_2 ที่ระดับต่ำ ๆ ในทุกระยะของไข่โดย E_2 จะขึ้นสูงสุดที่ไข่ระยะที่ 2 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวแสดงว่า E_2 อาจมีหน้าที่กระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ การที่ E_2 ขึ้นสูงตอนแรกๆ แล้วลดต่ำลงจึงสันนิษฐานว่า E_2 สังเคราะห์จากรังไข่ แล้วปล่อยสู่น้ำเลือดเพื่อไปยังตับและตับอ่อนกระตุ้นการสังเคราะห์สาร vitellogenin

ในรายงานการศึกษาโดยใช้วิธีการฉีดฮอร์โมน P_4 และ17α-OHP_4 พบว่า สามารถกระตุ้นกระบวนการ ovarian maturation ในกุ้งตะกาด (*Metapenaeus ensis*) (Tano, 1985) และกระตุ้นการหลั่ง vitellogenin ในกุ้งแชบ๊วย (Yano,1987) ฮอร์โมน P_4 จะขึ้นสูงไปเรื่อยๆ จน vitellogenin โดย follicular cells ซึ่งจะขนส่งไปยัง oocytes ในภายหลังแม้ว่าจะมี sterols ปริมาณมากในเนื้อเยื่อครัส-ตาเซียน แต่ครัสตาเซียนเช่นเดียวกับกลุ่มแมลงอื่นๆ ก็ไม่สามารถสังเคราะห์ sterols de novo synthe-sis ได้ ดังนั้นจึงต้องรับคอเลสเตอรอลมาจากอาหารเท่านั้น (Fox *et al*., 1994) การทดลองชี้ว่าครัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตาเชียนจำเป็นต้องได้ dietary sterols สำหรับการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิต ซึ่งระดับของคอเลสเตอรอลที่แนะนำไว้ เท่ากับ 0.4 - 1.4 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับชนิดและอายุและสภาพแวดล้อมภายนอก

ช่วงที่สอง: การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นทุติยภูมิ (secondary vitellogenesis)

ขั้นตอนนี้เซลล์ไข่เจริญเต็มที่โดยมีขนาดเพิ่ม 50 เป็น 300 ไมโครเมตร (Quackenbush, 2001) รอบเซลล์ไข่เริ่มมีผนังเป็น secondary follicle cell 1 ชั้น (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) ต่อมากุ้งจะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและไขมันในตับและตับอ่อน หรือภายรังไข่เอง (Panouse, 1943; 1944) ให้กลายเป็นสารโปรตีนไข่แดง (vitellogenin) (Adiyodi, 1985) เสร็จสมบรูณ์แล้วจึงส่งผ่านน้ำเลือดเพื่อเปลี่ยนรูปกลายเป็นสารโปรตีนไข่แดง(vitellin) (Souty-Grosset, 1997) แล้วสะสมเป็นโปรตีนไข่แดง (yolk protein) ภายในเซลล์ไข่ (Quackenbush, 2001; Lee *et al*., 1997) ในขั้นตอนนี้ Fingerman *et al*. (1993) รายงานว่า P_4 และกลุ่ม E_2 ซึ่งเป็น Vertebrate-type steroids ที่สำคัญของระบบสืบพันธุ์ของครัสตาเชียน มีผลทางบวกต่อพัฒนาการของไข่ของครัสตาเชียน (Nagabhushanam *et al*., 1980; Yano, 1985, 1987; Quinitio *et al*., 1994)

โดยบทบาทของ P_4 คือ กระตุ้น maturation ผ่านกระบวนการ vitellogenesis (Fairs *et al*.,1989) และการเพิ่มเส้นผ่าศูนย์กลางของไข่กุ้งกุลาดำ (Tsukimura and Kamemoto, 1991) นอกจากนี้ P_4 ยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมน Vitellogenesis Stimulating Ovarian Hormone (VSOH) (Fingerman *et al*.,1993) หรือ Androgens และ estrogen (Xu and Barker, 1990) โดยผลการรายงานจากห้องปฏิบัติการที่ทำการทดลองบ่ม (in vitro) เนื้อเยื่อรังไข่ แสดงว่า P_4 และ 17α-OHP_4 มีอิทธิพลต่อทั้ง Vitellogenesis และ final maturation ของไข่กุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า 17α-OHP_4 ดูเหมือนจะมีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการ vitellogenesis ขณะที่ P_4 ออกฤทธิ์ต่อ final maturation เนื่องจาก P_4 ทำให้ไข่มีเปอร์เซ็นต์ Cortical rod oocytes สูงกว่า 17α-OHP_4 (Meunpol *et al*., 2007)

ในการศึกษาลักษณะเดียวกัน (in vitro) Quackenbush (2001) รายงานว่า P_4 และ E_2 มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของไข่ของ decapods โดยกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนไข่แดงในเซลล์ไข่ ในขณะที่ฮอร์โมน testosterone estrogen และ ecdysterone มีผลเพียงเล็กน้อย เช่น ในกุ้งก้ามกราม พบว่า E_2 มีฤทธิ์เป็น metabolic activator ที่ระดับเซลล์ทำให้เกิดการเพิ่มระดับ mitochondrial ATP-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ase, cytosolic malate dehydrogenase และ glucose-6-Phosphate dehy-drogenase ในตับและตับอ่อน (Ghosh and Ray,1993) นอกจากนั้น E_2 และ17α-OHP_4 ทำให้ GSI ของกุ้งเครย์ฟิช (*Procambarus clarkia*) เพิ่มขึ้นแต่พบเฉพาะ17α-OHP_4 ทำให้เส้นผ่าศูนย์กลางของไข่เพิ่มขึ้น เมื่อให้ 17α-OHP_4 ร่วมกับ MF จะยับยั้ง oocyte growth โดยจะยับยั้ง stimulatory action ของ MF ต่อรังไข่ของเครย์ฟิช (*Procambarus clarkia*) (Rodriguez *et al*., 2002)

ช่วงสุดท้าย: การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ขั้นสุดท้าย

ขั้นนตอนนี้สามารถจำแนกออกเป็น 2 ขั้นตอน (Yano, 1995) โดยขั้นตอนแรก คือ การตกไข่ (ovulation) เกิดขึ้นเมื่อ secondary follicular epithelium บริเวณรังไข่หดตัวลง (Charniaux-Cotton and Payen, 1988) ขั้นที่สอง คือ การเกิด Germinal vesicle breakdown (GVBD) ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังจากที่เกิดการตกไข่แล้ว แต่ oocyte จะยังคงอยู่ในระยะ meiosis หรือเกิดกระบวนการยับยั้ง meiotic metaphase และยังคงอยู่ใน cytoplasmic membrane ของเซลล์ไข่ในรังไข่ และเมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสม รังไข่จะเกิด ovulation เพื่อการผสมพันธุ์ต่อไป ในขั้นตอนนี้พบบทบาทของฮอร์-โมนในกลุ่ม eiosanoids ซึ่งมีรายงานน้อยมากในครัสตาเชียน แม้ในระยะ30 ปีที่แล้วมาจะมีการศึก-ษาเกี่ยวการสังเคราะห์และหน้าที่ของฮอร์โมนในกลุ่มนี้พอสมควร นอกจาก peptide hormonees ที่รู้จักกันดี เช่น Gonad-inhibiting hormone(GIH) และ gonad stimulating hormone (GSH) แล้ว Prostaglandins เป็นฮอร์โมนอีกตัวหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสืบพันธุ์ของครัสตาเชียน

Meunpol *et al*. (2010) รายงานว่า PGE_2 ทำหน้าที่เป็น vitllogenesis inducing factor และ final development step เนื่องจาก พบว่า PGE_2 มีอิทธิพลทั้งต่อพัฒนาการของ yolk globules ใน oocytes และการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของ oocytes ในระยะที่มีการสร้าง cortical rods พบรายงานเพิ่มเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์ PGE_2และ$PGF_{2\alpha}$ในรังไข่ของ crayfish จะเพิ่มก่อน ovulation (Spaziani *et al*.,1993) ขณะที่บางรายงานพบกิจกรรม (activity) ของ prostaglandin H synthase ในรังไข่จะเพิ่มก่อนการสืบพันธุ์สุดท้าย (vitellogenesisll) (Sreenivasula Reddy *et al*., 2004) PGs ควบคุมการพัฒนาของรังไข่ (ovarian growth)ใน crayfish และกุ้งก้ามกราม แต่อย่างไรก็ตาม กลับไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง GSI กับ PGE_2 และ $PGF_{2\alpha}$ในกุ้งแชบ๊วย (Tahara and Yano, 2003; D'Croz *et al*., 1988)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ความเข้มข้นของ $PGF_{2\alpha}$ และ PGE_2 ในเลือดจะสูงที่ previtellogenic stage ovaries และค่อยๆ ลดลงเมื่อเข้าสู่ Maturation จึงสรุปว่า $PGF_{2\alpha}$ และ PGE_2 อาจกระตุ้น previtellogenesis และ vitellogenesis ในกุ้งแชบ๊วย (Tahara and Yano, 2003; D'Croz *et al*., 1988) ในกุ้งกุลาดำ Meunpol *et al*. (2010) สรุปว่า PGE_2 ไม่ได้มีบทบาทเพียงแต่เป็นตัวกระตุ้น vitellogenesis แต่ยังสามารถกระตุ้นทั้ง final maturation และ spawning เนื่องจากพบการสร้าง cortical rods ในไข่หลังบ่มด้วย PGE_2 นอกจากนั้นความเข้มข้นของ PGE_2 ของเลือดกุ้งกุลาดำก็มีระดับต่างจากกุ้งญี่ปุ่น คือ PGE_2 ในเลือดกุ้งกุลาดำจะต่ำในช่วงแรก แล้วขึ้นสูงเมื่อไข่แก่ขึ้นค่าของ PGE_2 ที่สูงขึ้นสอดคล้องกับปริมาณในรังไข่กุ้งของกรดอะราคิโดนิค ที่เป็นสารตั้งต้นของ PGE_2

นอกจากนี้ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของครัสตาเซียนเพศเมีย ยังพบบทบาทของฮอร์โมนในกลุ่มเซสควิเทอร์พีนอยด์ (Sesquiterpenoid) ชื่อเมทธิล ฟาร์นีโซเอท (Methyl farneso-ate; MF) โดยมีโครงสร้าง (Borst *et al*., 1987; Laufer *et al*., 1987) และหน้าที่คล้ายกับจูวีไนล์ฮอร์โมน (JH lll) ในแมลง (Laufer *et al*., 1987; 1987a; 1993; Borst and Laufer,1990) ผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ พบว่า MF มีผลต่อการเจริญของระบบสืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกราม (Sagi *et al*., 1991) กุ้งขาวแวนนาไม (Tsukimura and Kamemoto, 1991) ปู (*Libinia emarginata*) (Rotllant *et al*., 2000) ล็อบสเตอร์ (*Nephros norvegicus*) (Rotllant *et al*., 2001) และยังพบว่า ระดับของ MF มีความสัมพันธ์กับการเจริญพันธุ์ โดยสัตว์ที่เจริญพันธุ์แล้วมีระดับ MF สูงกว่าในสัตว์ที่ยังไม่เจริญพันธุ์ (Laufer *et al*.,1987; Sagi *et al*., 1993)

9. บทบาทของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในครัสตาเซียน

9.1. Vg gene

ครัสตาเซียนไวเทลโลจีนินเป็นโปรตีนตั้งต้นในสังเคราะห์สารไวเทลลินซึ่งเป็นโปรตีนโยล์คที่สำคัญ นอกจากนั้นโปรตีนโยล์คในไข่ยัง ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุ และวิตามิน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของเอมบริโอและตัวอ่อนของครัสตาเซียน ในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน และรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม น้ำหนัก ประมาณ 31 กรัม อายุประมาณ 11 เดือน Parnes *et al*. (2006) ได้ค้นพบครั้งแรกในลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (Full-length) ของดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA หรือ cDNA) ของ Vg gene ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์โดยวิธีการโคลนผ่านการสืบค้นร่วมกับการใช้วิธี 5' Rapid Amplification

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cDNA Ends (RACE) PCR พบว่า Full-length ของ cDNA ของ Vg mRNA มีความยาว 7970 คู่เบส ประกอบด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (Untranslated region; UTR) ทาง ด้าน 5' และ 3' มีความยาวเท่ากับ 29 และ151 คู่เบส ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีน (open reading frame; ORF) มีความยาวเท่ากับ 6689 คู่เบส คิดเป็นสายเปปไทด์ของกรดอะมิโนความยาว 3511 Residues

นอกจากนั้นยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Vg cDNA ในกุ้งขาวแวนนาไม มีความคล้ายบางส่วนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Vg gene ในกุ้งแชบ๊วยโดย Phiriyangkul and Utarabhand (2006) ได้ทำการโคลน cDNA ของไวเทลโลจีนิน ในกุ้งแชบ๊วยโดยอาศัยข้อมูลจากลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของหน่วยย่อยหลัก 78 และ 87 กิโลดาลตัน และส่วนอนุรักษ์ของไวเทลโลจีนินจากครัสตาเชียนชนิดอื่น ๆ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Vg cDNA ได้จากการศึกษาโดยวิธี walking RT-PCR และ RACE (rapid amplification of cDNA ends) ได้เพิ่มปริมาณและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้น open reading frame (ส่วนที่สังเคราะห์โปรตีน) จากรังไข่เพื่อยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg cDNA พบว่า มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg cDNA ที่ได้จากการทำ walking RT-PCR และ RACE 99 เปอร์เซ็นต์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Vg cDNA ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 7961 ตัว open reading frame ประกอบด้วยส่วนที่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน 2586 ตัว มีลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ ที่สามารถถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ subtilisin 7 ตำแหน่ง (R-X-[K/R]-R หรือ R-X-X-R) เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของไวเทลลินที่ได้จากการแปลงรหัสมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ (deduced amino acid sequence) พบว่า มีความใกล้เคียงกันมากเมื่อเทียบกับของไวเทลลินบริสุทธิ์ในปัจจุบัน ลำดับกรดอะมิโนของไวเทลโลจีนินของกุ้งแชบ๊วยเหมือนกับของกุ้งกุลาลายมากที่สุด (91.4 เปอร์เซ็นต์) และมีความใกล้เคียงกับไวเทลโลจีนินในกุ้งขาวแวนนาไม (89 เปอร์เซ็นต์)

ในรายงานการศึกษาของ ประภาพร (2006) ได้ทำการสกัดสารไวเทลลินบริสุทธิ์จากรังไข่ของกุ้งแชบ๊วยด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Superdex 200 จากนั้นทำการวิเคราะห์โดยโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเทรชัน พบว่า ไวเทลลินบริสุทธิ์ มีมวลโมเลกุล 398 kDa ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า การแสดงออกของ Vg gene ทั้งในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนและรังไข่ของแม่กุ้ง แต่ไม่พบในเนื้อเยื่ออื่นของแม่กุ้งหรือในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งเพศผู้ ผลวิจัยชี้ให้ เห็นว่ากุ้งแชบ๊วยมีการแสดงออกของ Vg gene เฉพาะในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน และรังไข่ ซึ่งนั้นหมายถึง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทั้งในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด เป็นแหล่งสังเคราะห์ไวเทลโลจีนินซึ่งทำหน้าที่เป็นโปรตีนตั้งต้นในการสังเคราะห์สารไวเทลลินซึ่งเป็นโปรตีนโยล์คที่สำคัญของตัวอ่อนสัตว์น้ำ

นอกจากนั้นยังได้ทำการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของ Vg gene ด้วยวิธี real-time PCR พบว่า Vg gene มีระดับต่ำในระยะก่อนการสะสมไวเทลลินและมีระดับเพิ่มขึ้นจนสูงสุดในรังไข่ในช่วงเริ่มการสะสมไวเทลลิน หรือสูงสุดในตับในช่วงการสะสมไวเทลลิน ก่อนระดับ Vg gene ลดลงเมื่อไข่เจริญพันธุ์ มีการแสดงออกของ Vg gene ในรังไข่สูงกว่าในตับมากตลอดช่วงพัฒนาการเจริญพันธุ์ทุกระยะ จากนั้นผลการวิเคราะห์โพรบ cDNA ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า ฮอร์โมน E_2 และ 17α-OHP_4 มีผลต่อการแสดงออกของ Vg gene ในตับและตับอ่อนและรังไข่ไม่เหมือนกัน ฮอร์โมน MF มีผลต่อการแสดงออกของ Vg gene ทั้งในเนื้อ เยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ในขณะที่ 20-hydroxy ecdysone ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ Vg gene ในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด

9.2. FAMeT gene

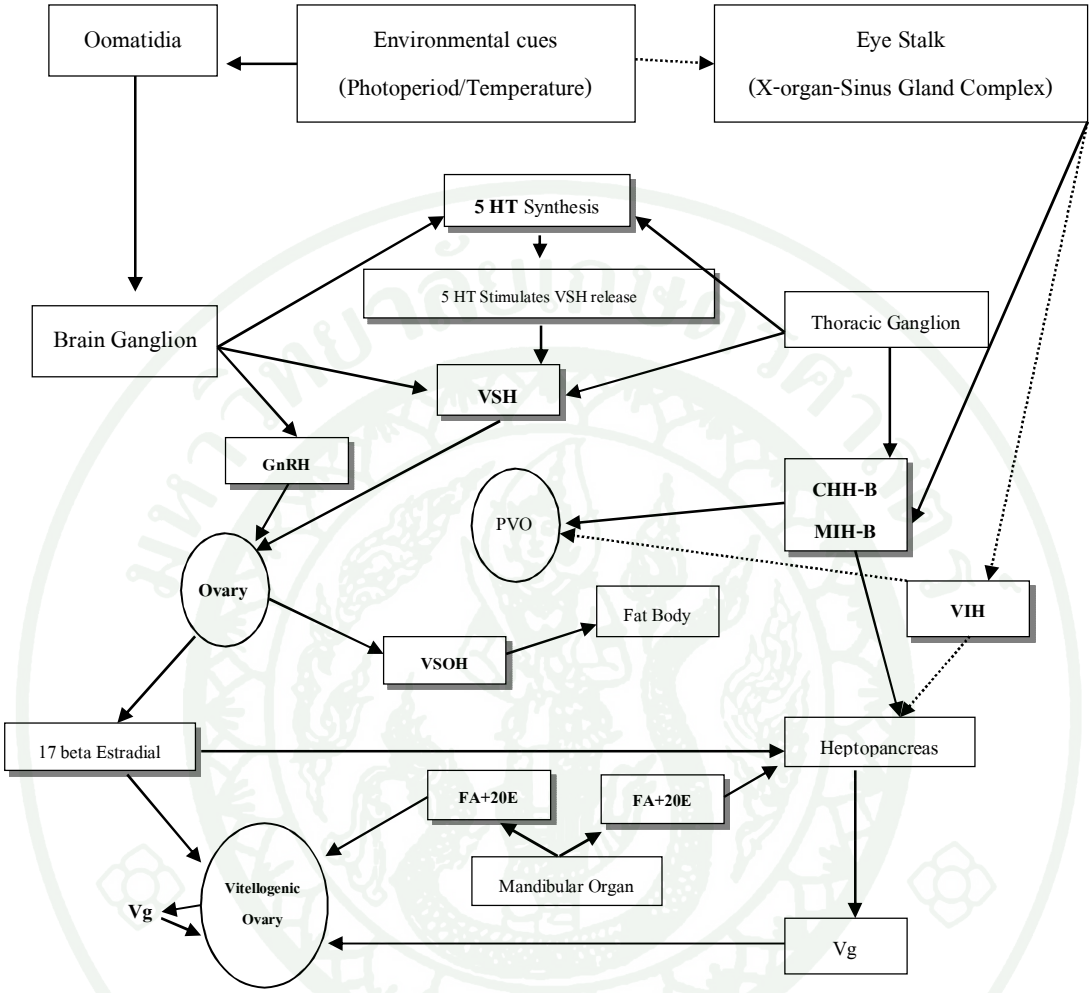
FAMeT gene คือ ยีนที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ ชื่อว่า Farnesoic acid O-methyltransferase ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน MF เมธิลฟาเนโซเอต เอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดฟาร์นีโซอิกให้กลายเป็นฮอร์โมน MF เป็นผลิต ภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนสังเคราะห์ฮอร์โมน MF (Wainwright *et al*., 1998; Silva Gunawardene *et al*., 2002) Wainwright *et al*. (1998) สรุปว่า ในครัสเตเชียนการสังเคราะห์ฮอร์โมน MF นั้น เอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิดโอ-เมทธิล ทรานเฟอร์เรสจะทำหน้าที่ร่วมกับ เอ็นไซม์แอส อะดีโนซิล แอล เมทไทโอนีน (S-adenosyl-L-methionine) ในการขนส่งหมู่เมธิลให้แก่สารตั้งต้นเพื่อปฏิบัติการสังเคราะห์ฮอร์โมน MF

ในรายงานการศึกษาของ Buaklin *et al*. (2008) กล่าวว่า MF มีโครง สร้างคล้ายกับจูวีไนล์ฮอร์โมนในแมลงและมีความเกี่ยวข้องกับพัฒนาการและการสืบพันธุ์ของสัตว์ในครัสตเชียน โดยเอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิดโอ-เมทธิลทรานเฟอร์เรส ทำหน้าที่เปลี่ยนกรดฟาเนโซอิคให้เป็นฮอร์โมน MF ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน MF ซึ่งในการศึกษาได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่สมบูรณ์ของเอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิด โอ-เมทธิล ทรานเฟอร์เรสในกุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี RACE-PCR ชี้ให้เห็นว่า เอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิดโอ-เมทธิล ทรานเฟอร์เรส จำนวน 2 รูปแบบ คือ เอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิด โอเมทธิล ทรานเฟอร์เรส แบบยาว (FAMeT-l) มีขนาด 1312 คู่เบส โดยจัดเป็นส่วน ORF ยาว 843 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความยาว 280

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดอะมิโน ส่วนเอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิกเอซิดโอ-เมท ธิลทรานเฟอร์เรส แบบสั้น (FAMeT-s) มีขนาด 1297 คู่เบส โดยจัดเป็นส่วน ORF ยาว 828 คู่เบส ซึ่งแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความยาว 275 กรดอะมิโน โดยเอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิดโอ-เมทธิล ทรานเฟอร์เรส ทั้งสองรูป แบบมีความแตกต่างจาก Indel ที่แปลรหัสเป็น EGRGS โดยโปรตีน FAMeT มี CF โดเมน จำนวน 2 โดเมน จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quan-titative RT-PCR แสดงว่า ระดับการแสดงออกของยีน FAMeT-l และเอ็นไซม์ฟาร์นีโซอิก เอซิด โอ-เมทธิล ทรานเฟอร์เรส ทั้งหมดในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการพัฒนาไข่ระยะที่ III และ IV ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างนัยสำคัญในแม่กุ้งที่ตัดตา ($P > 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 แผนผังการควบคุมกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสในครัสตาเซียน

ที่มา: Subramoniam (2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ด้านการเลี้ยงกุ้งทดลอง

1.1 กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) น้ำหนักประมาณ 35-40 กรัม

1.2 อาหารพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเลสำเร็จรูป

1.3 อาหารธรรมชาติสด ได้แก่ หอยตะโกรม (*crassostrea belcheri*) แม่เพรียงทราย (*Perineries* sp.) และหมึกกล้วย (*Loligo* sp.)

1.4 บ่อดินขนาด 100 ตารางเมตร

1.5 เครื่องชั่งวัดทศนิยม 2 ตำแหน่ง

2. ด้านวิธีเรดิโออิมมูโน แอสเสย์

สารเคมี

2.1 Ethelenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (Sigma)

2.2 Diethyl ether (Labscan Asia)

2.3 Toluene (Labscan Asia)

2.4 P-Terphynyl (pTP) [0.01%1,4-bis-214 Methyl-5-Phenyloxyzolyl-Benzole] (Labscan Asia)

2.5 Ice-cold dextran-coated charcoal (Labscan Asia)

ชุด Kit สำเร็จรูป

2.6 Progesterone, [1,2,6,7-^{3}H Progesterone], RIA Kits (Amersham)

2.7 Estradiol, [1,2,6,7,16,17-^{3}H], RIA Kits (Amersham)

2.8 Standard estradiol 17α (Merck)

2.9 Standard Progesterone (Merck)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์

2.10 เครื่องตรวจวัดปริมาณสารรังสี Liquid Scintillation Counter (LSC) ยี่ห้อ Winspectral รุ่น1414 (Winspectral)

2.11 เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร (NIPRO)

2.12 ตู้อบ 105 องศาเซลเซียส (Memmert)

2.13 เครื่อง Vacuum dried drying (Memmert)

2.14 ออโตไมโครปิเปต ขนาด 10 100 200 500 และ 1000 ไมโครลิตร (Bio-Rad)

3. ด้านวิธีโคเมท แอสเสย์

สารเคมี

3.1 Ethyl alcohol (Labscan Asia)

3.2 Triton X-100 (Sigma)

3.3 Tris (Tris [hydroxymethyl] aminomethane) (Sigma)

3.4 Low melting point Agarose; LMA (Promega)

3.5 Dimethylsulfoxide; DMSO (Sigma)

3.6 Sodiumlauroylsarcosinate; SLS (Sigma)

3.7 Ethelenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (Sigma)

3.8 Trypan blue Solution (Sigma)

อุปกรณ์

3.9 กล้องจุลทรรศน์ชนิด Inverted (Olympus รุ่น CKX41, Japan) และระบบถ่ายภาพ

3.10 ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Thermo Minicell รุ่น EC320)

3.11 Hemacytometer (BOECO)

3.12 ชุดอิเล็คโทรโฟรีซิส ประกอบด้วย power supply และ electrophoresis chamber

3.13 กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope) (NIKON)

3.14 กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง (Light microscope) (OLYMPUS)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.15 เครื่องผสมสาร (Vortex-2 Genic, Scientific Industries)

3.16 แท่งบดเนื้อเยื่อ (Nature)

4. สำหรับงานทางอณูชีวโมเลกุล

สารเคมี

4.1 100 mMdNTP (Ward Medic)

4.2 5-bromo-4-cholo-3-indoyl-β-D-galactopyranoside; X-gal (Sigma)

4.3 Absolute ethanol; C_2H_5OH (Labscan)

4.4 Absolute isopropanol (Labscan)

4.5 Agarose (Conda)

4.6 Amphicillin sodium salt (Bio Basic INC.)

4.7 Boric acid; H_3BO_3 (Merck)

4.8 Chloroform; CHC_{l3} (Labscan Asia)

4.9 Diethyl pyrocarbonate (DEPC); $C_6H_{10}O_5$ (Sigma)

4.10 Ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt (Sigma)

4.11 Ethidium bromide (EtBr)

4.12 GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 mg (Ward Medic)

4.13 Isopropyl-β-D-thiogalactoside; IPTG (Sigma)

4.14 Magnesium chloride; MgC_{l2} (Labscan Asia)

4.15 Oligonucleotide M13 primer (Promega)

4.16 Sodium chloride; NaCl (Merck)

4.17 Sterile distilled water; dH_2O

4.18 Tris-base; Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Sigma)

4.19 TRIZOL reagent (Molecular Research Center)

ชุด Kit สำเร็จรูป

4.20 An ImProm-II™ Reverse transcription kit (Promega)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.21 QIAquick gel extraction kit (QIAGEN)

4.22 QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden)

4.23 pGEM-T easy vector (Promega)

4.24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Gene specific primer (Pacsicien)

เอนไซม์เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes) และ Vector

4.25 *Taq* DNA polymerase (Fermentas)

4.26 (0.5U) DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes)

4.27 (1U) DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Finnzymes)

4.28 pGEM-T Easy vector (Promega)

4.29 *Eco* RI (Fermentas)

สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

4.30 *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109

สารเคมีและอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

4.31 Agar bacteriological (Agar no.1) (Oxoid)

4.32 Sodium chloride; NaCl (Merck)

4.33 Bactotrypetone (Oxoid)

4.34 Yeast extract (Oxoid)

4.35 Super Optimal Culture medium (SOC medium) (Oxoid)

4.36 Luria Bertani broth (LB broth) และ Luria Bertani agar (LB agar) (Oxoid)

4.37 Tryptic Soy broth (TSB) และ Tryptic Soy agar (Oxoid)

อุปกรณ์

4.38 อ่างต้มน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Memmert)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.39 เครื่อง Incubator (Shaker Bath SBS 30) (Memmert)

4.40 เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด ยี่ห้อ Precisa รุ่น 240 A (England)

4.41 เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Metrohm (Memmert)

4.42 เครื่อง Magnetic Starrier รุ่น MS 115 (JAPAN)

4.43 ตู้ทำความเย็น -4 -30 และ-80 องศาเซลเซียสยี่ห้อ SANYO (JAPAN)

4.44 เครื่องปั่นเหวี่ยง -4 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Sartorius รุ่น SIGMA 3-16K (JAPAN)

4.45 ชุดเจลอิเล็คโตรโฟรีซีส (Bio-Rad)

4.46 โปรแกรม BLASTN

4.47 โปรแกรม SynGene (GeneTools - File version: 4.02.00)

4.48 ชุดอุปกรณ์ Gel imaging for fluorescence and chemiluminescence (G: BOX Chemi)

4.49 เครื่อง PCR thermal cycler รุ่น GeneAmp PCR System 9700 (Hybraid Limited)

4.50 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Model Genesys 10 series, Thermo Spectronic)

5. สำหรับงานทางด้าน RP-HPLC

สารเคมี

5.1 Prostaglandin $F_{2\alpha}$; $PGF_{2\alpha}$ (Cayman)

5.2 Acetonitrile; CH_3CN (Labscan Asia)

5.3 HPLC Water (Labscan Asia)

อุปกรณ์

5.4 เครื่อง Reversed-phase high-performance liquid chromatography; RP-HPLC (Alltech)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การศึกษาครั้งนี้ ประกอบด้วย 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของความเค็มต่อระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย ซึ่งมีพัฒนาการของเซลล์ไข่และรังไข่ในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

คัดเลือกกุ้งขาวแวนนาไมทั้งเพศผู้และเพศเมีย ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่เป็นแผลตามลำตัว อายุ 4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 40 กรัม ความยาว 15.5 เซนติเมตร จำนวน 400 ตัว จากบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้ง ณ ศูนย์เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดฉะเชิงเทรา โดยกุ้งเพศเมียที่ใช้เริ่มต้นการทดลองเป็นกุ้งที่มีพัฒนาการของเซลล์ไข่และรังไข่ในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ เช่นเดียวกับกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ทำการคัดเลือกเฉพาะกุ้งที่มีพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ช่วงต้น เมื่อได้กุ้งครบจำนวนนำกุ้งทดลองปล่อยลงเลี้ยงในบ่อทดลอง ศูนย์เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นบ่อดินขนาด 100 ตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ (บ่อแรกมีความเค็มน้ำ เท่ากับ 15 ppt ส่วนบ่อที่สองมีความเค็มน้ำ 30 ppt) ในแต่ละบ่อกั้นเป็นคอกด้วยอวนมุ้งสีฟ้าตาห่าง แบ่งออกเป็น 2 คอก ขนาดพื้นที่คอกละ 25 ตารางเมตร จำนวน 2 คอก (2 ซ้ำ) ปล่อยกุ้งทดลองในแต่ละคอกที่อัตราความหนาแน่น 4 ตัวต่อตารางเมตร ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 1:1 ภายในบ่อจะเดินระบบท่อลมให้อากาศวางเป็นแนวที่พื้นบ่อ โดยใช้เครื่องอัดอากาศขับเคลื่อนด้วยมอเตอร์ไฟฟ้า ขนาด 2 แรงม้า โดยในระหว่างการทดลองจะให้อากาศตลอดเวลา ตลอดระยะเวลาการทดลองควบคุมระดับน้ำในบ่อสูงเฉลี่ย 1.25 เมตร และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ต่อเดือน

2. การออกแบบการทดลอง

วางแผนการทดลองเพื่อเปรียบเทียบระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของกุ้งทดลองสองกลุ่มที่เป็นอสิระกัน (t-test for independent samples) แบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 2 กลุ่มๆ 2 ซ้ำ ใช้พ่อแม่กุ้งขาว จำนวน 50 คู่/ซ้ำ ทดลองนาน 4 เดือน ณ ศูนย์เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัดฉะเชิงเทรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลุ่มที่ 1 การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
กลุ่มที่ 2 การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน

3. อาหารและการให้อาหาร

ในช่วงสองเดือนแรกของการทดลองให้กุ้งทดลองกินอาหารเม็ดสำเร็จรูปกุ้งทะเลทั่วไป เบอร์ 4 เพียงอย่างเดียว วันละ 2 ครั้ง สอง ช่วงเวลา คือ 8.00 น. และ15.00 น. ที่อัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน และในช่วงสองเดือนสุดท้ายของการทดลอง เสริมด้วยอาหารธรรมชาติสดในสัดส่วนเนื้อหอยตะโกรมต่อเนื้อหมึกกล้วย เท่ากับ 1:1 วันละ 2 ครั้ง ช่วงเวลา 10.00 น. และ 18.00 น. ที่อัตรา 7 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน เฉพาะกุ้งทดลองเพศเมียทุกๆ 30 วัน จะทำการสุ่มตัวอย่าง 1 ครั้ง ๆ ละ 5 ตัวต่อซ้ำ เพื่อชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และเก็บตัวอย่างน้ำเลือด เพื่อตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนสืบพันธุ์ จำนวน 3 ชนิด และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อน เพื่อทำการวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงของยีนสืบพันธุ์ จำนวน 3 ชนิด

4. การเตรียมตัวอย่าง

ทำการสุ่มคัดเลือกกุ้งทดลองเพศเมีย จำนวน 5 ตัวต่อซ้ำ โดยเริ่มต้นตั้งแต่วันที่ 0 30 60 90 และ120 วัน ในแต่ละครั้งของการเก็บตัวอย่าง กุ้งทั้งหมดจะถูกขนย้ายกุ้งมายังห้องปฏิบัติการ ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พักกุ้งทดลองในบ่อซีเมนต์ ขนาด 1 ตัน ซึ่งมีระบบน้ำและอากาศหมุนเวียนต่อเนื่องตลอด เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ต่อมานำกุ้งมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว ก่อนเก็บตัวอย่างน้ำเลือด โดยดูดน้ำเลือดตรงตำแหน่งของแอ่งเลือดที่อยู่บริเวณอกที่ปล้องท้องปล้องที่ 1 โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G และกระบอกฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (0.1% Na_2EDTA, W/V) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ดูดน้ำเลือดผสมเข้ากับสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดให้ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงทันทีในหลอดเก็บตัวอย่าง เก็บในตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส เพื่อดำเนินการสกัดฮอร์โมน ในขณะที่ซากกุ้งสดทั้งตัวจะทำการ dissect บนน้ำแข็งทันที เพื่อทำการคัดแยกเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อน มาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาค่า GSI เสร็จแล้วแยกเก็บเนื้อเยื่อทั้งสองชนิด ตัวอย่างละ 0.5 กรัม ในหลอดเก็บตัวอย่าง ขนาด 2 มิลลิลิตร แช่ทันทีลงในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 30 นาที เพื่อรักษาคุณภาพดีเอ็นเอ จากนั้นนำออกจากไนโตรเจนเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อคัดแยกใส่กล้องเก็บตัวอย่างทันที เก็บในตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส กระทั่งทำการสกัด Total mRNA

5. การศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGE_2\alpha$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

5.1 การสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งสำหรับวิเคราะห์ฮอร์โมน P_4 และ E_2

นำตัวอย่างน้ำเลือดกุ้ง (ข้อ4) ออกจากตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส ทำการละลายน้ำเลือดในหลอดเก็บตัวอย่างด้วยมือ (thawed) แล้วปิเปตตัวอย่างน้ำเลือด ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดสกัดตัวอย่างเติมสารละลาย Diethyl Ether เย็น (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันที่อุณหภูมิห้อง นาน 1.5 นาที จากนั้นนำไปแช่ทันทีที่ -70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กระทั่งเกิดการแยกชั้นระหว่างของเหลวส่วนใสด้านบนและเนื้อเยื่อขาวขุ่นด้านล่างก้นแก้ว แล้วเทเฉพาะส่วนใสด้านบนลงในขวดเก็บสารสกัด ทำให้แห้งในเครื่อง vacuum dried drying ภายใต้ความดัน 600 บาร์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างสารสกัดแห้งสนิทจึงทำการแทนที่แก๊สออกซิเจนที่อยู่ในขวดเก็บสารสกัดด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดฝาขวดตัวอย่างทันที เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนของ P_4 และ E_2 ตามวิธีดำเนินการในข้อ 4.5 (Kamonpatana *et al*., 1979) ต่อไป (ภาพที่ 7)

5.2 การสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งสำหรับวิเคราะห์ฮอร์โมน $PGE_2\alpha$

นำตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งออกจากตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส (ข้อ4) จากนั้นทำการละลายน้ำเลือดในหลอดเก็บตัวอย่างด้วยมือกระทั่งน้ำเลือดกุ้งละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของเหลว ปิเปตตัวอย่างน้ำเลือด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดสกัดตัวอย่าง เติมสารละลายที่ใช้สกัด (เอทานอล ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับกรดอะซิติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 3-5 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที จากนั้นจึงปิเปตเฉพาะน้ำตัวอย่างส่วนใสด้านบนลงในคอลัมน์ C_{18}SPE ล้างด้วยน้ำกลั้น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลายเฮกเซน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ตามลำดับ เสร็จแล้วทำการเก็บ (elute) สารสกัด $PGE_2\alpha$ ด้วยสารละลายเอธิลอะซิเตตเก็บในขวดไวแอลสีชา ขั้นตอนสุดท้ายทำให้แห้งในเครื่อง vacuum dried drying ภายใต้ความดัน 600 บาร์ นาน 2 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างสาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สกัดแห้งสนิทต่อมาทำการแทนที่แก๊สออกซิเจนที่อยู่ในขวดไวแอลสีชาด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วปิดฝาขวดตัวอย่างทันทีเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เพื่อวัดปริมาณความเข้มข้นฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ตามวิธีดำเนินการ ใน ข้อ 5.7 ต่อไป (ภาพที่ 9)

5.3 การสร้างสมการมาตราฐานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$

ทำการปิเปตสารละลายเมทานอลลงในขวดฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ สังเคราะห์ให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐานให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0 5 10 20 40 และ70 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยการปิเปตสารละลาย $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน ปริมาตร 0 5 10 20 40 และ 70 ไมโครลิตร ลงในหลอดวิเคราะห์ จำนวน 6 ขวด จากนั้นใช้สารละลายเมทานอลปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ เท่ากับ 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากัน นาน 2 นาที กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.5 ไมโครอน ต่อมาใช้ injection syringes ดูดสารสารละลายฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่าน C_{18} คอลัมน์ RP-HPLC ขนาด 4.8 x 150 มิลลิเมตร โดยมี mobile phase (solvent) เป็นสารละลายอะซีโตไนตรัล (CH_3CN) ความเข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ แล้วปรับพีเอชให้ mobile phase เป็นกรด (PH 2.8) โดยใช้สารละลายฟอสฟอริคเอซิด (phosphoric acid, 85% v:v) ปรับให้อัตราการไหลของ mobile phase เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านเครื่องวัด spectophometer ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร ขั้นตอนสุดท้ายนำผลที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ภายใต้ข้อกำหนด คือ ให้แกน X คือ พื้นที่ใต้กราฟของแต่ละความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน ซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในเครื่อง HPLC ส่วนแกน Y คือ ความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน เท่ากับ 0 5 10 20 40 และ 70 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4 การตรวจวัดระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

ใช้วิธี RIA โดยทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ RIAในโครงการการใช้นิเคลียร์ฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งวิธีการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของ P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งทดลอง แบ่งการตรวจวัดออกเป็น 2 ขั้นตอน (Kamonpatana *et al*., 1976 and 1980; วรรณวิภา, 2537) ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 แยกฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ออกจากตัวอย่างน้ำเลือด มีดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ปิเปตตัวอย่างตัวอย่างน้ำเลือด ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 20 x175 มิลลิลิลิตร ตัวอย่างละ 1 หลอด

2. ปิเปตตัวอย่างน้ำเลือดความคุมคุณภาพ ทำตัวอย่างละ 3 หลอด ดังนี้

(1) หลอด จ. ตัวอย่างน้ำเลือดที่มีระดับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐาน 5 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(2) หลอด ฉ. ตัวอย่างน้ำเลือดที่มีระดับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐาน 10 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร

(3) หลอด ช. ตัวอย่างน้ำเลือดที่มีระดับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐาน 25 พิโครกรัมต่อมิลลิตร หลอด blank ใช้ฟอสเฟสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทน ตัวอย่างน้ำเลือด

3. เติมไดเอทธิล ฮีเธอร์ ลงในทุกหลอด หลอดละ12 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่า ความ เร็วรอบ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

4. นำไปทำให้เย็นจนส่วนตัวอย่างน้ำเลือดแข็งแห้ง แล้วแยกส่วนน้ำใส ใสลงในขวดขนาด 20 มิลลิลิตร

5. ระเหยไดเอทธิล อีเธอร์ ด้วยเครื่องทำให้แห้งด้วยสูญญากาศ

6. เขย่าจนฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ที่แห้งติดขวดละลายในบัฟเฟอร์ เพื่อไปทำการทดลองขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 การวิเคราะห์ผลฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้ง มีดังนี้

1. ปิเปตสารละลายจากขั้นตอนที่ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 12x175 มิลลิลิตร โดยทำตัวอย่างละ 2 หลอด ในขณะที่ตัวอย่างน้ำเลือดควบคุมภาพ และ blank ทำตัวอย่างละ 4 หลอด

2. ปิเปตสารละลายฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0 0.625 1.25 2.5 5 10 25 50 100 250 และ 500 พิโครกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร และหลอดศูนย์ ที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) แอนติบอดีลงในหลอดทดลอง ข้อ 8 ปริมาตร หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอด ยกเว้นหลอดศูนย์ เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แทน เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. เติมสารละลายฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ติดสลากสารกัมมันตรังสีตริเตียมลงในหลอดข้อ 9 ปริมาตร หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร ทุกหลอด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กว่า 18 ชั่วโมง ครบกำหนดเวลาจึงเติมสารละลายถ่านดูดซับที่กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 องศาเซล-เซียล ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดที่แช่ในอ่างน้ำแข็งพร้อมผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. ปิเปตเฉพาะน้ำส่วนใสด้านบนลงในขวดสำหรับวัดปริมาณรังสีเบต้าจากนั้นเติมสารก่อประกายรังสี ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ทุกขวดบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยว่า 10 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดปริมาณรังสีเบต้าด้วยเครื่องวัดรังสีเบต้าผลที่ได้จะเป็นจำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที ต่อมาจึงนำค่าที่ได้มาหาความเข้มข้นเทียบจากกราฟระดับ (P_4 หรือ E_2) มาตรฐานเป็นนาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

5.5 การหาฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) แอนติบอดี ความเข้มข้นที่เหมาะสม

ปิเปตฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) แอนติบอดี ความเข้มข้น 1:5,000 1:10,000 1:20,000 1:40,000 1:80,000 1:160,000 1:320,000 และ1:640,000 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร และฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ติดสลากสารกัมมันตรังสีตริเตียม ความแรง 10,000 จำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาทีต่อ 0.1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่ต่ำกว่า 18 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาได้สมบูรณ์ จากนั้นนำมาแยกส่วนที่เกาะเกี่ยวออกจากสารอิสระตามขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว นำค่าที่ทำการตรวจวัดระดับรังสีเบต้ามาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ และเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้ม และเปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ การวิเคราะห์ คือ ค่าความเข้มข้นที่มีเปอร์เซ็นต์ การเกาะเกี่ยวสมบูรณ์ เท่ากับ 50 เท่ากับ 1:150,000 (Kamonpatana *et al*., 1976 and 1980; วรรณวิภา, 2537)

5.6 การหาปริมาณสารก่อประกายแสง (scintillation) และเวลาที่เหมาะสมก่อนนำตัวอย่างเข้าเครื่องทำการตรวจวัดปริมาณรังสีเบต้า

ปิเปตฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ติดสลากกัมมันตรังสีตริเตียม ความแรง 4,249 จำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที (cpm) ต่อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเติมสารก่อประกายรังสี ปริมาตร 3.0 4.0 และ 5.0 มิลลิตร ตามลำดับ โดยทำตัวอย่างละ 3 ขวด และกระทำเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 เป็น 0.5 0.6 0.7 และ 0.8 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดปริมาตรรังสีเบต้า นำค่าจำนวนนับปริมาณรังสีต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และปริมาตรฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 มาเขียนกราฟที่ทำการวัดเมื่อชั่วโมงที่ 3 และชั่วโมงที่ 10 การทดสอบความขนานกันระหว่างฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ในตัวอย่างน้ำเลือด และฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐาน นำตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งมาเจือจากที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน แล้วนำมาตรวจวัดระดับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) และเขียนกราฟเปรียบเทียบกับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐานฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) ในน้ำเลือดมีความขนานกับฮอร์โมน (P_4 หรือ E_2) มาตรฐาน โดยกราฟที่ได้จะขนานกันไป (ภาพที่15) (Kamonpatana *et al*., 1976, 1980; วรรณวิภา, 2537)

5.7 การวัดปริมาณความเข้มข้นฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RT-HPLC

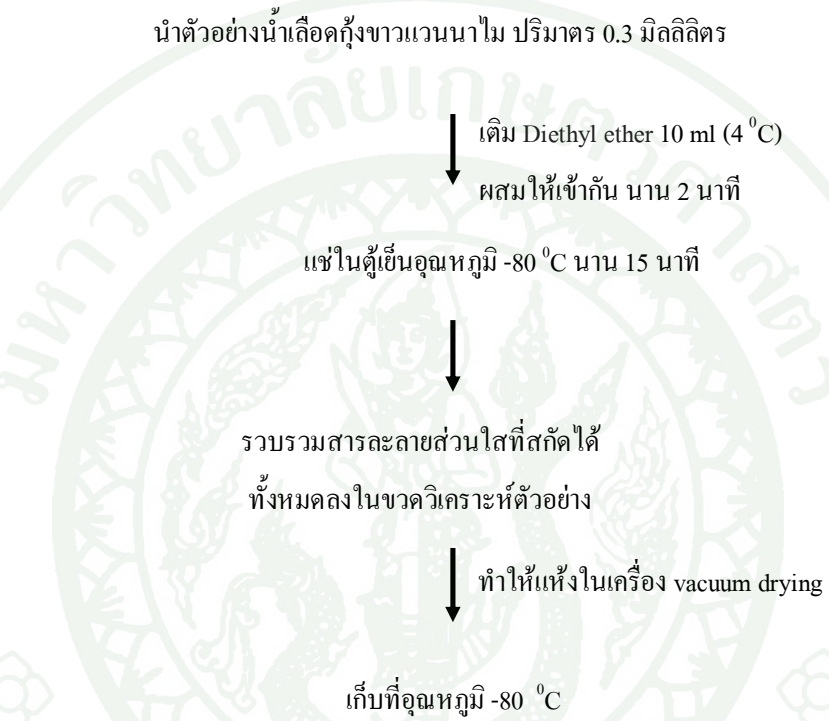
นำตัวอย่างสารสกัดฮอร์โมน $PGE_{2\alpha}$ แห้งออกจากตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ตามข้อ 4.2 มาละลายด้วยสารละลายเมทานอล ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ แล้วกรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.5 ไมโครอน ต่อมาใช้ injection syringes ดูดสารสกัด ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดผ่าน C_{18} คอลัมน์ RP-HPLC ขนาด 4.8 x 150 มิลลิเมตร โดยมี mobile phase เป็น 32 เปอร์เซ็นต์ สารละลายอะซีโตไนตรัล (CH_3CN) แล้วปรับพีเอชให้เป็นกรด (PH 2.8) ด้วยกรดฟอสฟอริคเอซิด (phosphoric acid, 85% v:v) อัตราการไหล (flow rate time) เท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านเครื่อง วัด spectophometer ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร นำผลที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGE_{2\alpha}$ (ภาพที่ 10)

5.8 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay เป็นการตรวจสอบหาปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดกุ้งทดลองที่ใช้วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนสืบพันธุ์ทั้งสามชนิดข้างต้น เริ่มด้วยการเตรียมสารละลายมาตรฐาน โดยใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) Standards น้ำหนัก 0.001 มิลลิกรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 มิลลิลิตร ด้วย distilled water ผสมเข้ากันที่อุณหภูมิห้อง ต่อมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 0.05 0.06 0.08 0.2 0.4 และ0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วคำนวณออกมาเป็นหน่วยไมโครลิตร (0.05 x 1000 =50 µl) ต่อมาเตรียม dye reagent (distilled water:dye reagent; 4:1) โดยทำการชั่งตัวอย่างน้ำเลือดหนัก 0.01 กรัม ละลายใน distilled water ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร+distilled water 990 มิลลิลิตร = 1000 ไมโครลิตร เจือจาง 100 ไมโครลิตร เท่ากับ 100 ไมโครลิตร+distilled water 900 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เติม blank (distilled water) 10 ไมโครลิตรต่อสารละลายมาตรฐาน 10 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ทำ 2 ซ้ำ เติม dye reagent 200 ไมโครลิตร ทุกช่อง ทิ้งไว้ 5-60 นาที แล้ววิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง spectrometer wave length 595 นาโนเมตร



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมสำหรับตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ด้วยวิธี RIA (Kamonpatana *et al*., 1976 and 1980; วรรณวิภา, 2537)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำสารสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

↓ เติม Phosphate buffer solution จำนวน 100 µl
ผสมเข้ากัน นาน 2 นาที

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C ประมาณ 12 ชั่วโมง

↓ เติม specific antibody จำนวน 100 µl

บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที

↓ เติม labeled antigen จำนวน 100 µl

บ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C อย่างน้อย 12-18 ชั่วโมง

↓ เติม charcoal suspension จำนวน 200 µl
บ่มที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C นาน 20 นาที

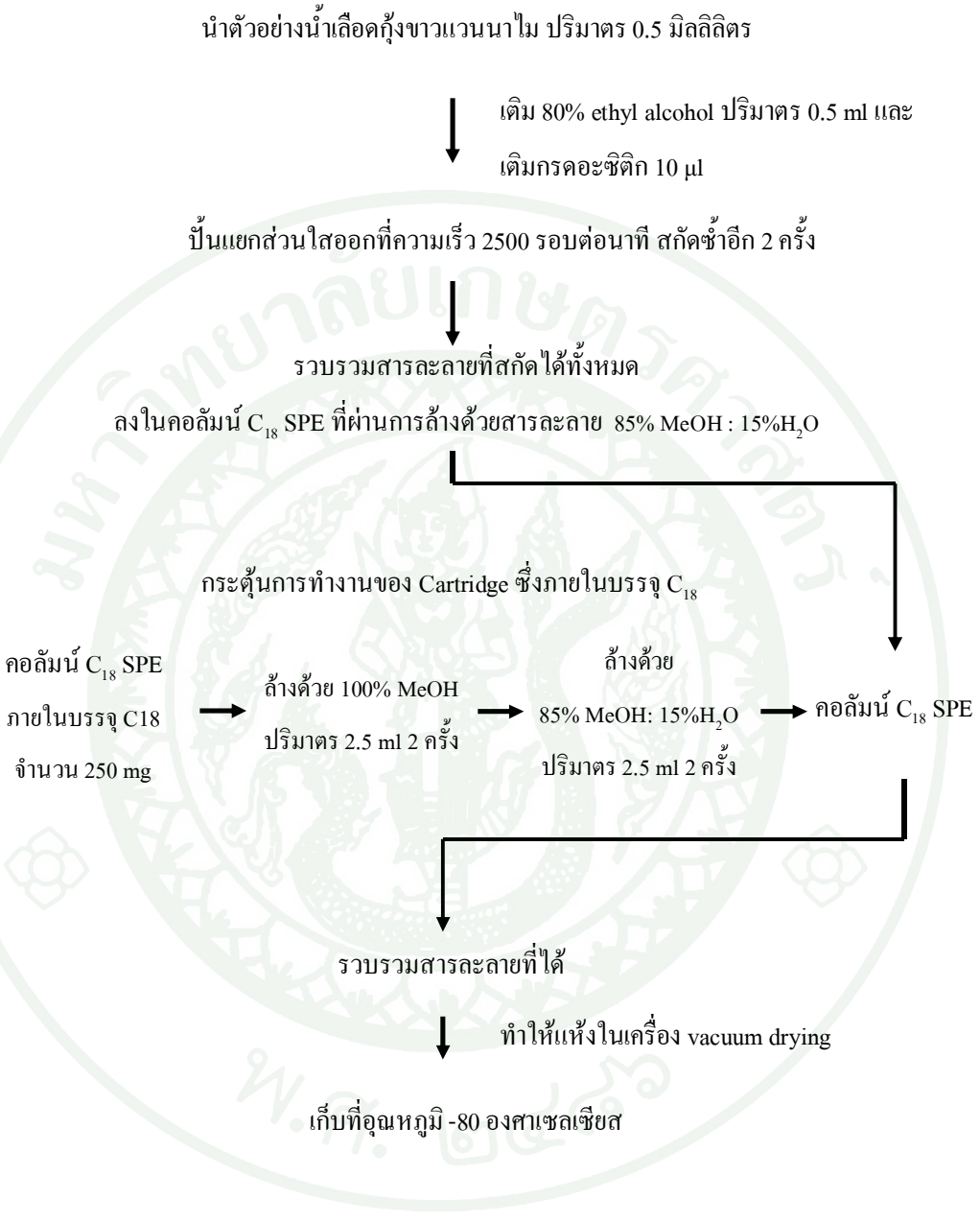
แยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแยกที่อุณหภูมิ 15 ^{0}C 3,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที
เก็บส่วนใสด้านบนลงใน assay tubes ขวดใหม่

↓ เติม Scintillation solution จำนวน 4 ml
บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง

วัดปริมาณความเข้มข้นของ unlabeled antigen โดยเครื่อง Liquid Scintillation Counter

ภาพที่ 8 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี RIA (Kamonpatana *et al*., 1976 and 1980; วรรณวิภา, 2537)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมสำหรับตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำสารสกัดตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

↓ เติม MeOH ปริมาตร 300 µl
ผสมให้เข้ากัน นาน 5 นาที

กรองผ่านกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร

↓

รวบรวมสารละลายที่สกัดได้ทั้งหมด
ลงใน assay tube ใหม่

↓

ฉีดผ่าน C18 คอลัมน์ RP-HPLC โดยมี Mobile phase เป็น 32% CH_3CN อัตราการไหล 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านเครื่องวัด Spectophometer ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร

↓

คำนวณเปรียบเทียบกับค่า $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน

ภาพที่ 10 ขั้นตอนการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RT-HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การศึกษาการแสดงออกของ Vg และ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RT-PCR

6.1 การสืบค้นและออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อ Vg และ FAMeT gene ของกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด (full-length) ของยีนอ้างอิง (reference gene) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ β-actin gene (ซึ่งจัดเป็น housekeeping gene ที่ใช้เป็นยีนเปรียบเทียบการแสดงออกของ Vg และ FAMeT gene เพื่อยืนยันว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ในระหว่างศึกษายังมีกิจกรรมของเซลล์อยู่) ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank database (www.ncbinlmnih.gov) ของกุ้งขาวแวนนาไม คือ *Litopenaeus vannamei* beta-actin (β-actin) mRNA, complete cds-1320 bp, accession number AF300705 (Sun *et al*., 2007) จากนั้นทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ Vg gene ของกุ้งขาวแวนนาไม คือ *Litopenaeus vannamei* vitellogenin (Vg) mRNA, complete cds-7970 bp accession number AY321153 (Parnes *et al*., 2004) สุดท้ายทำการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ FAMeT gene (Farnesoic acid O-methyltrans ferase gene; FAMeT) ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งประกอบด้วย *Litopenaeus vannamei* Farnesoic acid O-methyl Transferase (FAMeT) mRNA complete cds-1221 bp accession number AY823408 (Lee *et al*., 2004) ต่อมาทำการออกแบบ gene specific primers ทั้งสามชนิดยีน คือ β-actin Vg และ FAMeT โดยใช้โปรแกรม primer premier 5 แล้วส่งรูปแบบ gene specific primers ที่ออกแบบได้ (ตารางที่1) ไปสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

GCGAGAAATCGTTCGTGACATCAAGGAGAAACTGTGCTACGTGGCCCTGGACT
TCGAGCAGGAGATGACCACCGCTGCTTCCTCCTCCTCGCTGGAGAAGTCCTACG
AGCTCCCTGACGGCCAGGTGATCACCATCGGCAACGAGAGGTTCCGCTGCCCCG
AGGCCCTGTTCCAGCCCTCATTCCTGGGCATGGAATCCTGCGGCATCCACG**AGA**
CCACCTACAACTCCATCAT

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ β-actin primer ขนาด 234 คู่เบส (Sense primer: 5' GCGAGAA-ATCGTTCGTGAC 3', Anti-sense primer: 5' TCTGGTGGATGTTGAGGTAGTA 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene specific primers (Forward และ Reverse) ของ β-actin Vg และ FAMeT gene ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

Gene/Primer	Accession number	Sequence	Tm (°C)	Size (bp)
Bata actin (β-actin) mRNA (Sun *et al.*, 2007)	AF300705	F: 5′- GCGAGAAATCGTTCGTGAC -3′	56.1	234
		R: 5′- TCTGGTGGATGTTGAGGTAGTA -3′	55.2	
Farnesoic acid O-methyl Transferase (FAMeT) mRNA (Lee *et al*., 2004)	AY823408	F: 5′- CTCAGG-GTCCGTCCACTCCA -3′	58.0	314
		R: 5' ACTGCCTCACATACAACTTCATTC 3'	62.7	
Vitellogenin (Vg) mRNA (Parnes *et al*., 2004)	AY321153	F: 5′- GAACTGCTCCTTTCACTGCCTTTG -3′	64.5	357
		R: 5′- TATGTTCCAGTTGGTGCTCCCTT -3′	62.5	

GAACTGCTCCTTTCACTGCCTTTGAATGGAATGTGCAGGTTACTCCTGAAGGA
GGAATTGAAGCTGTTGAAGCTGGTGTGGACATGAAAGCCATCATTGAAGTTCTG
AAGATTGTTCGTGCCATTGCTACTCTGGAGGAAGAGAGTTATGAAACTTATGGCC
CACACACAGCTCAGTACCAGTACCGCTTCACAAGGCCATCACCCACTTCTTACAC
CATGCAGATGAGGACTCCAATCCGCACCATGGAAGGAAGAGCTAAACTATCACC
AAGGGAATCTGGAATCAAGTTCTACCCCAATAAGGGCAAAACTGAATCCAAATA
CGAAATTGG**ATACAAGGTCAACCACGAGGGAA**

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Vg primer ขนาด 357 คู่เบส (Sense primer: 5' GAACTGCTCC-TTTCACTGCCTTTG 3', Anti-sense primer: 5' TTCCCTCGTGGTTGACCTTGTAT 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

CTCAGGGTCCGTCCACTCCATGAAGGGATCGCTGTCCTGGTATCCCACCCTAATA
TGGCCATCCTTGAAGGAGATGTAGAACTTCCTCTCCTCTTCACAGCAGACCACATC
AGGGGTGTCGACCTTGATCATGTCCTCACCCTTGCTGAGACGAATGGCAGAGTGCT
GGTTTTCCCACCCACCAATGAACACTTCATACATTGGAGAGGTCTCCTCTGGGCCG
GAGGTGAGTGCTAGATGGGCATCATTGCTACAAGCAACACTGAAGGAAAAGGTGT
CACCATACACAG**GAATGAAGTTGTATGTGAGGCAGT**

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ FAMeT Primer ขนาด 314 คู่เบส (Sense primer: 5'-CTCAGG-GTCCGTCCACTCCA -3', Anti-sense primer: 5'- ACTGCCTCACATACAACTTCA-TTC - 3') ของกุ้งขาวแวนนาไม

6.2 การสกัด Total mRNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการสกัดแยกระหว่างตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม เริ่มด้วยการนำตัวอย่างเนื้อเยื่อออกจากตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส (ข้อ3) บดทันทีในไนโตร-เจนเหลวกระทั่งเนื้อตัวอย่างเป็นผงละเอียด ตักผงเนื้อเยื่อตัวอย่างประมาณ 100 มิลลิกรัม ลงใน microcetrifuge tubes แล้วเติม TRIZOL reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วบดต่อด้วยแท่งแก้ว 3 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วปิเปตเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบนลงใน microcetrifuge tubes ตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยเติม absolute isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเทสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย ethanol solution ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศา-เซลเซียส นาน 10 นาที ปิเปตสารละลายส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติม ethanol solution ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บรักษา Total mRNA ที่ในตู้ทำความเย็น -80 องศาเซลเซียส

6.3 การวัดคุณภาพและปริมาณความเข้มข้นของ Total mRNA

นำตัวอย่าง Total mRNA จากข้อ 5.2 มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว7500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วปิเปตสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วปล่อยให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 2-3 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปตแบ่งสารละลาย Total mRNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ DEPC water ปริมาตร 49 ไมโครลิตร เพื่อทำการตรวจวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และวัดความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ โดยดูค่าอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรต่อ 280 นาโนเมตร คำนวณหาค่าความเข้มข้นของ Total mRNA (Sambrook *et al*., 1989)

6.4 การสังเคราะห์ 1st cDNA

ใช้ชุด ImProm-II™ Reverse Transcription system kit เพื่อทำการสังเคราะห์ 1st cDNA โดยมีขั้นตอนในการทำตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งเริ่มด้วยการนำ Total mRNA จากข้อ 5.3 มาปริมาตร 5 ไมโครลิตร (1.5 µg/µl) ผสมเข้ากับ Oligo $(dT)_{15}$ primer จำนวน 1 ไมโครลิตร และ Nuclease - Free water จำนวน 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที ต่อมาจึงทำการสร้าง 1st cDNA โดยนำ mRNA บริสุทธิ์ ปริมาตร 1.5 ไมโครกรัม ให้ทำกับปฏิกิริยาเอนไซม์ Reverse Transcriptase จากชุด ImProm-II™ Reverse Transcription system kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต และมีส่วน ผสมของการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการสังเคราะห์ 1st cDNA เพื่อใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไม

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	Nuclease–Free Water	6.5
2	ImProm-II™ 5X Reaction Buffer	4.0
3	$MgCl_2$, 25mM	2.0
4	dNTP mix, 10mM	1.0
5	Recombinant RNasin® Ribonuclease inhitor	0.5
6	ImProm-II™ Reverse Transcriptans	1.0
7	Total mRNA, 1.5 µg/µl	5
	ปริมาตรรวม	20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler กำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ ช่วง denaturing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง annealing stepใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ ช่วง extensionnstep ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ และช่วง final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5-7 นาที เก็บรักษา 1^{st}cDNA ที่ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส

6.5 การตรวจสอบคุณภาพของ 1st cDNA

การตรวจสอบคุณภาพ 1^{st}cDNA ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก เป็นการวัดปริมาณความเข้มข้น 1^{st}cDNA โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงนำสารละลายดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ใน TE buffer 1 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร/280 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA ขั้นตอนที่สอง เป็นการตรวจคุณภาพของ 1^{st}cDNA โดยทำปฏิกิริยา PCR เปรียบเทียบกับยีน β-actin โดยใช้ชุด DyNAzyme^{TM}II DNA Polymerase Kit มีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 3)

ต่อมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler โดยกำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับข้อ 5.4 จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis บน 1.2 % agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer (89 mM Tris-Hcl, 8.9 mM boric acid และ2.0 mM EDTA) และใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (AC) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่านนาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย EtBr เพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ (G:BOX CHEMI) เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของ 1st cDNA ที่ใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไม

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	dH_2O	27.5
2	10x Optimized DyNAzyme™ buffer	5
3	$MgCl_2$, 50mM	1
4	dNTPs, 1mM	10
5	Actin *L. vannamei* Primer (F), 10µM	2.5
6	Actin *L. vannamei* Primer (R), 10µM	2.5
7	DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 2U/µl	1
8	1st cDNA, 500 µg/µl	1
	ปริมาตรรวม	50

6.6 การทำโคลน (Cloning) และการตรวจสอบ (sequencing) ลำดับนิวคลีโอไทด์

6.6.1 การสกัด DNA จาก PCR Product (DNA Purification)

นำ 1stcDNA ของเนื้อเยื่อตัวอย่าง ข้อ 5.4 ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ gene specific primer โดยใช้ชุด DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาใน ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจาก PCR Product (DNA Purification) ของกุ้งขาวแวนนาไม

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	dH_2O	27.5
2	10x Optimized DyNAzyme™ buffer	5
3	$MgCl_2$, 50mM	1
4	dNTPs, 1mM	10
5	Gene specific primer (F), 10µM	2.5
6	Gene specific primer (R), 10µM	2.5
7	DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 2U/µl	1
8	1st cDNA, 500 µg/µl	1
	ปริมาตรรวม	50

ต่อมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler โดยกำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับ ข้อ 5.4 สิ้นสุดปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เก็บรักษา PCR Product ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัด DNA โดยใช้ชุด QIA quick gel extraction kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต เริ่มด้วยการนำ PCR product ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ บน 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer และใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (AC) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่านนาน 30 นาที จากนั้นทำการตัดเจล (น้ำหนักประมาณ 300 มิลลิกรัม) ตรงตำแหน่งที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของยีนที่ต้องการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วย้ายลงใน microcentrifuge tube ต่อมาเติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วทำการปิเปตสารละลายอุ่น ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ลงใน DF column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8600 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้าง DF column ด้วย wash buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8600 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง สุดท้ายจึงทำการรวบรวมปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด โดยทำการ elution ด้วย elution buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษา DNA ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส เพื่อทำ Ligation ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.6.2 การเชื่อม DNA เข้ากับ pGEM®-T Easy vector

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM®-T Easy vector เพื่อสร้าง plasmid DNA สายผสม ทำได้โดยนำ DNA จากข้อ 5.6.1 ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร ผสมเข้ากับ 2x rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร PGEM®-TEasy vactor (50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) 0.5 ไมโครลิตร และ T_4 DNA Ligaes (3 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมเข้ากัน แล้วบ่มในน้ำอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (overnight) จากนั้นจึงทำการตรวจสอบการเชื่อมของดีเอ็นเอเข้ากับ pGEM®-T Easy vector โดยนำ Ligation product มาทำปฏิกิริยา PCR กับ primer (pUC1) และ primer (pUC2)โดยใช้ชุด DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิตและมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการเชื่อม DNA เข้ากับ pGEM®-T Easy vector

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	dH_2O	15
2	10x Optimized DyNAzyme™ buffer	2.5
3	$MgCl_2$, 50mM	1
4	dNTPs, 1mM	2.5
5	Primer (pUC1), 2µM	1.25
6	Primer (pUC2), 2µM	1.25
7	DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 5U/ul	0.5
8	Ligation product, 3 ng/ul	1
	ปริมาตรรวม	25

ต่อมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler โดยกำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ตามข้อ5.4 และนำ PCR product มาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ ด้วยวิธี electrophoresis บน 2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1xTBE buffer และใช้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่านนาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย EtBr เพื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ (G: BOX CHEMI) เปรียบ เทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

6.6.3 การถ่ายโอน DNA (ligation product) เข้าสู่ *E. coli* host cells (Transformation)

(1) การเตรียม competent cell โดยการเตรียม competent cell *E.coli* strain JM 109 cell อ้างอิงตามวิธีการ Ausubel *et al*. (1989) ทำได้โดยนำโคโลนีเดียวของเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 ซึ่งเก็บรักษาในตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียส แช่ลงทันทีในน้ำแข็งแล้ว ปิเปตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth (1% Bacto try ptone 0.5% Bacto yeast extract และ 1% NaCl) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นนาน 16 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งเชื้อแบคทีเรีย 1 มิลลิลิตร เติมลงเลี้ยงต่อในอาหาร LB Broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าอย่างต่อเนื่อง กระทั่งความขุ่นสามารถวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.4-0.6 (ประมาณ 3 ชั่วโมง) จากนั้นนำแช่ทันทีลงในน้ำแข็ง นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งแล้วเติมสารละลาย $MgCl_2CaCl_2$ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร (80 mM $MgCl_2$และ 20 mM $CaCl_2$) ผสมเข้ากันเบ่า ๆ 2 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทของเหลวด้านบนทิ้ง ต่อมาจึงเติม 100 mM $CaCl_2$ ที่มี 15% Glycerol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันทำการแบ่งเก็บใน microcentrifuge tube 200 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

(2) การโคลน DNA (ligation product) เข้าสู่ *E.coli* host cells เริ่มด้วยนำ competent cell จากข้อ 5.6.3 (1) จากนั้นทำการละลายด้วยมือ แล้วแช่ลงบนน้ำแข็ง ต่อมาเติม ligation products ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงในหลอด competent cell แล้วแช่ทันทีลงในน้ำแข็ง นาน 30 นาที แล้วทำการ heat shock เป็นเวลา 45 นาที ใน 42 องศาเซลเซียส shaker bath แช่ทันทีลงในน้ำแข็ง นาน 2 นาที ปิเปตปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน SOC medium ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มพร้อมเขย่าต่อ เนื่อง 37 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ระหว่างนั้นทำการเตรียม LB agarplate (ประกอบยา ampicillin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, IPIG (Isopropylthio-β-D-galactoside) ความเข้มข้น 25ไมโคร-กรัมต่อไมโครลิตร และX-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ก่อน 30 นาที แล้วนำ SOC medium ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบน LB agar plate บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสข้ามคืน ต่อมาทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวเดี่ยว ๆ มาทำการเลี้ยงใหม่ใน LB-Ampicillin plate เพื่อเตรียมเป็น mater plate สำหรับตรวจผลการโคลน

(3) การตรวจสอบ colony PCR ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการโคลน สามารถตรวจ สอบผ่าน colony PCR เพื่อตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ universal primer ชนิด pUC1 (Revers) และ pUC2 (Forward) ซึ่งมีตำแหน่งทางด้านซ้ายและขวาของตำแหน่ง multiple cloning site ตามลำดับ ในการตรวจหาชิ้น Insert ของยีนที่สนใจ การตรวจ สอบ colony PCR ใช้ชุด DyNAzyme™ II DNA Polymerase Kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต โดยมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตรวจสอบ colony PCR ในการตรวจสอบประสิทธิภาพการโคลน เพื่อตรวจสอบความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	dH_2O	16
2	10x Optimized DyNAzyme™ buffer	2.5
3	$MgCl_2$, 50mM	1
4	dNTPs, 1mM	2.5
5	Primer (pUC1), 2µM	1.25
6	Primer (pUC2), 2µM	1.25
7	DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 5U/ul	0.5
8	White Colony PCR1 Colony	
	ปริมาตรรวม	25

ต่อมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler โดยกำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับข้อ 5.4 และนำ PCR product มาตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 1.2% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

TBE buffer และใช้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่านนาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย EtBr เพื่อการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพ (G: BOX CHEM I) เปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

(4) การสกัด plasmid DNA ใช้ชุด HiYield™ Plasmid Mini Kit โดยมีขั้นตอนในการทำตามที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต เริ่มด้วยการคัดเลือก colony *E.coli* สีขาว ซึ่งคาดว่ามีชิ้น Insert ของ DNA จากข้อ 5.6.3 (3) มา 1 colony เลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB Ampicillin broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตรที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแบ่งใส่ ลงใน microcentrifuge tube ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม PD_1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนแบคทีเรียก้นหลอดโดยใช้ออโตปิเปต เติม PD_2 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเข้ากันด้วย แล้วตั้งที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 2 นาที เติม PD_3 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที แล้วปิเปตส่วนใสด้านบนลงใน PD column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ ห้อง นาน 2 นาที แล้วทำการรวบรวม Plasmid DNA โดยการ elute ด้วย EB buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5) 35 ไมโครลิตร ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เก็บรักษา plasmid DNA ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

(5) การตัด plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Eco*R I เพื่อยืนยันขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่โคลนเข้าใน pGEM®-T Easy vector ซึ่งจะใช้ *Eco*R I ตัดชิ้น Insert ออกจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pGEM®-T Easy vector โดยการตัด Plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*RI จะใช้ชุด pGEM®-T Easy Vector-Systems Kit โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติตาม ที่ระบุในคู่มือของบริษัทผู้ผลิตมีส่วนผสมของการทำปฏิกิริยาในปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในการตัด plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ชนิด *Eco*R I เพื่อยืนยันขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่โคลนเข้าใน pGEM®-T Easy vector

ลำดับ	Components	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	10x PCR Buffer	0.1
2	BSA, 10 ng/mL	1
3	Spermidine, 40 mM	1
4	*Eco* RI	0.125
5	Plasmid DNA	1
6	dH_2O	6.7
	ปริมาตรรวม	10

นำส่วนผสมปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมเข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ต่อมาจึงทำการตรวจสอบการตัด Plasmid DNA (ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ) ด้วยวิธี electrophoresis บน 1.2 % agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1X TBE buffer และใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ ผ่านนาน 30 นาที แล้วย้อมด้วย EtBr เพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพเปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

(6) การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ นำ plasmid DNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากข้อ 5.6.3 (5) ส่งตรวจสอบ (sequencing) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ gene specific primer โดยใช้ Thermo sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit ซึ่งใช้ universal primer ชนิด M13 forward และ M 13 reverse เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลิโอไทด์ทั้งด้านปลาย 3’ และ 5’ ของ DNA ตามลำดับ ซึ่งแจ้งผลการตรวจ สอบลำดับนิวคลีโอไทด์ทาง www.ncbi.nlm.nih.gov จากนั้นทำการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโน อ้างอิงตามวิธี Altschul *et al*. (1990) ทำได้โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ เข้าไป BLASTN ใน BLASTN programs (www.ncbi.nlm.nih.gov)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.7 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนไวเทลโลเจนนิน ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม โดยวิธี RT-PCR

นำ gene specific primers (forward และ reverse) ของ β-actin Vg และ FAMeT gene (ตารางที่1) ที่ผ่านการทำโคลน (Cloning) และการตรวจสอบ (sequencing) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ตามข้อ 5.6 จากนั้นทำการหาส่วนผสมที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR ในแต่ละชนิดของยีนก่อนทำการตรวจวัดการแสดงออกของยีน โดยวิธี RT-PCR ซึ่งมีความจำเป็นต้องทำการหาส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ที่ทำให้ดีเอ็นเอผลผลิตมีการเพิ่มจำนวนอยู่ในช่วงของ legalistic phase โดยทำการทดลองปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ความเข้มข้นของ 1stcDNA Gene specific primer, $MgCl_2$ concentration, อุณหภูมิของช่วง annealing step และจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR

6.7.1 การตรวจวัดโดยวิธี RT-PCR

ปฏิกิริยา PCR ดำเนินงานด้วยเครื่อง PCR thermal cycler โดยมีองค์ประกอบหลักของทั้ง β-actin Vg และFAMeT gene ประกอบด้วยส่วนผสมต่าง ๆ ดังนี้ (ตารางที่ 8)

สำหรับยีน β-actin จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler ซึ่งกำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ ช่วง denatureing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง annealing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 22 รอบ ช่วง extensionstep ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 7 นาทีจำนวน 1 รอบ และช่วง final extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5-7 นาที เก็บรักษา 1stcDNA ที่ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส

ส่วน Vg gene จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง โดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler กำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ ช่วง denaturing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง annealing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 29 รอบ ช่วง extensionstep ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 7 นาทีจำนวน 1 รอบ และช่วง final

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5-7 นาทีเก็บรักษา 1st cDNA ที่ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 8 ส่วนผสม (components) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในกุ้งขาวแวนนาไม

ลำดับ	Components	β-actin ปริมาตร (ไมโครลิตร)	Vg ปริมาตร (ไมโครลิตร)	FAMeT ปริมาตร (ไมโครลิตร)
1	dH_2O	30.5	29.5	31.5
2	10x Optimized DyNAzyme™ buffer	5	5	5
3	$MgCl_2$, 50mM	1 (1 mM)	1 (1 mM)	1 (1 mM)
4	dNTPs, 1mM	10 (0.2 µM)	10 (0.2 µM)	10 (0.2 µM)
5	Gene specific primer (F), 10µM	1 (0.2 µM)	1 (0.3 µM)	0.5 (0.1 µM)
6	Gene specific primer (R), 10µM	1 (0.2 µM)	1 (0.3 µM)	0.5 (0.1 µM)
7	DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 2U/µl	0.5 (1 unit)	0.5 (1 unit)	0.5 (1 unit)
8	First strand cDNA (β-actin_200 µg/µl Vg_500 µg/µl FAMeT _700 µg/µl)	1	1	1
	ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	50	50	50

ในขณะที่ FAMeT gene จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองโดยใช้เครื่อง PCR thermal cycler กำหนดสภาวะการทำงานของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ดังนี้ ช่วง denaturing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ ช่วง annealing step ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส นาน 0.45 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 29 รอบ ช่วง extensionstep ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสนาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ และช่วง final

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5-7 นาทีเก็บรักษา 1st cDNA ที่ในตู้เย็น -30 องศาเซลเซียส ต่อมานำ PCR product ของทั้งสองยีนมาทำการแยกตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 1.5% agarose gel ในบัฟเฟอร์ 1x TBE buffer และใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกภาพเปรียบเทียบความเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

6.7.2 การวิเคราะห์ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ (relative expression ratio) ของ β-actin Vg และ FAMeT gene ในเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม

ทำการวิเคราะห์ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg และ FAMeT gene โดยเปรียบเทียบ(normalization) กับ β-actin gene โดยทำปฏิกิริยา PCR ตามส่วนผสมที่เหมาะสม จากข้อ 6.7.1 ต่อมานำ PCR product ที่ได้ไปแยกใน 1.5% agarose gel แล้วย้อมด้วย EtBr จากนั้นทำการวัดขนาดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง เพื่อคำนวณหา intensity ด้วยโปรแกรม SynGene (GeneTools-File version) นำค่า intensity ที่คำนวณได้จากยีนสืบพันธุ์มาหาสัดส่วนเทียบกับ β-actin gene เปรียบเทียบค่าที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง ต่อมาทำการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการแสดงออกของยีนสืบพันธุ์ ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ระหว่างเดือนทดลองแล้วเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Independent Samples T Test (t-test)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเค็มต่อคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีแบบดังเดิม (Traditional techniques) และวิธีโคเมท แอสเสย์ (Comet assay)

ในส่วนนี้เป็นการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งได้รับอิทธิพลจาก 2 ปัจจัย คือ ระดับความเค็มของน้ำและชนิดบ่อ รวมทั้งทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณลูกกุ้งวัยอ่อน (นอร์เพลียส) กับคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ๆ ดังนี้

1. การศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มและชนิดบ่อทดลองต่างกัน (การทดลองที่ 2.1)

แผนการทดลอง

คัดเลือกเฉพาะกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้มีสุขภาพแข็งแรง ไม่เป็นแผลตามลำตัว และกุ้งมีพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะที่ 1 กล่าวคือ ถุงสเปิร์มยังไม่พัฒนา โดยพบมีลักษณะขุ่นเล็กน้อยน้ำเชื้อยังเป็นของเหลวและไม่พบสเปิร์มในถุงเก็บสเปิร์ม อายุ 4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 35 กรัม ความยาว 15 เซนติเมตร จากบ่อเลี้ยงพ่อพันธุ์กุ้งในอำเภอท้ายเหมือง จังหวัดพังงา แล้วขนย้ายมายังฟาร์มทดลองชั่วคราว (นวพันธุ์ ฟาร์ม) พักกุ้งเป็นระยะเวลา 7 วัน ก่อนปล่อยกุ้งลงเลี้ยงในแต่ละกลุ่มทดลอง โดยกลุ่มทดลองที่ 2 (ความเค็มน้ำ 15 พีพีที) และ 4 (ความเค็มน้ำ 30 พีพีที) ใช้บ่อซีเมนต์ ขนาด 20 ตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ โดยบ่อแรกมีความเค็มน้ำ เท่ากับ 15 pptและบ่อที่สอง มีความเค็มน้ำ เท่ากับ 30 pptภายในบ่อกั้นเป็นคอกด้วยตาข่ายพลาสติกตาห่าง แบ่งออกเป็น 2 คอก ขนาดพื้นที่คอกละ 10 ตารางเมตร จำนวน 2 คอก (2 ซ้ำ) ปล่อยกุ้งทดลองที่อัตราความหนา แน่น 5 ตัวต่อตารางเมตร ส่วนกลุ่มทดลองที่ 1 และ 3 ใช้บ่อดิน ขนาด 100 ตารางเมตร จำนวน 2 บ่อ โดยบ่อแรกมีความเค็มน้ำ เท่ากับ 15 pptและบ่อที่สองมีความเค็มน้ำ เท่ากับ 30 pptภาย ในบ่อกั้นเป็นคอกด้วยอวนมุ้งสีฟ้าตาห่าง แบ่งออกเป็น 2 คอก ขนาดพื้นที่คอกละ10 ตารางเมตร จำนวน 2 คอก (2 ซ้ำ) ปล่อยกุ้งทดลองในแต่ละคอก ที่อัตราความหนาแน่น 5 ตัวต่อตารางเมตร

ให้กุ้งทดลองกินอาหาร 4 ครั้งต่อวัน คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปกุ้งทะเลทั่วไปเบอร์ 4 วันละ 2 ครั้ง ในสองช่วงเวลา คือ 8.00 น. และ 15.00 น. ที่อัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน และเสริมด้วยอาหารธรรมชาติสดในสัดส่วนเนื้อหอยตะโกรมต่อเนื้อหมึกกล้วย เท่ากับ 1:1 วันละ 2 ครั้ง ช่วงเวลา 10.00 น. และ18.00 น. ที่อัตรา 7 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน กระทั่งสิ้นสุดการทดลอง 60

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัน (ระหว่างเดือนมิถุนายน ถึง กรกฎาคม 2554) ซึ่งทั้งบ่อดินและบ่อซีเมนต์เดินระบบท่อลมให้อากาศวางเป็นแนวที่พื้นบ่อและในระหว่างการทดลองจะให้อากาศตลอดเวลา ตลอดระยะเวลาการทดลองควบคุมระดับน้ำในบ่อสูงเฉลี่ย 1.0 เมตร สำหรับบ่อซีเมนต์ทำความสะอาดบ่อและเปลี่ยนถ่ายน้ำ 40 เปอร์เซ็นต์ทุกวัน ส่วนบ่อดินไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง สามารถแบ่งกลุ่มทดลองภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน ดังการทดลองที่ 2.1 ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาความแตกต่างของคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มต่างกันและชนิดบ่อทดลองต่างกัน ประกอบด้วย

กลุ่มทดลองที่ 1 เลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน

กลุ่มทดลองที่ 2 เลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อซีเมนต์

กลุ่มทดลองที่ 3 เลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 30 ppt ในบ่อดิน

กลุ่มทดลองที่ 4 เลี้ยงกุ้งที่ความเค็ม 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

การเก็บข้อมูล

สิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทดลอง จำนวน 5 ตัวต่อซ้ำ เพื่อชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว จากนั้นทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ตรงตำแหน่งถุงเก็บสเปิร์มบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 แล้วจึงใช้หัวแม่มือบีบถุงสเปิร์มทั้งสองข้าง ล้างซ้ำหนึ่งรอบด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และเก็บในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์ม ตามขั้นตอน ในข้อ 3 และ 4 เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มในแต่ละกลุ่มต่อไป

2. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส (การทดลองที่ 2.2)

แผนการทดลอง

คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมจากบ่อผสมพันธุ์และวางไข่ซึ่งกำลังประสบความปัญหาจำนวนลูกกุ้งวัยอ่อนที่ได้ภายหลังจากการฟักไข่แตกต่างกันโดยไม่ทราบสาเหตุจากฟาร์มเพาะอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน จังหวัดระยอง สุ่มคัดเลือกปล่อยลงเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ขนาด 10 ตารางเมตร ภายในบ่อกั้นเป็นคอกด้วยตาข่ายพลาสติกตาห่าง แบ่งออกเป็น 2 คอก (2 ซ้ำ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขนาดพื้นที่คอกละ 5 ตารางเมตร ปล่อยกุ้งทดลองในแต่ละคอก อัตราความหนาแน่น 4 ตัวต่อตารางเมตร ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย เท่ากับ 1:1 ให้กุ้งกินอาหาร 4 ครั้งต่อวัน คือ อาหารเม็ดสำเร็จรูปกุ้งทะเลทั่วไปเบอร์ 4 วันละ 2 ครั้ง ในสองช่วง เวลา คือ 8.00 น. และ 15.00 น. ที่อัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน และกินอาหารธรรมชาติสดในสัดส่วนเนื้อหอยตะโกรมต่อเนื้อหมึกกล้วย เท่ากับ 1:1 วันละ 2 ครั้ง ช่วงเวลา 10.00 น. และ18.00 น. ที่อัตรา 7 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน กระทั่งสิ้นสุดการทดลอง 60 วัน (ระหว่างเดือนกันยายน ถึง ตุลาคม 2554) โดยสามารถแบ่งกลุ่มทดลองตามปริมาณนอร์เพลียสที่ได้รับ (การทดลองที่ 2.2) จากการผสมพันธุ์ของกุ้งทดลองในบ่อเดียวกัน ดังนี้

การทดลองที่ 2.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพของสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส ประกอบด้วย 4 กลุ่มการทดลอง ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 ใช้สเปิร์มกุ้งขาวแวนาไมเพศผู้จากบ่อทดลองซึ่งแม่กุ้งให้ปริมาณนอร์เพลียส เท่ากับ $6.78x10^4$ ตัว/แม่กุ้ง 1 ตัว

กลุ่มทดลองที่ 2 ใช้สเปิร์มกุ้งขาวแวนาไมเพศผู้จากบ่อทดลองซึ่งแม่กุ้งให้ปริมาณนอร์เพลียส เท่ากับ $12.18 x10^4$ ตัว/แม่กุ้ง 1 ตัว

กลุ่มทดลองที่ 3 ใช้สเปิร์มกุ้งขาวแวนาไมเพศผู้จากบ่อทดลองซึ่งแม่กุ้งให้ปริมาณนอร์เพลียส เท่ากับ $16.76 x10^4$ ตัว/แม่กุ้ง 1 ตัว

กลุ่มทดลองที่ 4 ใช้สเปิร์มกุ้งขาวแวนาไมเพศผู้จากบ่อทดลองซึ่งแม่กุ้งให้ปริมาณนอร์เพลียส เท่ากับ $21.38 x10^4$ ตัว/แม่กุ้ง 1 ตัว

การเก็บข้อมูล

สิ้นสุดการทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองเพศผู้ จำนวน 5 ตัวต่อซ้ำ จากนั้นทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ตรงตำแหน่งถุงเก็บสเปิร์มตรงโคนขาเดินคู่ที่ 5 แล้วจึงใช้หัวแม่มือบีบถุงเก็บสเปิร์มทั้งสองข้าง ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เก็บในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งทดลองตามขั้นตอนในข้อ 3 และ 4 เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มในแต่ละกลุ่มทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (Traditional techniques)

การวิเคราะห์คุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในด้วยวิธีแบบดั้งเดิม อ้างอิงตามวิธีการของ Alfaro *et al*. (2003, 2007) และ Leung-Trujillo and Lawrence (1987) ประกอบด้วย 4 พารา-มิเตอร์ ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ ค่าปริมาณสเปิร์มสุทธิ การวิเคราะห์หาค่าร้อยละการตายของสเปิร์ม และค่าร้อยละขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม (3 และ5 ไมโครเมตร) การดำเนินงานเริ่มด้วยการนำถุงเก็บสเปิร์มกุ้งทดลองแต่ละตัวมาบดในสารละลาย sodium citrate เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (10 กรัม sodium citrate ต่อ dH_2O 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร ผสมกับสาร ละลาย PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na_2HPO_4 และ2mM KH_2PO_4) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดถุงเก็บสเปิร์มด้วยแท่งบดเนื้อเยื่อ นาน 3 นาที ทิ้งให้สารละลายสเปิร์มตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง แล้วปิเปตเฉพาะสารแขวนลอยด้านบนทั้งหมด จากนั้นจึงทำการเจือจางสาร ละลายสเปิร์มให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย PBS buffer เพื่อวิเคราะห์คุณภาพ จำนวน 4 พารามิเตอร์ ซึ่งได้กล่าวข้างต้น เริ่มด้วยดูดสารละลายสเปิร์มความหนาแน่น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผสมเข้ากับสีย้อม (0.4% Trypan blue solution) ในอัตราส่วนสีย้อม 0.4 % Trypan blue solution 1 ส่วนต่อสารละลายสเปิร์ม 9 ส่วน แล้วปิเปตออกมาปริมาณ 150 ไมโครลิตร ลงใน hemacytometer นับปริมาณสเปิร์มทั้งหมด จำนวนเซลล์สเปิร์มที่ตาย (ติดสีย้อม) เพื่อคำนวณหาค่าร้อยละการตายของสเปิร์มกุ้งช่วงเวลาบม 1 และ 3 ชั่วโมง และบางส่วนทำการคำนวณหาค่าร้อยละของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม (3 และ 5 ไมโครเมตร)

4. การวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ (comet assay)

การศึกษาคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธี โคเมท แอสเสย์ ซึ่งอ้างอิงตามวิธีของ Sriussadaporn *et al*. (2003) และ Singh *et al*. (1988) โดยรายละเอียดของการดำเนินงานเริ่มด้วยการเคลือบ Microscope slides เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการเกาะของสเปิร์มด้วย 1% GenPure LE Agarose gels ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องมากกว่า 6 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายสเปิร์มที่มีความหนาแน่น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้ากับ 1% Low Melting Point Agarose (LMA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเข้ากันแล้วดูดปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่น comet slides™ ที่วางบนแผ่นความเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้นาน 45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

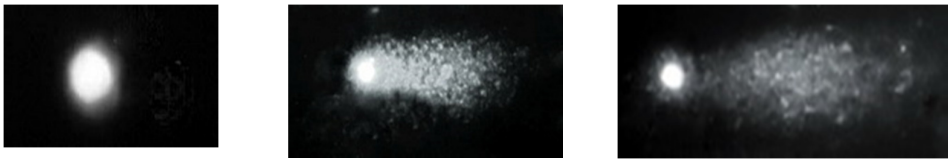
ก่อนแช่สไลด์ในสารละลาย Lysis solution (2.5 M NaCl 10 mM Tris-HCl 0.1 M Na_2EDTA 1X Triton X 10% Dimethylsulfoxide, pH 10) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำสไลด์มาวางใน Horizontal gel electrophoresis chamber ควบคุมอุณหภูมิให้ เท่ากับ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งภายในบรรจุด้วยสารละลาย alkaline solution (0.3 MNaOH 1 mM Na_2EDTA 0.2% Dimethylsulfoxide, pH>13) แล้วแช่โคเมท สไลด์ใน chamber ต่ออีกนาน 10 นาที แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า [AC:300 มิลลิแอมป์,15 โวลล์] ใน Horizontal gel electrophoresis chamber นาน 20 นาที เมื่อครบเวลา นำโคเมท สไลด์ ออกมาล้างด้วยสารละลาย Neautralization buffer (400 mM Tris-HCl pH 7.5) จำนวน 3 ครั้ง แล้วล้างต่อด้วยสารละลาย 75% Ethyl alcohol นาน 5 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที ซับโคเมท สไลด์ให้แห้ง ต่อมาทำการย้อมโคเมท สไลด์ ด้วยสีย้อม(EtBr) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ผลคุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ ประกอบด้วย 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนแรก เป็นการวิเคราะห์คุณภาพของสเปิร์มกุ้งทดลองด้วยโปรแกรมโคเมทสำเร็จรูป ซึ่งคุณภาพของสเปิร์มที่ผ่านการวิเคราะห์จะถูกนำเสนอผ่านพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้ ค่า Comet length, Comet height, Comet area, Comet intensity, Comet mean intensity, Head diameter, Head area, Head intensity, Head mean intensity, Tail length, Tail intensity, Tail mean intensity, %DNA in head, %DNA in tail, %tail moment และ Olive moment การวิเคราะห์ผลเริ่มด้วยการสุ่มคัด เลือกเฉพาะโคเมท เซลล์ (ภาพที่ 14) จากโคเมท สไลด์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ Excitation filter ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร และ Barrier filter ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อตรวจหาบริเวณที่เซลล์มีการกระจายตัวพอดี จากนั้นใช้กล้องซีซีดีรับสัญญาณภาพถ่ายทอดไปยังจอคอมพิวเตอร์ (Monteith and Vanstone, 1995) ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองทำการศึกษาโดยใช้สเปิร์ม จำนวน 50 เซลล์ต่อตัว

ส่วนที่สอง เป็นการวิเคราะห์คุณภาพของสเปิร์มกุ้งทดลองจากผลการจำแนกสัดส่วนของสเปิร์มที่ผ่านกระบวนการวิเคราะห์ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 3 พารามิเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ผล ได้แก่ Comet cell, Healthy cell และ Dead cell (ภาพที่14)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



Healthy cell Comet cell Dead cell

ภาพที่ 14 การจำแนกคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนาไมโดยใช้ตัวบ่งชี้วัดจากโปรแกรมสำเร็จรูป (Tritek Comet [Score] Freeware Version 1.5) ประกอบด้วย Healthy cell, Cell dead และ Comet cell

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการทดลองที่ 1 ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละพารามิเตอร์ของคุณภาพสเปิร์มของกุ้งทดลองระหว่างกลุ่มทดลองด้วยสถิติ T-Test (t-test) ส่วนการทดลองที่ 2 ทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวแปรของแต่ละกลุ่มทดลองด้วยสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และหาความสัมพันธ์ของตัวแปรแต่ละตัวเป็นรายคู่ โดย Pearson's correlation coefficient โดยไม่มีการควบคุมอิทธิพลของตัวแปรตัวอื่น ๆ ตัวแปรแต่ละคู่ที่มีความสัมพันธ์กันจากการทดสอบ correlation coefficient แสดงโดยกราฟเส้นตรง Regression linear เพื่อแสดงทิศ ทางในความสัมพันธ์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ในการศึกษาเริ่มดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนมีนาคม 2553 ถึง เดือนมิถุนายน 2556

สถานที่ทำการวิจัย

1. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
2. ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. โครงการใช้นิวเคลียร์เพื่อส่งเสริมกิจการผสมเทียมโคนมและกระบือปลัก ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์ คณะสัตว์แพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งฉะเชิงเทรา ตำบลท่าสะอ้าน อำเภอบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา

5. ฟาร์มเพาะอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน (Global gen ประเทศไทย) จังหวัดระยอง

6. ฟาร์มเพาะอนุบาลลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน (นวพันธุ์ ฟาร์ม) อำเภอท้ายเหมือง จังหวัดพังงา

แหล่งทุนสนับสนุน

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการสนับทางด้านงบประมาณการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง การแสดงออกของยีนควบคุมการเจริญพันธุ์ของกุ้งทะเลหลังให้อาหารกระตุ้น การเจริญพันธุ์ (รหัส ก-ย (ด) 1.53) และการตรวจสอบคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารส่งเสริมการเจริญพันธุ์ ด้วยวิธีโคเมทแอสเสย์ (รหัส พ-ท (ด) 52.55)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลการศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย

1.1 ผลการทดสอบความขนานกันระหว่างฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมกับฮอร์โมน P_4 และ E_2 มาตรฐาน

ผลการนำตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 2 4 6 8 และ16 เท่า ต่อนำมาตรวจวัดระดับความเข้มข้นฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้ง นำผลที่ได้มาเขียนเป็นกราฟเส้นเพื่อเปรียบเทียบกับฮอร์โมน P_4 และ E_2 มาตรฐาน พบว่า กราฟเส้นฮอร์โมน P_4 และ E_2 ซึ่งวัดระดับความเข้มข้นในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย เส้นกราฟมีความขนานกันไปกับฮอร์โมน P_4 และ E_2 มาตรฐาน (ภาพที่ 15)

1.2 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ (reliability) ในการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของฮอร์โมน P_4 แอนติบอดี โดยนำไปทดสอบหาเปอร์เซนต์ cross reaction กับสเตอรอยด์อื่นๆ พบว่า ฮอร์โมน P_4 มี cross reaction กับฮอร์โมน P_4 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ฮอร์โมน 17แอลฟา-ไฮดรอกซี้โปรเจสเตอโรน เท่ากับ 0.74 เปอร์เซ็นต์ ฮอร์โมน คอร์ติโคสเตอโรน เท่ากับ 0.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสเตอรอยด์ตัวอื่นๆ น้อยกว่า 0.001 เปอร์เซ็นต์

ความถูกต้องของการตรวจวัดหาได้จากการเติมฮอร์โมน P_4 ปริมาณ 5 10 และ 25 พิโคร กรัมต่อมิลลิตร ลงในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียซึ่งมีฮอร์โมน P_4 โดยทำความเข้มข้นละ 5 หลอด และนำค่าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเปอร์เซ็นต์วิเคราะห์ได้ (% recovery) พบว่า ปริมาณฮอร์โมน P_4 ที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.87±1.54 9.34±2.12 และ 24.37±2.11 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และประสิทธิภาพต่ำสุดในการตรวจวัดจากกราฟมาตรฐานฮอร์โมน P_4 เท่ากับ 0.01 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ส่วนค่าความแม่นยำ (precision) จากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการทำซ้ำตัวอย่างละ 4 หลอด ในการทดลอง 5 ครั้ง ของตัวอย่างน้ำเลือดควบคุมคุณภาพที่มีระดับฮอร์โมน P_4 ค่าสูง กลาง และต่ำ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรในการทดลองเดียวกันอยู่ระหว่าง 5.4-9.7 4.7-8.7 และ 3.9-12.2 เปอร์เซ็นต์ และระหว่างครั้งการทดลอง เท่ากับ 8.9 10.2 และ 11.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และประสิทธิภาพต่ำสุดในการตรวจวัดจากกราฟมาตรฐานฮอร์โมน P_4 เท่ากับ 0.05 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

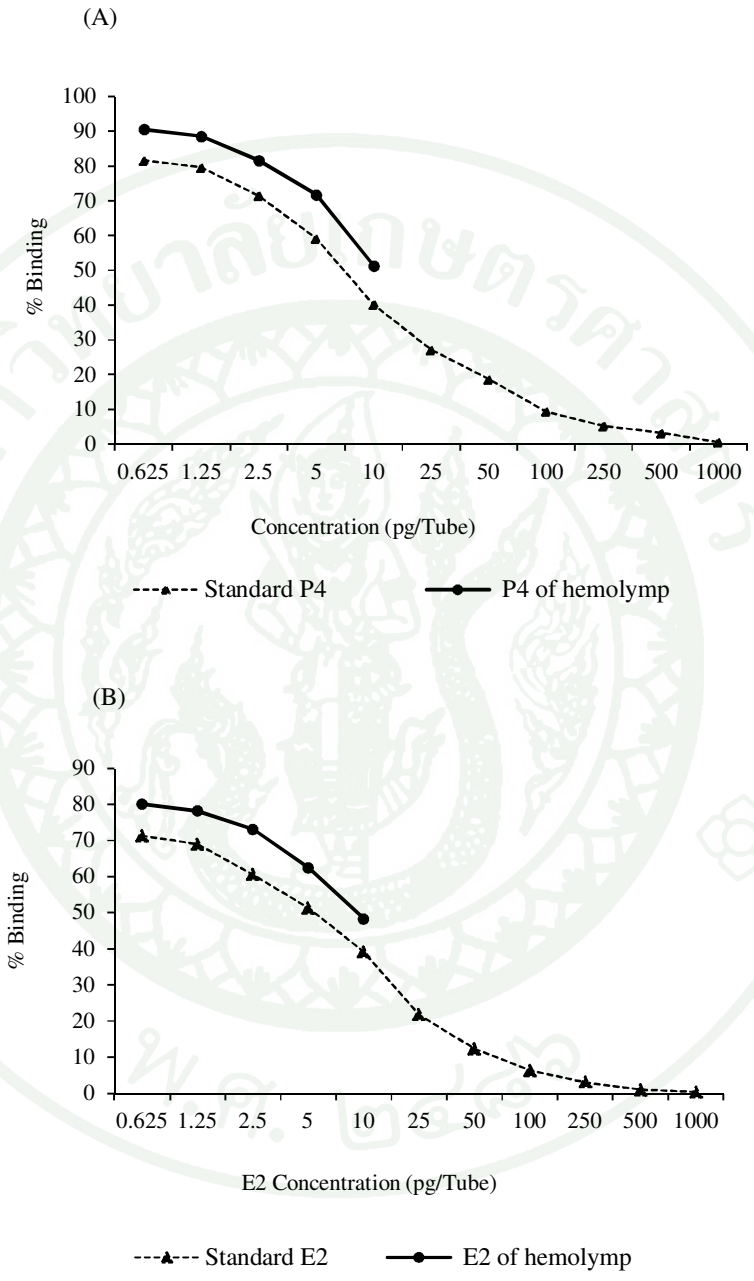
1.3 ผลการทดสอบความเชื่อถือได้ (reliability) ในการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

ความจำเพาะเจาะจง (specificity) ของฮอร์โมน E_2 แอนติบอดี นำไปทดสอบหาเปอร์เซนต์ cross reaction กับสเตอรอยด์ต่าง ๆ ซึ่งจะมี cross reaction กับฮอร์โมน E_2 เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ฮอร์โมน 17 แอลฟา-แอสตราไดออล เท่ากับ 0.48 เปอร์เซ็นต์ ฮอร์โมนแอสโตรน เท่ากับ 8.40 เปอร์เซ็นต์ และฮอร์โมน แอสตราไดออล 0.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนสเตอรอยด์ตัวอื่น ๆ น้อยกว่า 0.03 -1.68 เปอร์เซ็นต์

ความถูกต้องของการตรวจวัดหาได้จากการเติม ฮอร์โมน E_2 ปริมาณ 5 10 และ 25 พิโคร กรัมต่อมิลลิตร ลงในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย ที่มีฮอร์โมน E_2 โดยทำความเข้มข้นละ 5 หลอด และนำค่าที่ตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์มาหาค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเปอร์เซ็นต์วิเคราะห์ได้ (% recovery) พบว่า ปริมาณฮอร์โมน E_2 ที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ 3.87±0.61 9.11 ±1.04 และ 25.08±2.25 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และประสิทธิภาพต่ำสุดในการตรวจวัดจากกราฟมาตรฐานฮอร์โมน E_2 เท่ากับ 0.03 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่าความแม่นยำ (precision) จากค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการทำซ้ำตัวอย่างละ 4 หลอด ในการทดลอง 5 ครั้ง ของน้ำเลือดควบคุมคุณภาพที่มีระดับฮอร์โมน E_2 ค่าสูง กลาง และ ต่ำ ได้ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรในการทดลองเดียวกัน อยู่ระหว่าง 3.4-10.3 3.8-12.8 และ 2.0 - 11.0 เปอร์เซ็นต์ และระหว่างครั้งการทดลอง เท่ากับ 10.0 10.1 และ 7.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 15 กราฟแสดงความขนานกันระหว่างฮอร์โมน P_4 (A) และ E_2 (B) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย เจือจางอย่างอนุกรม 2 4 6 8 และ 16 เท่า เทียบขนานกับฮอร์โมน P_4 และ E_2 มาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

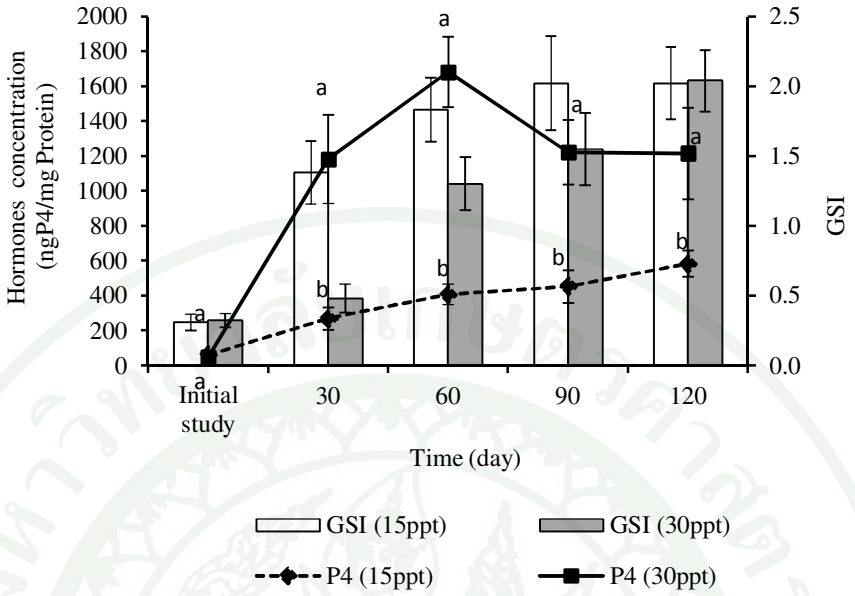
1.4 ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียด้วยวิธี RIA พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อ เนื่องตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งจะมีปริมาณความเข้มของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดมากกว่ากุ้งที่ความเค็มน้ำ 15 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ภาพที่ 16)

โดยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งทดลอง ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง และมีอัตราการเพิ่มสูงในวันที่ 30 (4.32 เท่า) ($P < 0.05$) จากนั้นฮอร์โมน P_4 มีอัตราการเพิ่มขึ้นในอัตราคงที่ เท่ากับ 1.51 1.11 1.22 เท่า ($P > 0.05$) ณ วันที่ 60 90 และ120 ตามลำดับ เช่นเดียวกับระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า ฮอร์โมน P_4 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ วันที่ 30 (24.62 เท่า) ($P < 0.05$) จากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน P_4 จะเริ่มมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนคงที่ คือ 1.42 0.72 และ 0.99 เท่า ($P > 0.05$) ณ วันที่ 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

นอกจากนี้ผลการศึกษายัง พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมทั้งจากความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI กุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 1.50 2.70 1.19 และ 1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีค่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งทดลอง เท่ากับ 4.45 1.32 1.10 และ1.14 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน P_4 (ngP_4/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt รวมทั้งแสดงค่า GSI ของกุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรที่แสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

\

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

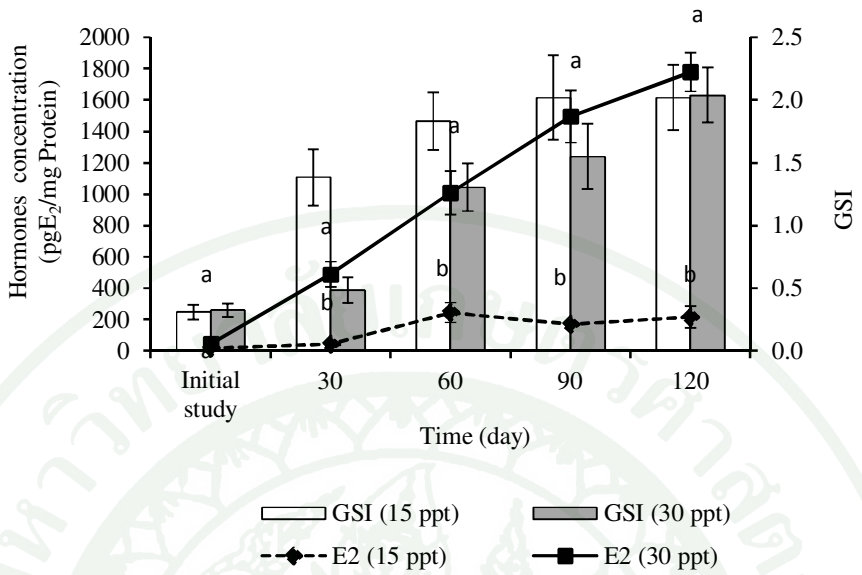
1.5 ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธี RIA พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน E_2 ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีปริมาณความเข้มมากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดลอง ฮอร์โมน E_2 มีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ วันที่ 60 (5.67 เท่า) ($P < 0.05$) จากนั้นฮอร์โมน E_2 มีอัตราการเพิ่มขึ้นคงที่กระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยฮอร์โมน E_2 ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้น เท่ากับ 2.46 5.67 0.68 และ 1.27 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตาม ลำดับ (ภาพที่ 17)

ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า ฮอร์โมน E_2 มีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยฮอร์โมน E_2 มีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ วันที่ 30 (11.06 เท่า) ($P < 0.05$) ต่อมาฮอร์โมน E_2 มีการเพิ่มขึ้นในอัตราส่วนลดลงกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดย ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของฮอร์-โมน E_2 เท่ากับ 11.06 2.07 1.48 และ1.18 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 17)

นอกจากนี้ผลการศึกษายัง พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม จากทั้งสองกลุ่มทดลองยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของดัชนีความสมบรูณ์พันธุ์ของกุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 1.50 2.70 1.19 และ 1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีค่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 4.45 1.32 1.10 และ1.14 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 17)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



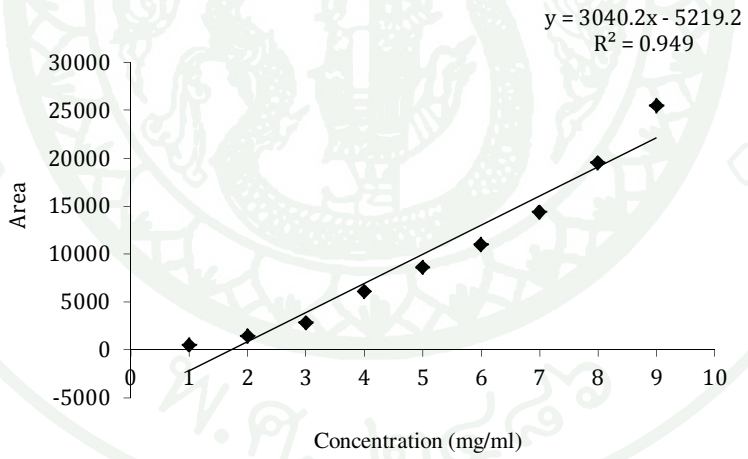
ภาพที่ 17 เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ย ของฮอร์โมน E_2 (pgE_2/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt รวมทั้งแสดงค่า GSI ของกุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรที่แสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.6 ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

1.6.1 กราฟมาตรฐานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$

ผลการนำฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน มาทำการเจือจางด้วย methanol solution ให้ได้ความเข้มข้น เท่ากับ 1=0.0009331, 2=0.01555, 3 = 0.02592, 4 = 0.0432, 5=0.072, 6=0.12, 7=0.18, 8=0.2, และ 9 = 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉีดผ่าน C_{18} คอลัมน์ RP-HPLC ขนาด 4.8 x 150 มิลลิเมตร โดยมี mobile phase เป็นสารละลายอะซีโตไนตรัล ความเข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชให้เป็นกรด (PH2.8) ด้วยฟอสฟอริคเอซิด (phosphoric acid, 85% v:v) ใช้อัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ผ่านเครื่องวัด spectophometer ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร และนำผลที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มาตรฐาน ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (1=0.0009331 2=0.01555 3=0.02592 4=0.0432 5=0.072 6=0.12 7=0.18 8=0.2 และ 9=0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RP-HPLC

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

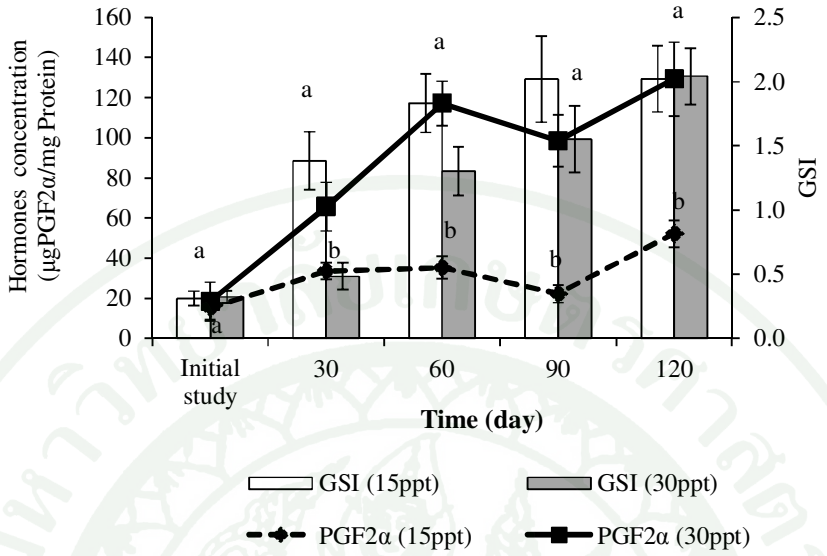
1.6.2 ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt พบว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้ง แต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีปริมาณความเข้มมากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดลอง (ภาพที่ 19) ส่วนระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ วันที่ 60 (4.34 เท่า) โดยฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt มีอัตราการเพิ่มขึ้น เท่ากับ 2.23 1.06 0.34 และ 4.43 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

เช่นเดียวกับที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งจะมีอัตราการเพิ่มสูงสุด (4.60 เท่า) เช่นกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งทดลอง พบว่า ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า ตลอดระยะเวลาการทดลองกุ้งจะมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ สูงกว่าที่ความเค็มน้ำ 30 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt มีอัตราการเพิ่มขึ้น เท่ากับ 3.64 1.85 0.23 และ 4.60 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

นอกจากนี้ผลการศึกษายังชี้ให้เห็นว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม จากทั้งสองความเค็ม (15 และ 30 ppt) ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของดัชนีความสมบรูณ์พันธุ์ของกุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 1.50 2.70 1.19 และ1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 4.45 1.32 1.10 และ 1.14 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 เปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของฮอร์โมน $PGF_{2}\alpha$ ($\mu gPGF_{2}\alpha$/mg Protein) ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt รวมทั้งแสดงค่า GSI ของกุ้งทดลอง ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรแสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของ Vg และ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 ไวเทลโลเจนนินยีน

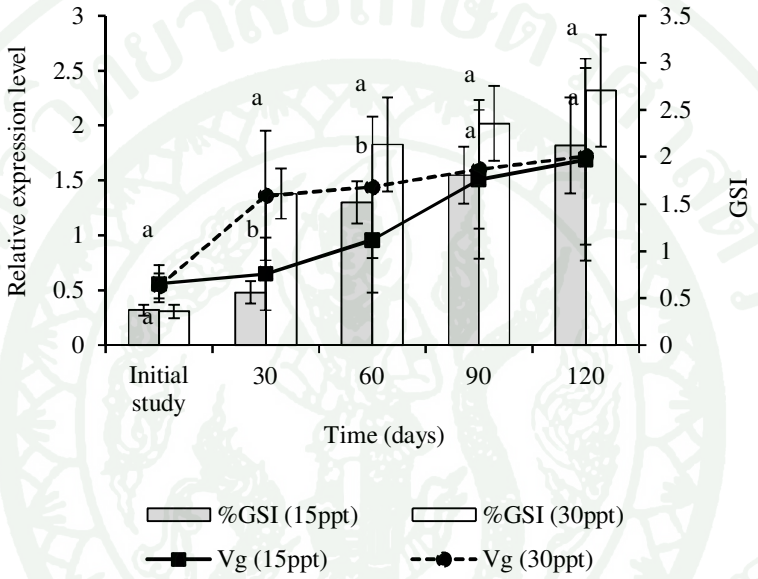
ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt พบค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งทดลอง พบว่า มีอัตราการแสดง ออกสัมพัทธ์ของ Vg gene สูงสุด ณ วันที่ 30 (2.52 เท่า) จากนั้นอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene เพิ่มขึ้นแบบคงที่กระทั้งสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งที่ความเค็มน้ำ 15 ppt พบว่า อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแบบคงที่ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั้งสิ้นสุดการทดลอง โดยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt เท่ากับ 1.16 1.16 1.15 และ1.12 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ และที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เท่ากับ 2.52 1.12 1.11 และ 1.07 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่20)

ในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นแบบคงที่ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ณ วันที่ 30 (3.11 เท่า) ต่อมาอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene จะเพิ่มขึ้นแบบคงที่กระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 ppt เท่ากับ 1.71 1.41 1.61 และ 1.13 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ และที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เท่ากับ 3.11 1.12 1.11 และ 1.01 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ) (ภาพที่ 21)

นอกจากนี้อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ทั้งในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมจากที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของดัชนีความสมบรูณ์พันธุ์ของกุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 1.50 2.70 1.19 และ 1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120

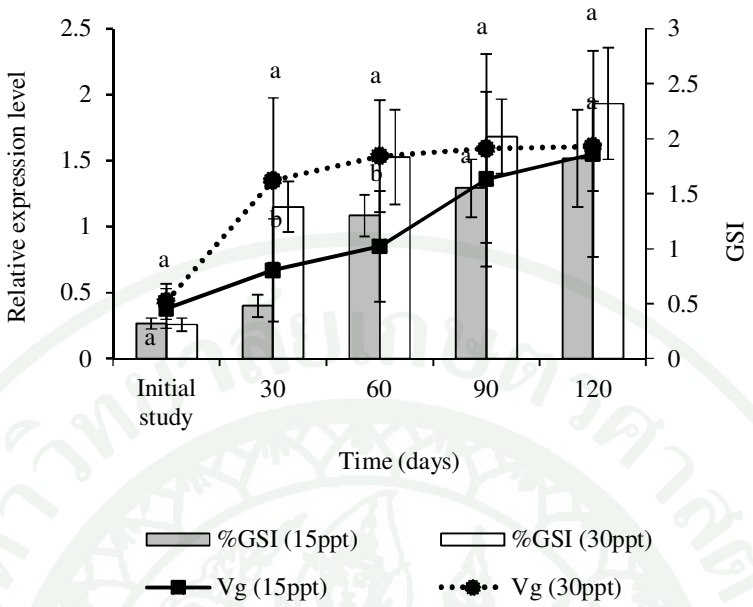
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีค่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 4.45 1.32 1.10 และ 1.14 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 20 และ 21)



ภาพที่ 20 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรแสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ 120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรแสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

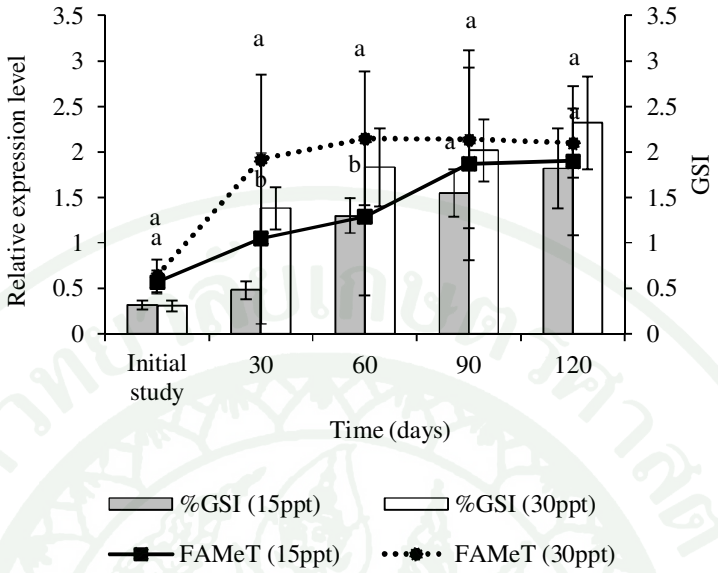
2.2 ยีนฟาร์นีโซอิก เอซิด โอ-เมทธิลทรานเฟอร์เรส

ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt พบว่า อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้น สุดการทดลอง โดยกุ้งที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่กุ้งจะมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีน FAMeT gene มากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ณ วันที่ 30 และ 60 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากนั้นอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene จะเพิ่มขึ้นแบบคงที่กระทั้งสิ้นสุดการทดลอง โดยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 ppt เท่ากับ 1.84 1.22 1.33 และ 1.04 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เท่ากับ 3.0 1.13 1.0 และ 1.0 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ (ภาพที่ 22)

ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt พบว่า อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยกุ้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งจะมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ใกล้เคียงกับที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ($p > 0.05$) ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt เท่ากับ 2.03 1.16 1.07 และ1.12 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt เท่ากับ 5.0 1.20 0.82 และ 1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ (ภาพที่ 23)

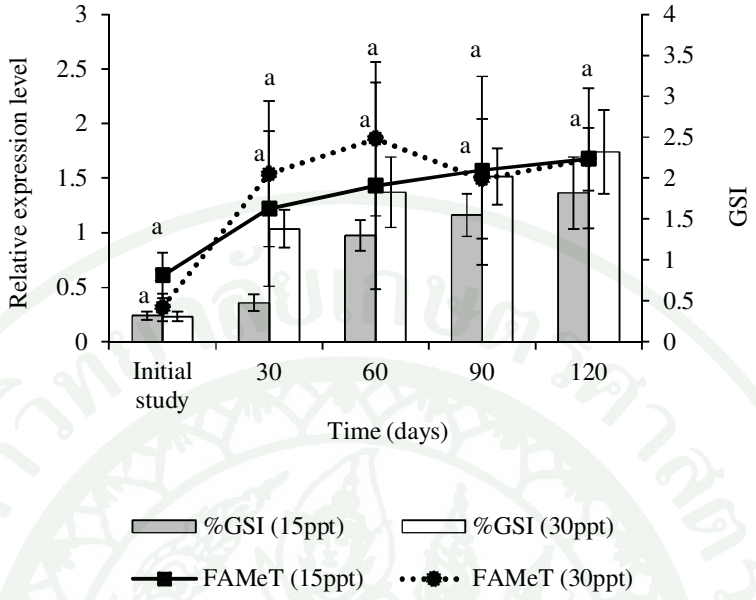
นอกจากนี้อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ทั้งในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมทั้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกับการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งทดลอง โดยที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 1.50 2.70 1.19 และ 1.17 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ120 ตามลำดับ ส่วนที่ความเค็มน้ำ 30 ppt กุ้งมีค่าอัตราการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เท่ากับ 4.45 1.32 1.10 และ 1.14 เท่า ณ วันที่ 30 60 90 และ 120 ตามลำดับ (ภาพที่ 22 และ 23)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรแสดงด้านบนกราฟเส้นที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 23 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ระหว่างที่ความเค็มน้ำ 15 กับ 30 ppt ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธีRT-PCR ณ วันที่ 0 30 60 90 และ120 รวมทั้งเปรียบเทียบกับค่า GSI ของกุ้งทดลอง (Mean±SD, n = 5) โดยอักษรแสดงบนกราฟเส้นที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ ช่วงเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ผลการศึกษาคุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกัน

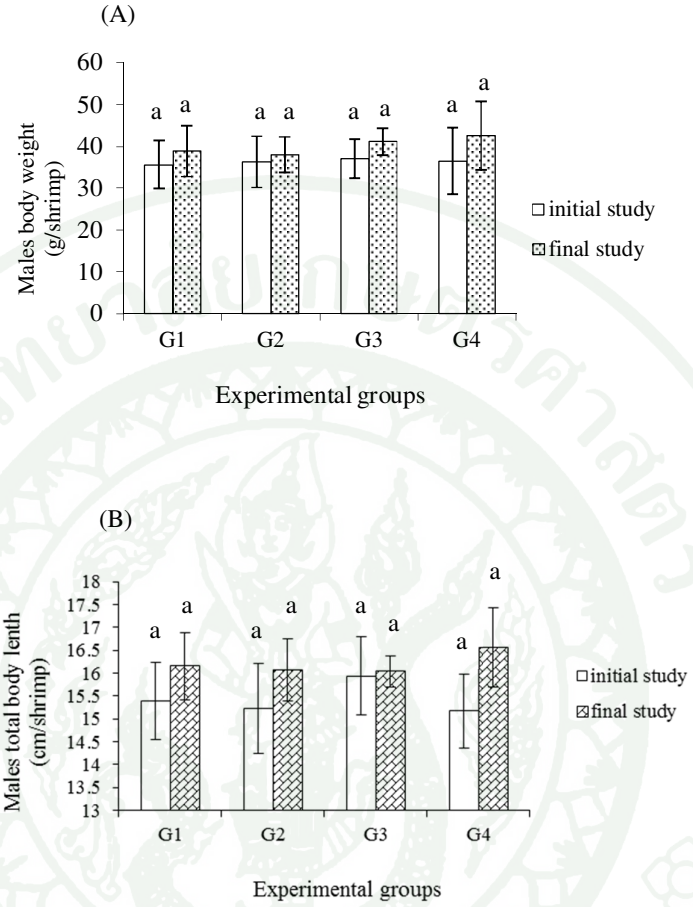
3.1 ผลการศึกษาคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมด้วยวิธีแบบดังเดิม

3.1.1 น้ำหนักและความยาวกุ้ง

ผลการวิเคราะห์น้ำหนักกุ้งทดลองในแต่ละเดือน พบว่า น้ำหนักกุ้งทดลองตั้งแต่เริ่มการทดลองกระทั้งสิ้นสุดการทดลองไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3และ4 โดยเริ่มต้นทดลองกุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 35.60±5.74 36.2± 6.11 36.99±4.65 และ 36.45±7.93 กรัมต่อตัว ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ และสิ้นสุดการทดลอง กุ้งมีน้ำหนักเฉลี่ย เท่ากับ 38.88± 6.10 37.95 ± 4.25 41.12 ±3.13 และ 42.55±8.23 กรัมต่อตัว ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 24)

เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ความยาวกุ้งทดลองในแต่ละเดือน พบว่า ความยาวกุ้งทดลองตั้งแต่เริ่มการทดลองกระทั้งสิ้นสุดการทดลองไม่มีความแตกต่าง ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3และ 4 โดยกุ้งมีความยาวเริ่มต้นทดลองเฉลี่ย เท่ากับ 15.39±0.85 15.22± 0.99 15.94±0.86 และ 15.17±0.81 เซนติเมตรต่อตัว ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ และสิ้นสุดการทดลองกุ้งมีความยาวเฉลี่ย เท่ากับ 16.15±0.73 16.07±0.68 16.04 ±0.70 และ 16.56±0.87 เซนติเมตรต่อตัว ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 24)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 น้ำหนัก(กรัมต่อตัว) และความยาว (เซนติเมตรต่อตัว) เฉลี่ยเริ่มต้นและสุดท้าย ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5) โดยอักษรที่เหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

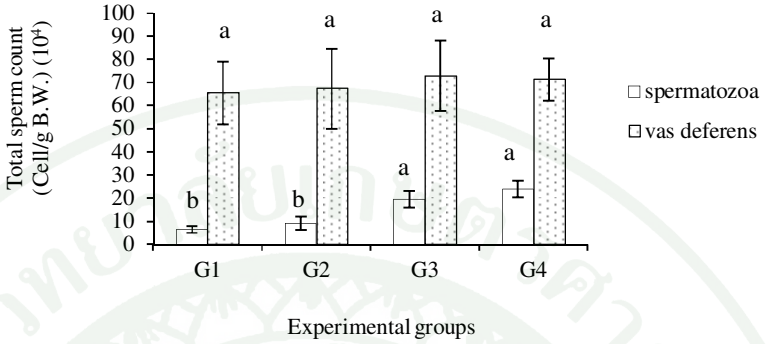
3.1.2 ปริมาณสเปิร์มสุทธิ (cell/g B.W.)

ในท่อนำสเปิร์ม (vas deferens) ผลการวิเคราะห์ปริมาณสเปิร์มสุทธิใน vas deferens ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า ปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) ไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) เช่นเดียวกับปริมาณสเปิร์มสุทธิใน vas deferens ของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) โดยปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 เท่ากับ $65.44(x10^4)\pm13.66$ $67.34(x10^4)\pm17.29$ $72.91(x10^4)\pm 5.23$ และ $71.22(x10^4)\pm9.16$ cell/g B.W. ตามลำดับ (ภาพที่ 25)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสเปิร์มสุทธิจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า ปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) ไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) เช่นเดียวกับปริมาณสเปิร์มสุทธิจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่า ไม่มีความแตก ต่างทางสถิต ($P>0.05$) โดยปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 เท่ากับ $6.42(x10^4)\pm1.35$ $9.09(x10^4)\pm2.93$ $19.51(x10^5)\pm3.66$ และ $23.94(x10^5)\pm3.71$ cell/g B.W. ตามลำดับ (ภาพที่ 25)

ในขณะที่ เมื่อนำปริมาณสเปิร์มสุทธิจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันทั้ง 4 กลุ่มทดลอง พบว่า ปริมาณสเปิร์มสุทธิทั้งใน vas deferens และ spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) มีปริมาณสเปิร์มสุทธิสูงสุด รองลงมาเป็นที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) ที่ความเค็มน้ำ 15 pptในบ่อซีเมนต์ (G2) และที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) ตามลำดับ (ภาพที่ 25)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 ปริมาณสเปิร์มสุทธิ (cell/g B.W.) คัดแยกจาก vas deferens และ spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5) โดยอักษรที่เหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4

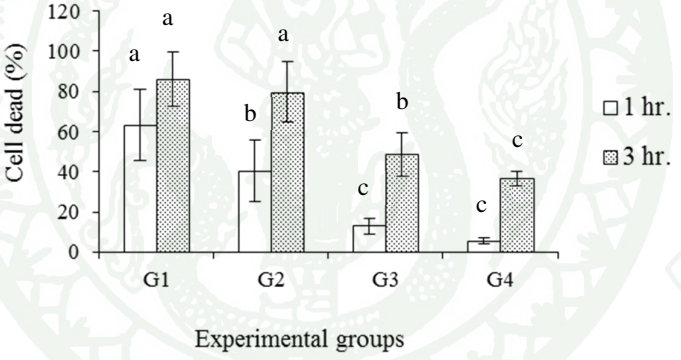
- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

3.1.3 เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์ม

ในช่วงเวลาการบ่ม 1 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มซึ่งคัดแยกสเปิร์มจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) ไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มในกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ที่ช่วงเวลาบ่มนาน 1 ชั่วโมง เท่ากับ 63.27± 17.93 40.32±15.29 12.88±3.77 และ 5.57±1.67 ตามลำดับ (ภาพที่ 26)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ช่วงเวลาการบ่มนาน 3 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มซึ่งคัดแยกสเปิร์มจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) ไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มในกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิต ($P>0.05$) โดยเปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ4 ที่ช่วงเวลาบ่ม 3 ชั่วโมง เท่ากับ 86.25±13.47 79.52± 15.02 28.65± 10.85 และ 16.53±3.39 ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 26)



ภาพที่ 26 เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มซึ่งคัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงเวลาการบ่มนาน 1 และ 3 ชั่วโมง (Mean±SD, n=5) โดยอักษรที่เหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

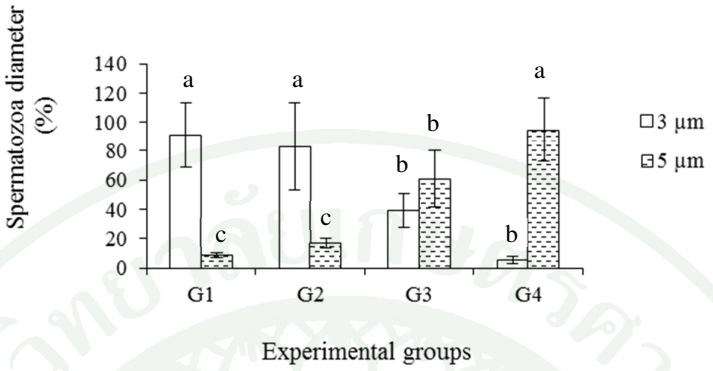
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.4 เปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 3 ไมโคร-เมตร ซึ่งคัดแยกสเปิร์มจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า สเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) กุ้งมีเปอร์- เซ็นต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 3 ไมโครเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิต (*P>0.05*) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 3 ไมโครเมตร ของสเปิร์มในกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่า กุ้งมีเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 3 ไมโคร-เมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิต (*P>0.05*) โดยเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ4 ขนาด 3 ไมโครเมตร เท่ากับ 91.25±22.16 83.22± 29.72 39.15±11.82 และ5.34±2.12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 27)

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 5ไมโคร-เมตร ซึ่งคัดแยกสเปิร์มจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเลี้ยงที่ระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันใน 4 กลุ่มทดลอง พบว่า สเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน (G1) กับกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G2) กุ้งมีเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 5 ไมโครเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิต (*P>0.05*) เช่นเดียว กับเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 5 ไมโครเมตร ของสเปิร์มในกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน (G3) กับเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ (G4) พบว่า กุ้งมีเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์ม ขนาด 5 ไมโครเมตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิต (*P>0.05*) โดยเปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ขนาด 5 ไมโครเมตร เท่ากับ 8.75±1.66 16.78±3.28 60.85±19.13 และ 94.7 ±21.62 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ (ภาพที่ 27)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 27 เปอร์เซ็นต์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของสเปิร์ม (3 กับ 5 ไมโครเมตร) ซึ่งคัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ 1 2 3 และ 4

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

3.2 ผลการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยเทคนิค comet assay

3.2.1 ผลการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ค่า Healthy cell Cell dead และ Comet cell ในโปรแกรม comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด

ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม โดยจำแนกคุณภาพสเปิร์มของกุ้งทดลองโดยใช้ตัวบ่งชี้วัดจากโปรแกรม comet assay ได้แก่ ค่า Healthy cell Cell dead และ Comet cell ผลการศึกษาแสดงให้ว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 4 ที่ความเค็ม 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ กุ้งมีค่า Healthy cell สูงที่สุด (42.88±12.36 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความแตก ต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p< 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 (12.25±2.36 เปอร์เซ็นต์) และ 2 (11.68±2.46 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน และ

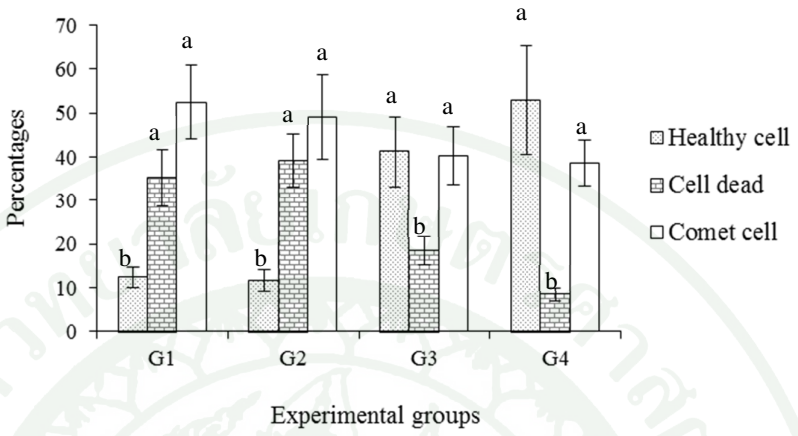
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ ในขณะที่ค่า Healthy cell ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 3 (51.22±7.98 เปอร์เซ็นต์) ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 4 (ภาพที่ 28)

ส่วนค่า Cell dead พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 2 (39.15±6.09 เปอร์-เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ พบว่า กุ้งมีค่า Cell dead สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 3 (18.5±3.29 เปอร์เซ็นต์) และ 4 (8.49±1.62 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ ส่วนสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 (35.26±6.51 เปอร์เซ็นต์) ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน พบว่า ค่า Cell dead ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 4 (ภาพที่ 28)

เช่นเดียวกับค่า Comet cell ผลการศึกษา พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 (52.49±8.35 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งมีค่า Cell dead สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 3 (40.28±6.71 เปอร์เซ็นต์) และ 4 (48.63±5.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ ส่วนกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 2 (49.17±9.66 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ พบว่า สเปิร์มมีค่า Comet cell ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 28)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 คุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมคัดแยกจาก spermatophores ของกุ้งขาวแวนนาไม (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

3.2.2 ผลการศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ค่าพารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด

ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม จำแนกคุณภาพสเปิร์มโดยใช้ พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ผลการวิเคราะห์ พบว่า คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวน-นาไมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีคุณภาพสารพันธุกรรมแตกต่างกัน ดังนี้

พารามิเตอร์ตัวแรกที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดถึงคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละกลุ่มทดลอง คือ ค่า Comet Length (px) พบว่า สเปิร์มในกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งมีค่า Comet Length (px) สูงที่สุด (447.3±34.08) มีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลองที่ 2(233.43±15.4) 3(126.56±2.98) และ 4(78.71±14.1) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ เช่นเดียว กับพารามิเตอร์ตัวถัดมา คือ ค่า Comet area (px) พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 1 กุ้งมีค่า Comet area (px) สูงที่สุด (171.26±13.27) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 2 (97.47±14.7) 3(61.64± 13.9) และ 4(47.54±13.1) (ภาพที่ 29)

สอดคล้องกับพารามิเตอร์ตัวต่อมา คือ ค่า Comet Mean Intensity (px) พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 กุ้งมีค่า Comet Mean Intensity (px) สูงที่สุด (89.9±13.8) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมจากกลุ่มทดลองที่ 2 (84.61±2.99) 3 (53.82±3.99) และ 4 (32.51±7.04) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตาม ลำดับ (ภาพที่ 29) และยังสอดคล้องกับพารามิเตอร์อีกตัว คือ ค่า Tail Length (px) ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่1 โดยกุ้งทดลองมีค่า Comet Mean Intensity (px) สูงที่สุด (225.67± 30.6) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 2 (121.12±13.94) 3 (88.43±18.68) และ 4 (30.77±13.33) (ภาพที่ 30)

เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์ DNA in Tail (px) ผลการศึกษา พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งมีค่าเปอร์เซ็นต์ DNA in Tail สูงที่สุด (28.96±2.94) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม กลุ่มทดลองที่ 2 (20.01±1.63) 3 (15.39±1.1) และ 4 (3.97 ±1.78) ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 pptในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ และค่า Tail moment ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมจากกลุ่มที่ 1 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งมีค่า Tail moment สูงที่สุด (37.35± 10.23) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 2 (8.6±1.18) 3 (5.75±1.59) และ 4 (1.42±0.84) ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ และค่า Olive Moment ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม กลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน พบว่า กุ้งทดลองมีค่า Olive Moment สูงที่สุด (17.88±4.65) มีความแตกต่างอย่างมีนัย

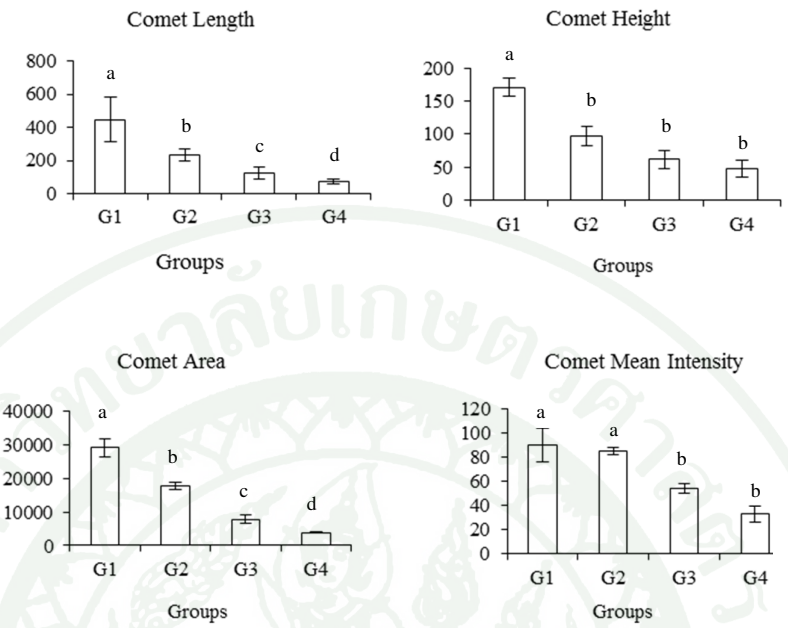
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 2 (4.4±0.8) 3 (3.3±1.13) และ 4 (0.97±0.44) (ภาพที่ 31)

ตรงกันข้ามกับค่าพารามิเตอร์ที่เหลือ ได้แก่ ค่า Head Diameter (px) ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มทดลองที่ 4 ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ กุ้งมีค่า Head Diameter (px) สูงที่สุด (67.94±1.76) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 (19.63±13.68) 2 (22.37±9.25) และ 3 (48.13±6.29) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน ตามลำดับ เช่นเดียวกับค่า Head Mean Intensity (px) ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มที่ทดลองที่ 4 พบว่า กุ้งทดลองมีค่า Head Diameter (px) สูงที่สุด (58.38±7.09) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มที่ทดลองที่1 (21.3±4.3) 2 (22.92±2.78) และ 3 (32.74±4.39) (ภาพที่ 31)

เช่นเดียวกับค่าเปอร์เซ็นต์ DNA in Head ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 4 ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ พบว่า กุ้งทดลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ DNA in Head สูงที่สุด (76.03±7.78) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 1 (21.04±12.94) 2 (31.99±11.63) และ 3 (56.61±8.1) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 15 ppt ในบ่อดิน ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ และความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน ตามลำดับ (ภาพที่ 31)

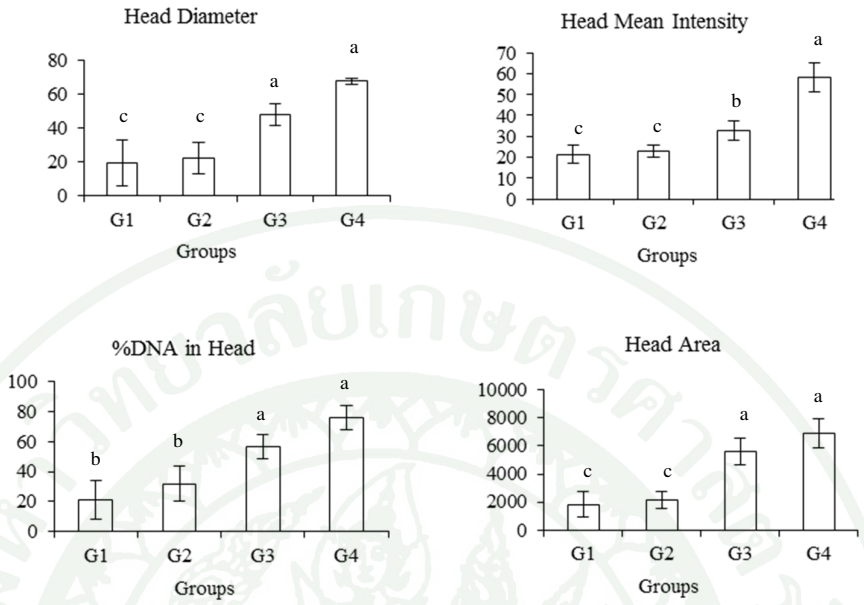
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 29 คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ Comet Length (px) Comet Height (px) Comet Area (px) และ Comet Mean Intensity (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 pptในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

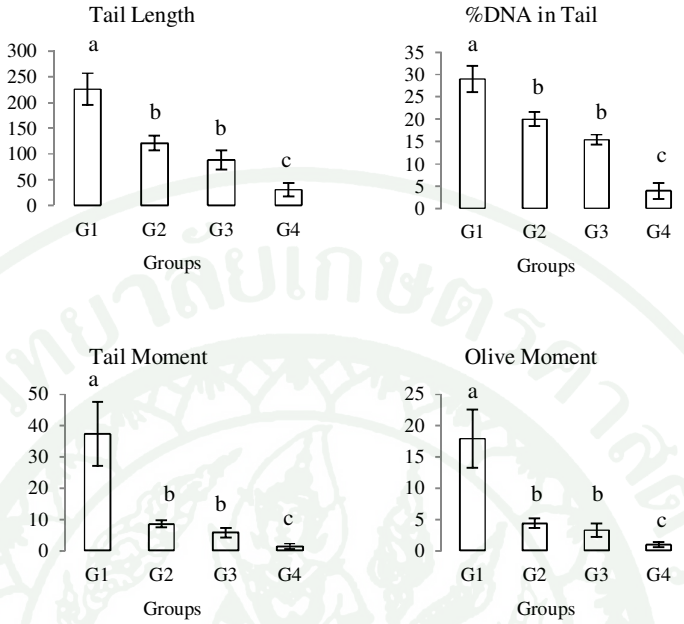
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 30 คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ Head Diameter (px) Head Mean Intensity (px) %DNA in Head และ Head Area (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

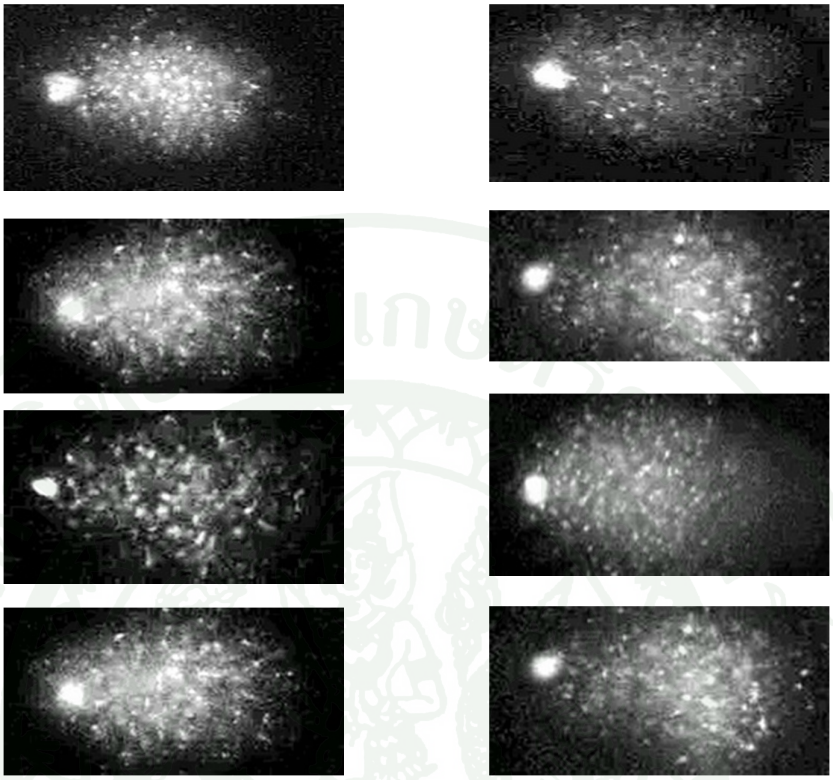
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 31 คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ %DNA in Tail Tail Moment Olive Moment และTail Length (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดิน
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์

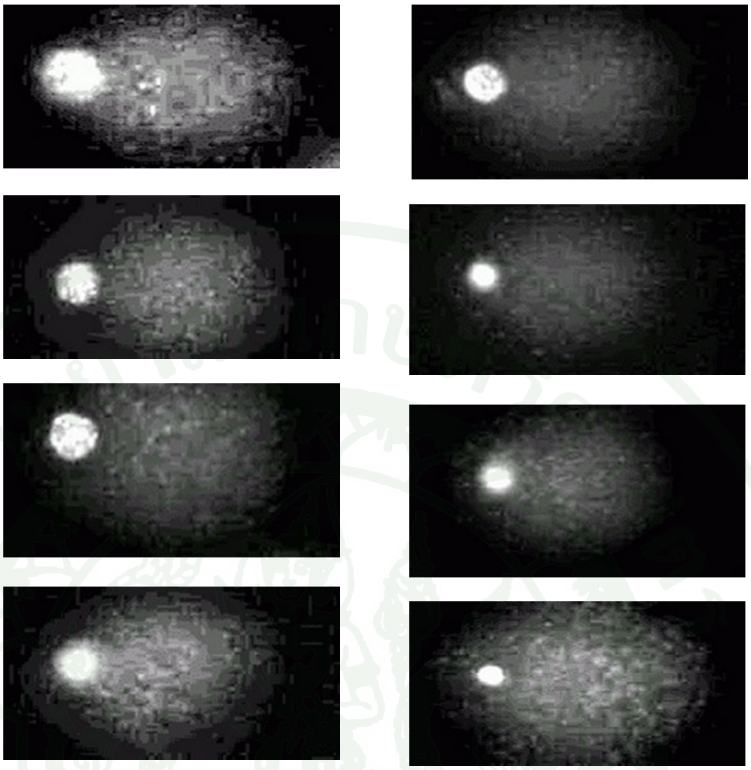
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ 2

ภาพที่ 32 คุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ 1 และ 2 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน และบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ กำลังขยาย 40 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ 4

ภาพที่ 33 คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ 3 และ 4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ตามลำดับ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ กำลังขยาย 40 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนอร์เพลียสกับคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม

4.1 ผลการศึกษาคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีแบบดังเดิม

4.1.1 ค่าน้ำหนักและความยาว

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลน้ำหนักและความยาวของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า กุ้งทดลองมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ย เท่ากับ 41.52±2.34 42.52±1.54 43.62±1.11 และ 43.0±0.61 กรัมต่อตัว ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ตามลำดับ เช่นเดียวกับความยาวสุดท้ายของกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า กุ้งทดลองมีความยาวสุดท้ายเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยกุ้งมีความยาวสุดท้ายเฉลี่ย เท่ากับ 16.32±0.25 16.26±0.25 16.16±0.50 และ 16.46±0.29 เซนติเมตรต่อตัว ในกลุ่มที่ทดลองที่ 1 2 3 และ4 ตามลำดับ

เช่นเดียวกับน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองมีน้ำหนักสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 68.24± 2.06 68.06±2.91 69.90±1.43 และ 68.82±0.89 กรัมต่อตัว ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ และความยาวสุดท้ายของกุ้งทดลองในแต่ละกลุ่ม พบว่า กุ้งทดลองมีความยาวสุดท้ายเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองมีความยาวสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 18.22 ± 0.75 18.70 ± 0.76 19.12 ±1.05 และ 19.90 ±0.42 เซนติเมตรต่อตัว ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ

4.1.2 ปริมาณนอร์เพลียส

ผลการวิเคราะห์ปริมาณนอร์เพลียสของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า กุ้งทดลองมีปริมาณนอร์เพลียสในแต่ละกลุ่มทดลองแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) โดยกุ้งทดลองกลุ่มที่ 4 กุ้งมีปริมาณนอร์เพลียสเฉลี่ยสูงสุด (21.38($x10^4$) ±1.14) รองลงมาเป็นกุ้งทดลองกลุ่มที่ 3 (16.76 ($x10^4$) ±0.97) 2 (12.18 ($x10^4$) ±1.17) และ 1(6.78($x10^4$) ±1.61 ตัว) ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.3 ระยะเวลา (วัน) ในการสร้างถุงสเปิร์ม (spermatophore formation)

ผลการศึกษา พบว่า ระยะเวลา (วัน) ในการสร้างถุงสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมในแต่ละกลุ่มทดลอง พบกุ้งทดลองทั้ง 4 กลุ่มใช้ระยะเวลาในการสร้างถุงสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองใช้ระยะเวลาในสร้างถุงสเปิร์ม เท่ากับ 7.2±1.09 5±0.70 4.6±0.58 และ 3.4±0.54 วัน ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ

4.1.4 ปริมาณสเปิร์มสุทธิ (cell/g B.W.)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสเปิร์มสุทธิของกุ้งทดลองทั้ง 4 กลุ่ม พบว่า กุ้งทดลองทั้ง 4กลุ่มมีปริมาณสเปิร์มสุทธิในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองมีปริมาณสเปิร์มสุทธิ เท่ากับ 4.12($x10^6$) ±0.65 4.72($x10^6$) ±0.94 4.87($x10^6$) ±0.25 และ 4.26($x10^6$) ±0.31 เซลล์ในกลุ่มที่1 2 3 และ 4 ตามลำดับ

4.1.5 เปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์ม

เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย ของสเปิร์มกุ้งทดลองทั้งสี่กลุ่ม พบว่า กุ้งทดลองทั้งสี่กลุ่มสเปิร์มมีค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยกุ้งทดลองแต่ละกลุ่มมีค่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ตายของสเปิร์มกุ้งทดลอง เท่ากับ 34.40±7.04 36.90±11.95 37.60±10.58 และ 42.00±10.30 ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ตามลำดับ

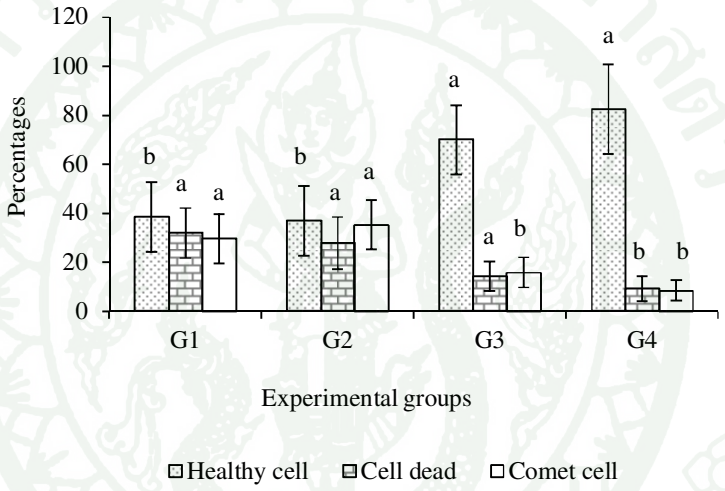
4.2 ผลการศึกษาคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์

4.2.1 ผลการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ค่า Healthy cell Cell dead และ Comet cell ในโปรแกรมโคเมท แอสเสย์ เป็นตัวบ่งชี้วัด

ผลการวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ตัวบ่งชี้วัด คือ Healthy cell Cell dead และComet cell พบว่า กุ้งทดลองในกลุ่มที่ 4 (82.40±8.29) กุ้งมีค่าเปอร์ เซ็นต์ Heath cell สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปอร์ เซ็นต์ Heath cell ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (38.40±14.31) 2 (37.00±14.27) และ 3 (70.00±

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.06) ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ Cell dead ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (32.00± 10.20) มีค่าสูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ Cell dead ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 3 (14.20±6.06) และ 4 (9.20±5.22) ในขณะที่ค่าเปอร์-เซ็นต์ Comet cell ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 2 (30.80±10.10) มีค่าเปอร์-เซ็นต์ Comet cell สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์ Comet cell ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 3 (13.40±6.11) และ 4 (8.40±4.16) (ภาพที่ 34)



ภาพที่ 34 คุณภาพสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 6.78($x10^4$) ±1.61 ตัว
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 12.18($x10^4$)±1.17 ตัว
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 16.76($x10^4$)±0.97 ตัว
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 21.38($x10^4$)±1.14 ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.2 ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ด้วยวิธีโคเมท แอสเสย์ โดยใช้ตัวบ่งชี้วัด คือ โคเมท พารามิเตอร์

ผลการวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ทั้ง 4 กลุ่ม โดยใช้ตัวบ่งชี้วัด คือ โคเมท พารามิเตอร์ ซึ่งการนำเสนอผลการวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมทั้ง 4 กลุ่ม ในครั้งนี้ ผู้วิจัยได้นำเสนอผลโดยใช้ทิศทางของพารามิ-เตอร์ที่ให้ ผลในทิศทางเดียวกันและตรงข้ามกันกับจำนวนลูกกุ้งวัยอ่อนที่ได้เป็นเกณฑ์ในการบรรยายผล ดังนี้

กลุ่มที่แรก คือ กลุ่มที่พารามิเตอร์ที่ให้ผลในทิศทางตรงข้ามกันกับจำนวนลูกกุ้งวัยอ่อน โดยพารามิเตอร์ตัวแรก คือ ค่า Comet Length (px) พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (150.672± 113.91) สเปิร์มมีค่า Comet Length สูงสุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Comet Length (px) ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 2 (116.808±48.82) 3 (79.208±19.33) และ 4 (71.62± 24.15) เช่นเดียวกับพารามิเตอร์ตัวที่สอง คือ ค่า Tail Length (px) ผลการศึกษาพบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (110.70±97.93) สเปิร์มของกุ้งทดลองมีค่า Tail Length (px) สูงสุดซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Tail Length (px) ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 2(77.84±41.27) 3(50.98±18.17) และ 4(44.18±21.83) และพารามิเตอร์ตัวที่สาม คือ ค่า Comet Mean Intensity (px) พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1(115.274±28.89) สเปิร์มมีค่า Comet Mean Intensity (px) สูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Comet Mean Intensity (px) ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 3 (87.757±11.57) และ 4(70.93±26.08) (ภาพที่ 35)

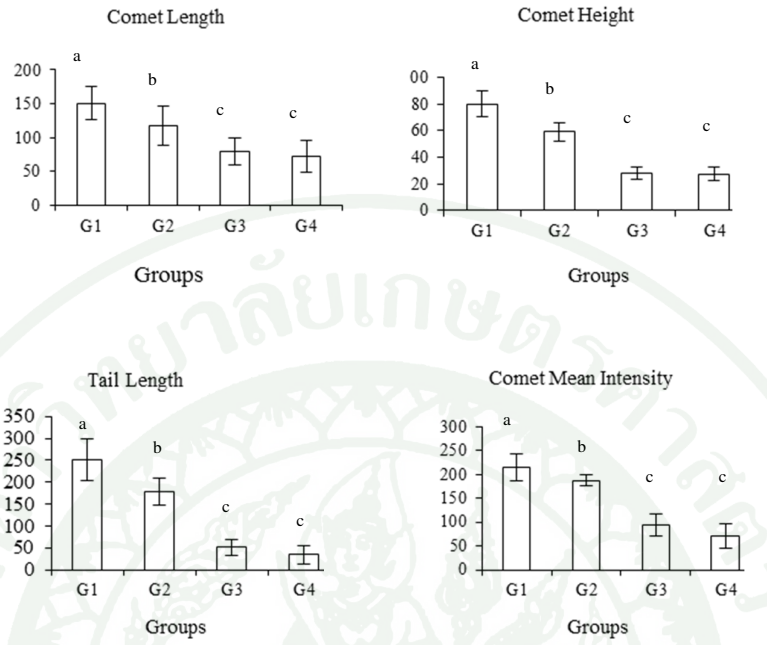
พารามิเตอร์ตัวที่สี่ คือ ค่า Comet area (px) ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (7909.9± 9127.59) ซึ่งสเปิร์มมีค่า Comet area (px) สูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Comet area ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 2 (4950.9±3269.81) 3 (2267.7±774.45) และ 4 (2033.5± 1001.38) เช่นเดียวกับพารามิเตอร์ตัวที่ห้า คือ ค่า %DNA in Tail ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (16.88±10.13) และ 2 (15.18±9.11) สเปิร์มมีค่า %DNA in Tail สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า %DNA in Tail ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 3 (6.21± 3.69) และ 4 (3.26±3.54) รวมทั้งพารามิเตอร์ตัวที่หก คือ ค่า Tail moment ผลการ ศึกษา พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (23.93±16.87) สเปิร์มมีค่า Tail moment (px) สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Tail moment (px) ของกุ้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลองกลุ่มที่ 2(6.10±1.18) 3 (3.17 ± 0.28) และ 4(1.52±1.016) และพารามิเตอร์ตัวที่เจ็ด คือ ค่า Olive Moment (px) ผลการศึกษา พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1(12.66±14.74) สเปิร์มมีค่า Olive Moment (px) สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Olive Moment ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 2(3.97 ±4.66) 3(1.44±0.85) และ 4(0.88±1.07) (ภาพที่ 36)

ส่วนกลุ่มที่สอง คือ กลุ่มที่พารามิเตอร์ที่ให้ผลในทิศทางเดียวกันกับจำนวนลูกกุ้งวัยอ่อน ดังนี้ พารามิเตอร์ตัวแรก คือ ค่า Head Diameter (px) พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 3(38.96± 10.95) และ 4(39.96±19.78) สเปิร์มมีค่า Head Diameter (px) สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัย สำคัญทางสถิติ(*P<0.05*) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Head Diameter (px) ของกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (27.44 ±5.47) และ 2(28.22± 4.57) เช่นเดียวกับพารามิเตอร์ตัวถัดมา คือ Head Area (px) พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 4(7908.9±9127.59) สเปิร์มมีค่า Head Area (px) สูงสุดซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำ คัญทางสถิติ (*P<0.05*) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Head Area (px) ของกุ้งทดลองกลุ่ม 1(2032.52± 1001.38) 2(2266.71±774.45) และ 3(4949.92 ±3269.81) และพารามิเตอร์ตัวสุดท้าย คือ ค่า Head Mean Intensity (px) พบว่า กุ้งทดลองกลุ่ม 4(112.06±29.81) สเปิร์มมีค่า Head Mean Intensity (px) สูงสุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า Head Mean Intensity (px) ของกุ้งทดลองกลุ่ม 1(59.95± 26.21) 2(88.47±23.39) และ 3(82.44± 12.04) (ภาพที่ 37)

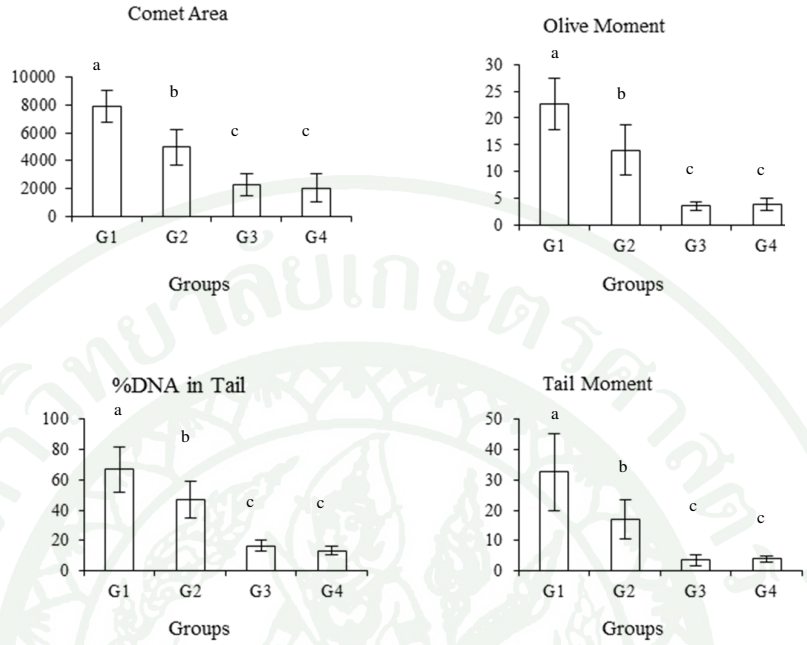
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 35 คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ ค่า Comet Length (px) Comet Height (px) Tail Length (px) และ Comet Mean Intensity (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งต่างที่กัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 6.78($x10^4$) ±1.61 ตัว
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 12.18($x10^4$)±1.17 ตัว
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 16.76($x10^4$)±0.97 ตัว
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 21.38($x10^4$)±1.14 ตัว

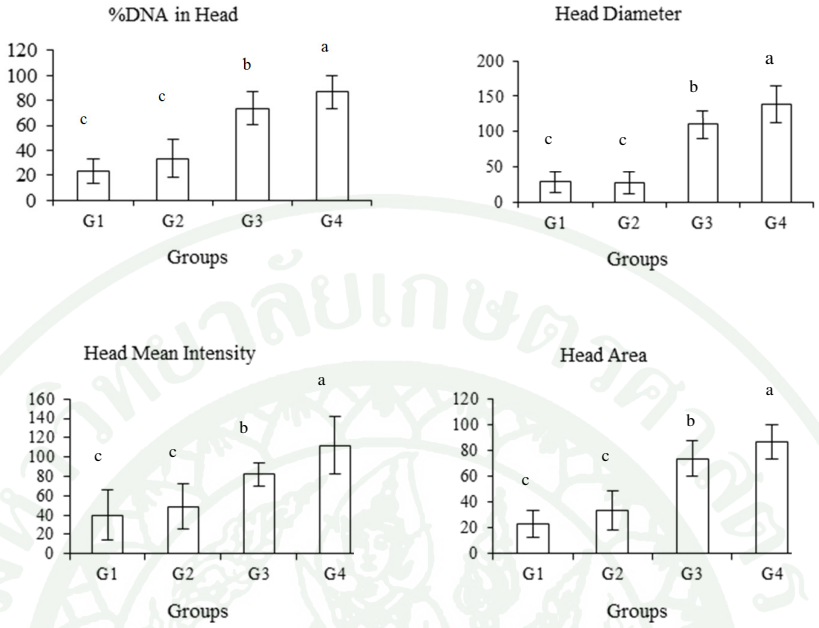
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 36 คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ Comet Area (px) Olive Moment %DNA in Tail และ Tail Moment เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 6.78($x10^4$) ±1.61 ตัว
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 12.18($x10^4$)±1.17 ตัว
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 16.76($x10^4$)±0.97 ตัว
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 21.38($x10^4$)±1.14 ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 37 คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลโดยใช้ 4 พารามิเตอร์จากโปรแกรม comet assay ได้แก่ %DNA in Head Head diameter (px) Head mean Intensity (px) และ Head Area (px) เป็นตัวบ่งชี้วัด (Mean±SD, n=5) โดยอักษรเหนือกราฟแท่งที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง

- G1 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 6.78($x10^4$) ±1.61 ตัว
- G2 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 12.18($x10^4$)±1.17 ตัว
- G3 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 16.76($x10^4$)±0.97 ตัว
- G4 คือ กลุ่มทดลองที่มีปริมาณนอร์เพลียส 21.38($x10^4$)±1.14 ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ (Correlation analysis) ระหว่างนอร์เพลียส กับคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม

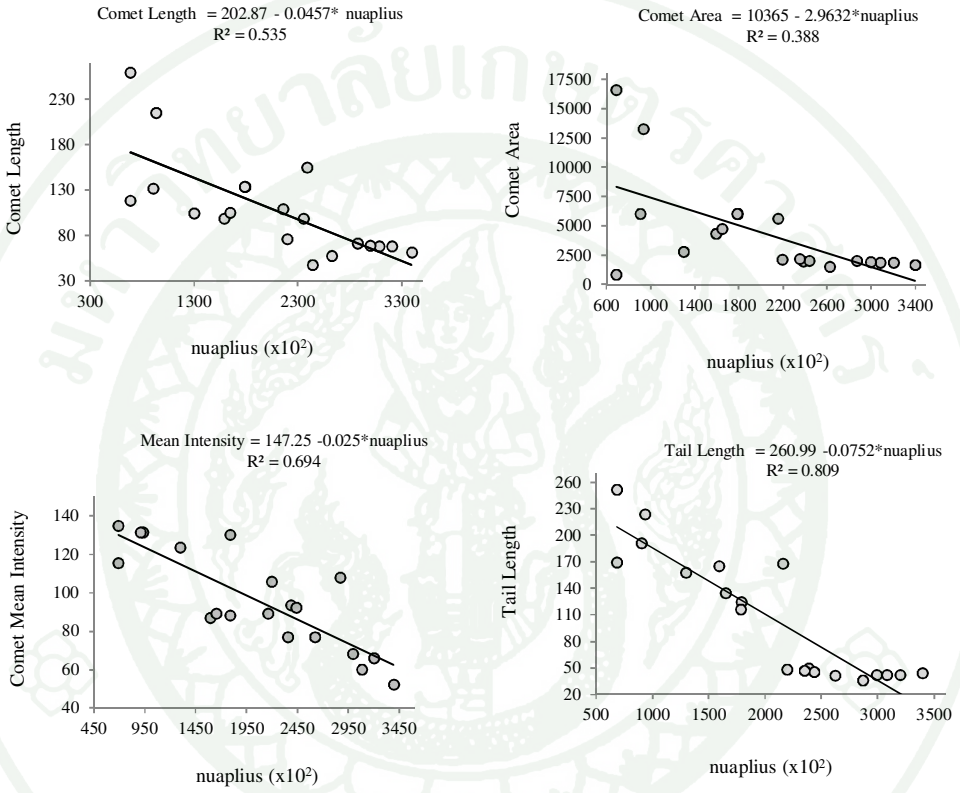
ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์อย่างง่าย (simple correlation) โดยไม่มีการควบคุมอิทธิพลของปัจจัยตัวอื่น ๆ ระหว่างคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมกับปริมาณนอร์เพลียส ผู้วิจัยได้นำเสนอผลการศึกษาเป็นภาพกราฟเส้นตรง (regression linear) เพื่อแสดงทิศทางความสัมพันธ์ในแต่ละกลุ่มทดลองซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถจำแนกออกเป็นสองกลุ่มแบ่งตามทิศทางความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง ดังนี้

กลุ่มที่แรก คือ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมทพารามิเตอร์ ซึ่งคำนวณจากคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส ที่ให้ผลความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงแสดงไปในทิศทางตรงกันข้าม โดยค่าโคเมท พารามิเตอร์ของคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งให้ผลความสัมพันธ์เป็นภาพกราฟเส้นตรงแสดงไปในทิศทางตรงกันข้ามกันกับปริมาณนอร์เพลียสที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้แก่ ค่า Comet length ซึ่งผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์อย่างง่าย พบว่า เมื่อปริมาณนอร์เพลียสของกุ้งขาวแวนนาไมมีทิศทางเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงคุณภาพสเปิร์มดีขึ้นซึ่งสามารถทำนายผลได้จากค่า Comet length ($r = -0.54$, $p = 0.00$) ของเซลล์สเปิร์มที่นำมาเป็นตัวบ่งชี้วัดในครั้งนี้ซึ่งมีทิศทางลดลงเช่นเดียวกับค่า Comet area ($r = -0.39$, $p = 0.00$) และค่า Comet mean intensity ($r = -0.69$, $p = 0.00$) ของสเปิร์ม นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ผลได้จากค่า Tail length ($r = -0.46$, $p = 0.00$) ค่าTail mean intensity ($r = -0.40$, $p = 0.00$) ค่า %Tail moment ($r = -0.70$, $p = 0.00$) และค่า %DNA in tail ($r = -0.80$, $p = 0.00$) รวมทั้งค่า Olive moment ($r = -0.70$, $p = 0.00$) ทุกค่าโคเมทพารามิเตอร์ที่กล่าวมาข้างต้นที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดถึงคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแววนาไมได้ โดยแสดงกราฟเส้นตรงของความสัมพันธ์ (ภาพที่ 38 และ 39)

ส่วนกลุ่มที่สอง คือ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อน ที่ให้ผลความสัมพันธ์เป็นภาพกราฟเส้นตรงแสดงไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณลูกกุ้งวัยอ่อน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้แก่ ค่า Head area ซึ่งผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์อย่างง่าย พบว่า เมื่อปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนมีทิศทางเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นถึงคุณภาพสเปิร์มดีขึ้น ซึ่งสามารถทำนายผลได้จากค่า Head area ($r = 0.40$, $p = 0.00$) ที่มีทิศทางการเพิ่มขึ้นและลดลงไปในทิศทางเดียวกับปริมาณลูกกุ้งวัยอ่อน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับค่า Head diameter ($r = 0.20$, $p = 0.00$) ค่า %DNA in head ($r = 0.83$, $p = 0.00$) และ ค่า Head

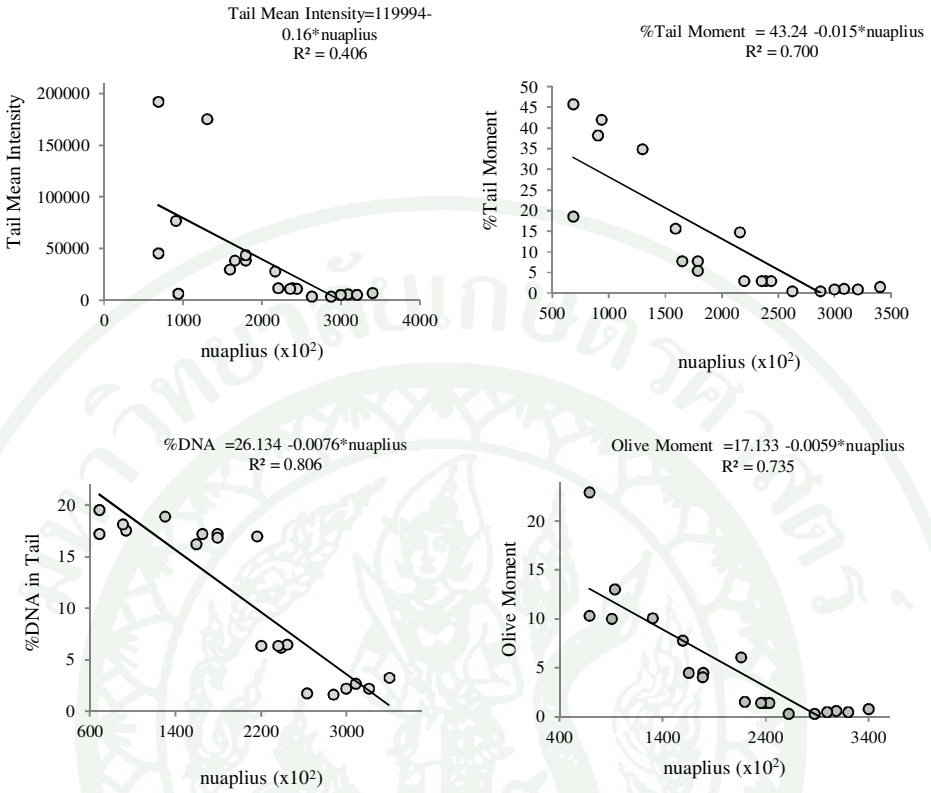
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

mean intensity (r = 0.40, p = 0.00) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังสามารถที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดถึงคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนาไมได้ โดยแสดงกราฟเส้นตรงของความสัมพันธ์ (ภาพที่ 40)



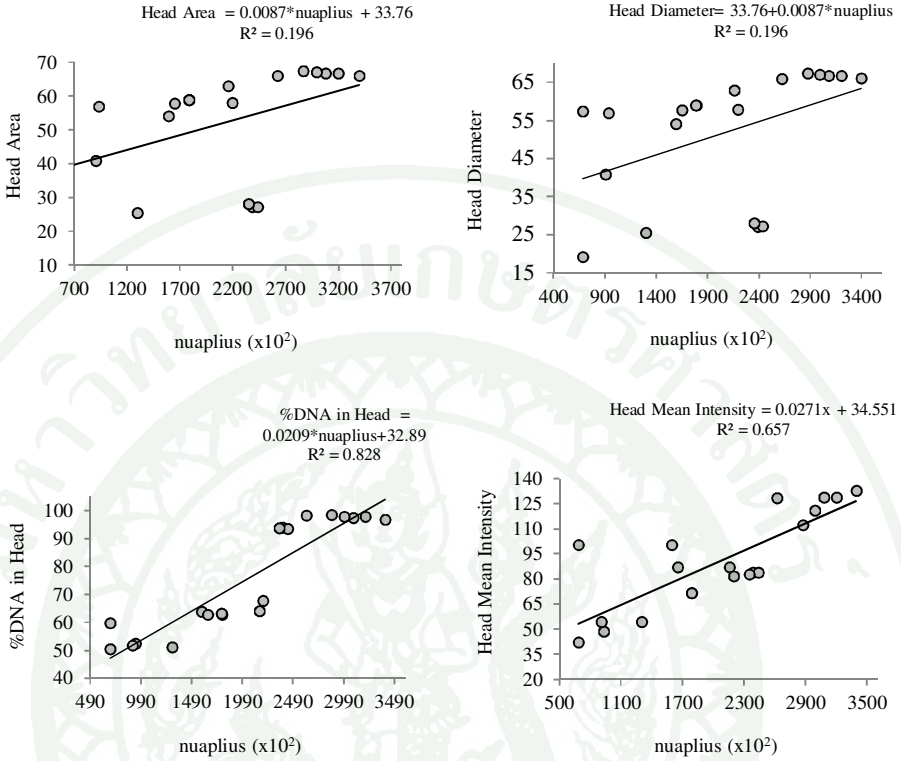
ภาพที่ 38 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Comet length (px) Comet area (px) Comet mean intensity (px) และ Tail length (px)) ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส โดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทางตรงข้ามกัน (Mean±SD, n=5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Tail mean intensity (px) %Tail moment %DNA in tail และ Olive moment) ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส โดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทางตรงข้ามกัน (Mean±SD, n=5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 40 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าโคเมท พารามิเตอร์ (Head area (px) Head diameter (px) %DNA in head และ Head mean intensity (px)) ของคุณภาพสเปิร์มกับปริมาณนอร์เพลียส โดยแสดงความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงในทิศทางเดียวกัน (Mean±SD, n=5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

1. ฮอร์โมน P_4 และ E_2

ผลการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 15 และ30 ppt พบว่า ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt สเตอรอยด์เพศทั้งสองตัวจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นมากกกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ข้อมูลเชิงประจักษ์ข้างต้นชี้ให้เห็นว่า ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt กุ้งมีความจำเป็นต้องปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกายให้คงที่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งที่น้ำความเค็มต่ำจะมีผลกระทบด้านลบต่อการดำรงชีวิตของกุ้ง โดยเฉพาะผลกระทบต่อระดับของ Na^+ และ K^+ ในกิจกรรมของ Na^+- K^+ ATPase ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมสมดุลอิออนในร่างกายของกุ้ง (Wang *et al*., 2003) นอกจากนี้กิจกรรม Na^+- K^+ ATPase ยังส่งผลต่อเนื่องไปพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้ง โดยในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ พบว่า ความเค็มต่างระดับและเกลือแร่บางชนิดมีผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์กุ้ง (สิทธิโชค, 2545) และนี้จึงเป็นสาเหตุที่ไม่ค่อยพบกุ้งทะเลในกลุ่มพีนีอิดตัวเต็มวัยหรือกุ้งที่สมบูรณ์เพศในบริเวณน้ำความเค็มต่ำบริเวณชายฝั่งทะเล เพราะกุ้งตัวเต็มวัยมีประสิทธิภาพในปรับสภาพความเข้มข้นของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกายได้ด้อยกว่ากุ้งวัยรุ่น

การรักษาสภาพสมดุลของร่างกาย (homeostasis) นอกจากจะอยู่ภายใต้การควบคุมของกิจกรรม Na^+- K^+ ATPase แล้วยังอยู่ภายใต้การควบคุมของสเตอรอยด์ ฮอร์โมน (Watanbe *et al*., 2006) คล้ายกับปลาและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งสเตอรอยด์ ฮอร์โมนที่ควบคุมเหล่านี้เป็นสารชีวภาพที่ออกฤทธิ์ในเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งทุกระยะในระหว่างที่เกิดกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Fairs *et al*., 1990) สอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt อัตราการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน P_4 และE_2 สูงกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ($P < 0.05$) และที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ยังพบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของสเตอรอยด์เพศทั้งสองชนิดนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม

โดยทั่วไปฮอร์โมน P_4 และ E_2 จัดเป็นสเตอรอยด์เพศที่สำคัญของระบบสืบพันธุ์ในครัสตาเชียน สเตอรอยด์เพศทั้งสองชนิดนี้จะมีบทบาทในการช่วยส่งเสริมพัฒนาการของไข่ครัสตาเชียน (Nagabhushanam *et al*., 1980; Yano, 1985, 1987; Quinitio *et al*., 1994; Fingerman *et al*., 1993) ซึ่งทำหน้าที่โดยตรงกับกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (Fairs *et al*.,1989) คือ การเพิ่มเส้นผ่าศูนย์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลางของไข่ในกุ้งขาวแวนนาไม (Tsukimura and Kamemoto, 1991) ในกุ้งก้ามกราม พบว่า ในช่วงก่อนการเจริญของไข่ ฮอร์โมน E_2 จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ไข่ระยะที่ 2 จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง ซึ่งแสดงว่าฮอร์โมน E_2 อาจมีหน้าที่กระตุ้นพัฒนาการรังไข่ระยะก่อนการสืบพันธุ์ และการที่ฮอร์โมน E_2 ขึ้นสูงตอนแรกๆ แล้วลดต่ำลงนั้น จึงสันนิษฐานได้ว่าฮอร์โมน E_2 สังเคราะห์จากรังไข่แล้วปล่อยสู่น้ำเลือดก่อนจะถูกลำเลียงผ่านกระแสเลือดไปยังเซลล์ตับและตับอ่อนเพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์สารโปรตีนไวเทลลินในลำดับต่อไป (Martin *et al*., 2007)

ที่ผ่านมาฮอร์โมน P_4 ได้ถูกรายงานว่า ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมน Vitellogenesis Stimulating Ovarian Hormone (VSOH) (Fingerman *et al*., 1993) หรือแอนโดรเจน และฮีสโตรเจน (Xu and Barker, 1990) สอดคล้องกับ Paolucci *et al*. (2002) รายงานว่า การศึกษาทางด้านระบบภูมิคุ้มกันของเครย์ฟิช (*Austropotamobius pallipes*) พบว่า โปรเจสเตอโรนตัวรับหรือจับ และแอสตราไดออลตัวรับ หรือจับในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อน ซึ่งผลการวิจัยฉบับนี้ชี้ให้เห็นว่า ฮอร์โมนสองชนิดนี้มีส่วนสำคัญในการส่งเสริมการเจริญพันธุ์ในเครย์ฟิช เพียงแต่มีหน้าที่ต่างกันในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ Yano (1985) ได้ทดลองฉีดฮอร์โมน P_4 ให้แก่กุ้งตะกาด พบว่า ฮอร์โมน P_4 สามารถกระตุ้นการเจริญ เติบโตของเซลล์ไข่ได้ และยังพบรายงานสนับสนุนเพิ่มเติมโดย Meunpol *et al*. (2007) รายงานว่า ระดับของฮอร์โมน P_4 ในรังไข่กุ้งกุลาดำจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากเซลล์ไข่ระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 ในขณะที่ ฮอร์โมน E_2 ออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของไข่ของ decapods ช่วงต้นเท่านั้น

2. ฮอร์โมน $PGF_2\alpha$

เช่นเดียวกับสเตอรอยด์เพศทั้งสองชนิดที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น ฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ เป็นอีกชนิดหนึ่งที่ได้ตรวจวัดในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย ซึ่งจัดเป็นสเตอรอยด์เพศอีกชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ในครัสตาเซียน โดยบทบาทและหน้าที่ของฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ จะมีความสำคัญในช่วงที่ครัสตาเซียนมีพัฒนาการรังไข่ระยะก่อนการเจริญพันธุ์ ซึ่งทำหน้าที่เป็น vitllogenesis inducing factor และ final development step เนื่องจากมีอิทธิพลทั้งต่อการพัฒนาของ yolk globules ในเซลล์ไข่และการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ไข่ในระยะ cortical rods ในกุ้งกุลาดำ (Meunpol *et al*., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ ในน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ โดยผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน $PGF_2\alpha$ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภูมิ โดยที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า อัตราการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ จะสูงกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ($P < 0.05$) และที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ยังพบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของสเตอรอยด์เพศชนิดนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ($P > 0.05$) และอัตราการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ($P<0.05$) ในกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาเกี่ยวกับอัตราการสังเคราะห์ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในรังไข่ของเครย์ฟิช พบว่า กิจกรรมการสังเคราะห์ prostaglandin H synthase ในรังไข่จะสูงขึ้นก่อนพัฒนาการสืบพันธุ์จะเข้าสู่ระยะ late vitellogenic stage (Reddy *et al*., 2004) ความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในน้ำเลือดจะสูงที่ระยะพัฒนา การรังไข่ระยะ early vitellogenic stage จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อเซลล์ไข่เริ่มพัฒนาเข้าสู่ระยะ late vitellogenic stage สรุปว่า ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ น่าจะกระตุ้นระยะก่อนเกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส และระหว่างเกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสในคุรุม่า (Tahara and Yano, 2003; D'Croz *et al*., 1988)

สอดคล้องกับพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งเป็นระยะก่อนการเกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส พบว่า ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน PGE_2 จะยังคงมีระดับค่อนข้างต่ำ โดยในกุ้งกุลาดำ Meunpol *et al*. (2010) รายงานว่า ฮอร์โมน PGE_2 ไม่ได้มีบทบาทเพียงเป็นตัวกระตุ้นให้เริ่มกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสแต่ยังสามารถกระตุ้นทั้งการเจริญของเซลล์ไข่ระยะ late vitellogenic stage และการปล่อยไข่ เนื่องจากพบการสร้างคอร์ติคอลรอดในไข่ภายหลังการทดลองบ่ม (in vitro) ฮอร์โมน PGE_2 ซึ่งสกัดจากแม่เพรียงทรายและฮอร์โมน PGE_2 สังเคราะห์ นอกจากนั้น พบว่า ความเข้มข้นของฮอร์โมน PGE_2 ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำจะมีระดับต่างจากกุ้งคุรุม่า คือ ฮอร์โมน PGE_2 ในน้ำเลือดกุ้งกุลาดำจะต่ำในช่วงแรกแล้วขึ้นสูงเมื่อไข่แก่ขึ้น ค่าของฮอร์โมน PGE_2 ที่สูงขึ้น สอดคล้องกับปริมาณในรังไข่กุ้งของกรดอะราคิโดนิคที่เป็นสารตั้งต้นของฮอร์โมน PGE_2 นรายงานการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ$PGF_{2\alpha}$ กับค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม ผลการศึกษาพบเพียงสองชนิดฮอร์โมนเท่านั้นที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI คือ ฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในขณะที่ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ พบว่า ไม่มีความสัมพันธ์กับค่า GSI ในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ ทั้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt

3. Vg gene

แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสเตอรอยด์เพศข้างต้น (ฮอร์โมน P_4 E_2และ $PGF_{2\alpha}$) นอกจากจะมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งทดลอง ผลการศึกษายังพบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเปลี่ยนแปลงของสเตอรอยด์เพศทั้งสามชนิดข้างต้นยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามแนวโน้มการแสดงออกของ Vg gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่ และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย ทั้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt โดยที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า อัตราการแสดงออกของ Vg gene จะสูงกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ($P < 0.05$) ผลการทดลองข้างต้น สันนิษฐานได้ว่า Vg gene มีความสำคัญต่อกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสซึ่งเป็นกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนไวเทลลินใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างไข่แดงในครัสตาเซียน ปัจจุบันยีนไวเทลโลเจนนินจัดเป็นยีนตัวแทน (candidate gene) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดทางชีวภาพสำหรับตรวจการเจริญพันธุ์ในครัสตาเซียน (Tiu *et al*., 2006; 2008; Raviv *et al*., 2006; Quackenbush, 1992) ซึ่งพบรายงานการศึกษาเฉพาะในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งพีนีอิคหลายชนิด เช่น กุ้งกุลาดำ (Tiu *et al*., 2006; 2008) กุ้งขาวแวนนาไม (Raviv *et al*., 2006) กุ้งคุรุม่า (Tsutsui *et al*., 2000; Okumura *et al*., 2006; 2007) กุ้งแชบ๊วย (Phiriyangkul *et al*., 2007; Auttarat *et al*., 2006) แต่ส่วนใหญ่พบการศึกษาเฉพาะการเจริญของเซลล์ไข่ในช่วง late vitellogenic stage เท่านั้น

นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ Vg gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนว่ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไมที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ สอดคล้องกับการรายงานผลการศึกษาในกุ้งกุลาดำ Chang *et al*. (1994) และ Longyant *et al*. (2000) รายงานว่า โดยทั่วไปการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนี้จะเริ่มต้นที่เนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งก่อน จากนั้นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาครั้งแรกจะถูกตัดแต่ง (post-translational modification) แบบ proteolytic cleavage เพื่อให้โปรตีนทำงานได้ ซึ่งกลไกการทำงานพื้นฐานแบบนี้พบได้ในครัสตาเซียนหลายสายพันธุ์ ต่อมาโปรตีนไวเทลโลเจนินที่ถูกตัดแต่งแล้วลำเลียงผ่านทางน้ำเลือดเข้าไปสะสมในเซลล์ไข่ส่งผลให้เซลล์ไข่ขยายขนาดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องกระทั่งกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสสิ้นสุดลง กิจกรรมการสังเคราะห์และตัดแต่งโปรตีนไวเทลลิน (Tiu *et al*., 2008; Wilder *et al*., 2010) จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อกุ้งเข้าสู่ระยะ late vitellogenic stage

อนึ่งจากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนไวเทลโลเจนนิน ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงก่อนการสืบพันธุ์นั้นยังสอดคล้องกับในรายงานในกุ้งกุลาดำ โดย Tiu *et al*. (2008) กล่าวว่า ระดับการแสดงออกของยีนซึ่งทำหน้าที่ผลิตโปรตีนไว-เทลโลเจนินและยีนตัวรับไวเทลโลเจนินจะมีการแสดงออกในระดับต่ำในช่วงที่กุ้งทดลองมีพัฒนาการรังไข่ช่วงต้น และกุ้งจะเริ่มมีระดับการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นเมื่อรังไข่ของแม่กุ้งทดลองมีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

GSI > 3-4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถสันนิษฐานได้ว่า ช่วงนี้ (ค่า GSI > 3-4 เปอร์เซ็นต์) รังไข่จะมีความต้องการส่งผ่านสารโปรตีนไวเทลโลเจนินจากตับและตับเข้ามายังเซลล์ไข่ ในขณะที่ในช่วงก่อนหน้านี้ (ค่า GSI < 3-4 เปอร์เซ็นต์) กุ้งจะยังคงมีกิจกรรมเกี่ยวกับการสร้างโปรตีนไวเทลโลเจ-นินและยีนตัวรับไวเทลโลเจนินอยู่บ้าง แต่การแสดงออกอยู่ในระดับที่ต่ำ เช่นเดียวกับในรายงานการศึกษาครั้งนี้ พบว่า แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ($P<0.05$) ตั้งแต่ 0.8 ถึง 2.5 เปอร์เซ็นต์ (ค่า GSI < 3-4 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสันนิษฐานได้ว่า ในกุ้งขาวแวนนาไมน่าจะมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดระหว่างการเพิ่มขึ้น Vg gene ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนกับพัฒนาการของรังไข่

4. FAMeT gene

เช่นเดียวกับผลการศึกษาแนวโน้มการแสดงออกของ FAMeT gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ (ค่า GSI < 3-4 เปอร์เซ็นต์) ปรากฏว่า FAMeT gene มีแนวโน้มการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง โดยแนวโน้มการแสดงออกของ FAMeT gene จะปรากฏทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ทั้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ซึ่งข้อมูลเชิงประจักษ์ข้างต้นสามารถใช้เป็นหลักฐานที่จะยืนยันได้ว่า FAMeT gene มีบทบาทและหน้าที่ต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งขาวแววนาไม ปัจจุบันในครัสตาเซียน FAMeT gene ได้ถูกจัดเป็นตัวแทนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ชนิดหนึ่ง สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดทางชีวภาพสำหรับตรวจวัดพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในครัสตาเซียนได้ เนื่องจากปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของ FAMeT gene เพิ่มมากขึ้นในครัสตาเซียน เช่น เครย์ฟิช (*Procambarus clarkii*) กุ้งตะกาด (Silva Gunawardene *et al*., 2003) ปูทะเล (*Scylla paramamosain*) (Yang *et al*., 2012) ปูม้า (*Portunus pelagicus*) (Kuballa *et al*., 2007) และปูทะเล (*Scylla serrate*) (Kuballa *et al*., 2007) เป็นต้น

ในครัสเตเชียน FAMeT gene เป็นยีนที่ทำหน้าผลิตเอ็นไซม์ Methyl transferase ซึ่งมีหน้าที่ขนส่งหมู่เมธิลให้แก่สารตั้งต้น Farnesoic acid เพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ ฮอร์โมน MF (Wainwright *et al*., 1998; Wang *et al*., 1994) ดังนั้นผลผลิตสุดท้ายของ FAMeT gene ที่ได้ คือ ฮอร์โมน MF โดยหน้าที่ของฮอร์โมน MF พบรายงานว่า มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน โดยฮอร์โมนชนิดนี้มีแหล่งสังเคราะห์ขึ้นที่แมนดิบูลาร์ออร์แกน นอกจากนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฮอร์โมน MF ยังทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของ Juvenile hormone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่พบในน้ำเลือดของแมลง (Charmantier *et al*., 1997) ในรายงานที่ผ่านมายืนยันว่า ฮอร์โมน MF มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับการเจริญพันธุ์ของครัสตาเซียน ซึ่งครัสตาเซียนที่เจริญพันธุ์แล้วจะสามารถตรวจพบระดับของฮอร์โมนชนิดนี้ในน้ำเลือดได้สูงกว่าครัสตาเซียนที่ยังไม่เจริญพันธุ์ และระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน MF ในน้ำเลือด และแมนดิบูลาร์ออร์แกนจะเพิ่มขึ้นควบคู่กับกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสของครัสเตเซียน (Laufer *et al*., 1987; Sagi *et al*., 1993) สอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้เมื่อนำระดับการแสดงออกของ FAMeT gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่ และเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมมาเปรียบเทียบกันทั้งที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt พบว่า แนวโน้มการเพิ่มขึ้นของ FAMeT gene มีความสัมพันธ์โดยตรงกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนบทบาทและหน้าที่ของ FAMeT gene ว่ามีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งขาวแวนนาไม

5. การศึกษาระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกันต่อคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมซึ่งทำการทดลองในระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกัน โดยใช้ 3 พารามิเตอร์ จากโปรแกรมโคเมทสำเร็จรูป เป็นตัวบ่งชี้วัด (ตัวประเมินผลชุดแรก) ได้แก่ Heath cell Comet cell และ Cell dead ปรากฏว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 3 และ 4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ กุ้งมีค่า Healthy cell สูงกว่า ($P>0.05$) กลุ่มทดลองที่ 1 และ2 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ทั้งในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน ในทางตรงกันข้าม พบว่า ค่า Comet cell และ Cell dead ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม จากกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 โดยสเปิร์มกุ้งทั้งสองกลุ่มมีค่าสูงกว่า ($P>0.05$) สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 3 และ 4

ข้อมูลเชิงประจักษ์ข้างต้นชี้ให้เห็นว่า ความเค็มของน้ำทะเลมีส่วนสำคัญในการดำรงชีพของกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปรับสมดุลของน้ำและเกลือแร่ภายในร่างกาย โดยในน้ำทะเลความเค็มจะประกอบด้วยอนุภาคเล็กๆ ของเกลือหลายชนิด โดยเกลือแร่ต่าง ๆ เหล่านี้ จะเป็นสารละลายที่กุ้งนำเข้าไปในร่างกายและใช้ในกระบวนการสร้างโครงสร้างของร่างกายภายนอก ในขณะที่น้ำกร่อยและน้ำจืดซึ่งมีความเค็มต่ำกว่าน้ำทะเลทั่วไปจะมีความเข้มข้นของแร่ต่างๆ เหล่านี้ลดลง ปกติกุ้งทะเลในกลุ่มพีนีอิดความเค็มน้ำระดับนั้นส่งผลให้กุ้งมีสุขภาพร่างกายที่ดี ซึ่งการที่กุ้งมีสุขภาพร่างกายที่ดียังส่งผลต่อเนื่องไปยังระบบการทำงานอื่นๆ ภายในร่าง กายของกุ้งให้ทำงาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดีควบคู่กันไป (บุญรัตน์, 2545) โดยเฉพาะพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ (Ogle, 1992; Vargas-Albores *et al*., 1993)

ระดับความเค็มน้ำนอกจากจะเป็นอุปสรรคสำหรับพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์กุ้งทะเลแล้วกิจกรรมการควบคุมสมดุลเกลือแร่และน้ำ กุ้งยังต้องใช้พลังงานที่สะสมในร่างกายเพื่อควบคุมแร่ธาตุและน้ำให้อยู่ในระดับคงที่ คือ ในร่างกายกุ้งมีค่า osmolality อยู่ในช่วง 600-700 mOsm ในขณะที่ถ้าสภาพแวดล้อมที่กุ้งอาศัยอยู่น้ำมีระดับความเค็มที่สูงหรือต่ำเกินไป กุ้งจะใช้พลังงานที่สะสมในร่างกายเข้ามารักษาสมดุลของระดับน้ำและแร่ธาตุต่างๆ ในร่างกายให้คงที่ (McGraw *et al*., 2002; Samocha *et al*., 1998) โดยพลังงานที่กุ้งใช้ในการรักษาสมดุลร่างกายส่วนใหญ่มาจากโปรตีนที่สะสมในร่างกาย (Li *et al*., 2008) นี้อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ สเปิร์มกุ้งมีสุขภาพด้อยกว่ากุ้งขาวแวนนาไมซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ โดยประเมินผลจากค่าเปอร์เซ็นต์การตายของสเปิร์มกุ้ง และสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ค่า Healthy cell Cell dead และComet cell ของสเปิร์มกุ้งซึ่งคัดแยกจากท่อนำสเปิร์มและถุงสเปิร์ม เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้พารามิเตอร์จากโปรแกรมโคเมทสำเร็จรูป (ตัวประเมินผลชุดสอง) พบว่า โดยภาพรวมแล้วคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม จากกลุ่มทดลองที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ทั้งในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน สเปิร์มจะมีคุณภาพที่ดีกว่ากลุ่มทดลองที่ความเค็มของน้ำ 15 ppt ทั้งสองกลุ่มทดลอง

6. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนอร์เพลียสกับคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนอร์เพลียสกับคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 3 พารามิเตอร์ จากโปรแกรมโคเมทสำเร็จรูป เป็นตัวบ่งชี้วัด ได้แก่ Heath cell Comet cell และ Cell dead ปรากฏว่า กุ้งทดลองในกลุ่มที่ 4 ซึ่งกุ้งมีปริมาณนอร์เพลียสสูงสุด พบกุ้งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Heath cell สูงสุด เช่นกัน ในขณะที่ผลการทดลองในกลุ่มที่ 1 ซึ่งกุ้งมีปริมาณลูกกุ้งวัยอ่อนต่ำสุด พบว่า กุ้งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Heath cell ต่ำสุดเช่นกัน ข้อมูลเชิงประจักษ์ข้างต้นสามารถยืนยันได้ถึงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างสเปิร์มสุขภาพดี (Heath cell) กับประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ อย่างไรก็ตามสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมที่มีสุขภาพดีหรือไม่ดีนั้นมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น ที่กักขัง คุณภาพอาหารที่กุ้งได้รับ คุณภาพน้ำ สุขภาพโดยรวมของกุ้ง รวมทั้งขนาดและอายุของกุ้ง (Braga *et al*., 2013; Ceballos-Vázquez *et al*., 2003; Meunpol *et al*., 2005) สอดคล้องรายงาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของ Chamberlain *et al*. (1981; 1983) พบว่า การเสื่อมคุณภาพสเปิร์มของกุ้งพีนีอิดเพศผู้จะเกิดขึ้นในกุ้งที่เลี้ยงในที่กักขังมากกว่ากุ้งธรรมชาติ โดยในบ่อเลี้ยงพบการเสื่อมถอยเกิดขึ้นใน 3 สัปดาห์แรกของการเลี้ยง ต่อมาในสัปดาห์ที่ 6 และ7 ไม่พบมีสเปิร์มในถุงสเปิร์ม (Leung-Trujillo and Lawrence, 1987) และมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งแชบ๊วยที่อยู่ในบ่อเลี้ยงๆ หลายเดือน กุ้งจะมีการบวมน้ำของท่อนำสเปิร์ม และ58 เปอร์เซ็นต์ ของกุ้งทั้ง 2 ชนิด ถุงสเปิร์มจะมีสีดำเข้มการเกิดสีดำนี้เกิดขึ้นได้บ่อยในกุ้งเพศผู้ที่ได้ปล่อยถุงเก็บสเปิร์มออกไปเพื่อผสมเทียม (Chamberlain *et al*., 1983)

เช่นเดียวกับในรายงานผลการศึกษาครั้งนี้ โดยสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ 1 นอกจากกุ้งจะมีปริมาณลูกกุ้งวัยอ่อนและสเปิร์ม ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Heath cell ต่ำสุดแล้ว และผลการศึกษายังพบอีกว่า กุ้งทดลองในกลุ่มนี้กุ้งมีค่าพัฒนาการของถุงสเปิร์มที่ยาวนาน (7.2±1.09 วัน) กว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ แม้ว่ากุ้งทดลองจะได้รับอาหารทดลองเช่นเดียวกับกุ้งทดลองกลุ่มอื่น ๆ ก็ตาม และผลการวิเคราะห์คุณภาพของสารพันธุกรรมสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 โดยใช้พารามิเตอร์จากโปรแกรมโคเมทสำเร็จรูป พบว่า ผลการวิเคราะห์ให้ผลเช่นเดียวกับค่า 3 พารามิเตอร์ ข้างต้น คือ สเปิร์มสุขภาพดี (Heath cell) สเปิร์มที่มีสุขภาพปานกลาง (Comet cell) และสเปิร์มตาย (Cell dead) ซึ่งความผิดปกติที่เกิดขึ้นทางด้านคุณภาพของสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ 1 เช่นนี้น่าจะมาจากสุขภาพของกุ้ง เช่น การได้รับเชื้อแบคทีเรีย Male reproductive tract degenera-tive syndrome (MRTDS) ในระยะแรกเริ่มต้น โดยในระหว่างการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทดลองมาทำการวิเคราะห์ผล ผู้วิจัยสังเกตพบว่ากุ้งบางตัวมีลักษณะสีดำเล็กน้อยปรากฏขึ้นบริเวณถุงสเปิร์ม ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย MRTDS ซึ่งเชื้อแบคทีเรีย MRTDS ชนิดนี้พบว่าเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้สเปิร์มกุ้งพีนีอิดไม่สมบูรณ์ เช่น สเปิร์มจะไม่มี spike และสเปิร์มมีขนาดเล็กลง รวมทั้งถุงสเปิร์มเกิดความเสียหาย (Wang *et al*., 1995; Talbot *et al*., 1989; Brown *et al*., 1979)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี RIA และ RT-HPLC ตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือด และใช้วิธี RT-PCR ตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของ Vg และ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ รวมทั้งใช้วิธี comet assay เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพสารพันธุกรรม (DNA) ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ สรุปผลได้ดังนี้

1. ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย โดยใช้วิธี RIA ปรากฏว่า สเตอรอยด์เพศทั้งสองชนิดนี้มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในขณะที่ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งมากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt โดยฮอร์โมน P_4 และE_2 ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt มีอัตราการเพิ่มขึ้นสูงสุด ณ วันที่ 30 เท่ากับ 4.32 และ 24.62 เท่า ตามลำดับ

2. ผลการวิเคราะห์ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้วิธี RT-HPLC พบว่า ระดับความเข้มข้นของสเตอรอยด์เพศชนิดนี้ มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อค่า GSI มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และพบว่าในตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 30 ppt จะมีระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มากว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt โดยตลอดระยะเวลาการทดลอง ฮอร์โมน $PGF_{2\alpha}$ มีอัตราการเพิ่มขึ้น 1 เท่า ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt

3. ผลการตรวจวัด Vg gene ในระดับทรานส์คริปชันด้วยวิธี RT-PCR ปรากฏว่า ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม กุ้งมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม และยังพบว่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt มากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในขณะที่ อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

gene ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า เนื้อเยื่อรังไข่จะมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene มากว่าในเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน ($P>0.05$)

4. ผลการตรวจวัดอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ด้วยวิธี RT-PCR ปรากฏว่า ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม ตั้งแต่เริ่มต้นกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง กุ้งมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene เพิ่มขึ้นในทิศทางเดียวกันกับแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของค่า GSI ของกุ้งขาวแวนนาไม และยังพบว่า อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ทั้งในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 30 ppt มากกว่าที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในขณะที่อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมที่ความเค็มน้ำ 30 ppt พบว่า เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมีอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene มากว่าในเนื้อเยื่อรังไข่ ($P>0.05$)

5. ผลการศึกษาคุณภาพสารพันธุกรรมของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ ซึ่งทำการทดลองในระดับความเค็มน้ำและชนิดบ่อทดลองต่างกัน โดยใช้ 3 พารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด (ตัวประเมินชุดแรก) ได้แก่ Heath cell ค่า Comet cell และ Cell dead ปรากฏว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 3 และ4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็ม 30 ppt ในบ่อซีเมนต์และบ่อดิน ตามลำดับ กุ้งมีค่า Healthy cell สูงสุด (42.88±12.36 และ 51.22±7.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนค่า Cell dead พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมกลุ่มทดลองที่ 2 (39.15±6.09 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อซีเมนต์ กุ้งมีค่าสูงสุด เช่นเดียวกับค่า Comet cell พบว่า สเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 1 (52.49±8.35 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งมีค่า Comet cell สูงสุด

6. ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมโดยใช้ค่าพารามิเตอร์จาก comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด (ตัวประเมินชุดสอง) ปรากฏว่า สเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมจากกลุ่มทดลองที่ 1 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดิน กุ้งทดลองมี 7 ค่าพารามิเตอร์สูงสุด ประกอบด้วย ค่า Comet Length (px) (447.3±34.08) ค่า Comet area (px) (171.26±13.27) ค่า Comet Mean Intensity (px) (89.9±13.8) ค่าTail Length (px) (225.67±30.6) % DNA in Tail (px) (28.96±2.94) ค่า Tail moment (37.35±10.23) และค่า Olive Moment (17.88±4.65) ในขณะที่สเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มทดลองที่ 4 ทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อซีเมนต์ พบเพียง 3 ค่าพารา-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มิเตอร์สูงสุด ได้แก่ ค่า Head Diameter (px) (67.94±1.76) ค่า Head Diameter (px) (58.38± 7.09) และค่า DNA in Head (px) (76.03±7.78)

7. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนอร์เพลียสกับคุณภาพสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 3 ค่าพารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด (ตัวประเมินชุดแรก) ได้แก่ Heath cell Comet cell และ Cell dead ปรากฏว่า กุ้งทดลองในกลุ่มที่ 4 กุ้งมีค่าเปอร์เซ็นต์ Heath cell (82.40±8.29) สูงสุด ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ Cell dead ปรากฏว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 (32.00±10.20) มีค่าสูงสุด ในขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์ Comet cell ของสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม พบว่า กุ้งทดลองกลุ่มที่ 2 (30.80±10.10) มีค่าสูงสุด

8. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณนอร์เพลียสกับคุณภาพสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้ 9 พารามิเตอร์ จากโปรแกรม comet assay เป็นตัวบ่งชี้วัด (ตัวประเมินชุดสอง) โดยในกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 ซึ่งกุ้งมีปริมาณนอร์เพลียสต่ำสุด ปรากฏว่า สเปิร์มกุ้งมี 6 พารามิ- เตอร์สูงสุด ได้แก่ Comet Length (px) (150.672±113.91) Tail Length (px) (110.70± 97.93) Comet area (px) (7909.9±9127.59) Comet Mean Intensity (px) (115.274±28.89) %DNA in Tail (15.18 ±9.11) และ ค่า Tail moment (23.93±16.87) สูงสุด ในขณะที่กุ้งทดลองกลุ่มที่ 4 ซึ่งกุ้งมีปริมาณนอร์เพลียสสูงสุด พบว่า สเปิร์มกุ้งมี 3 พารามิเตอร์สูงสุด ประกอบด้วยค่า Head Area (px) (7908.9± 9127.59) Head Diameter (px) (39.96±19.78) และค่า Head Mean Intensity (px) (112.06 ±29.81)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการตรวจวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนสืบพันธุ์ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไม โดยใช้วิธี RIA และวิธี RT-HPLC จะมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานค่อนข้างสูงแต่ผลการวิเคราะห์ที่ได้ออกมาก็มีความน่าเชื่อถือค่อนข้างสูงเช่นกัน ดังนั้นนักวิจัยที่จะใช้วิธีทั้งสองนี้ในการวิเคราะห์ฮอร์โมนสืบพันธุ์ หรือฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบต่างๆ ของร่ายกายของสัตว์ทดลองควรมีการเตรียมความพร้อมของวิธีดำเนินงานให้มีความเรียบร้อยก่อนปฏิบัติงาน เช่น ช่วงเวลาการเก็บตัวอย่าง ระยะทางในการขนส่งตัวอย่าง สุขภาพของสัตว์น้ำ และสถานที่เก็บรักษาตัวอย่าง เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องมาจากฮอร์โมนแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีที่ต่างกันออกไป ซึ่งอาจทำให้ผลการวิเคราะห์มีความคาดเคลื่อนได้ เช่นเดียวกับวิธี comet assay ซึ่งเป็นวิธีการประเมินระดับการถูกทำลายสารพันธุกรรมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม และใช้สเปิร์มเซลล์เดียวๆ ในการวิเคราะห์ผล ดังนั้นปัจจุบันวิธีนี้น่าจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ประเมินสุขภาพโดยรวมสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม รวมทั้งสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ต่อไปในอนาคต เนื่องจากวิธีการดังกล่าวมีความสะดวกและรวดเร็วในการดำเนินงาน การดำเนินงานใช้ต้นทุนต่ำ อย่างไรก็ตามในร่างกายของสัตว์น้ำยังมีเซลล์เดียว ๆ อีกหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์เม็ดเลือดซึ่งเหมาะสมสำหรับการนำมาวิเคราะห์คุณภาพของสารพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเปรียบเทียบและประเมินสุขภาพโดยรวมของสัตว์ทดลองได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชนญญา ชัยวงศ์โรจน์. 2541. **ขบวนการพัฒนาของไข่กบนา: ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างละเอียด, การกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสและการสร้างสเตรอยด์ฮอร์โมนในกบนา.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. **อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย.** สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ. 2547. บริษัท เมจิค พับบลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพ ฯ.

ชาตรี ฤทธิ์ทอง. 2552. **การหาดรรชนีทางชีวภาพในหอยแมลงภู่เพื่อวัดการปนเปื้อนของสารปรอทบริเวณแท่นผลิตปิโตรเลียมในอ่าวไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทัศนีย์ เอี่ยมกมล. 2550. **ผลของคลอร์ไพริฟอสต่อการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*.** วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2539. ขนาดที่เริ่มสมบูรณ์เพศของกุ้งกุลาดำเพศผู้จากบ่อเลี้ยง. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา.** 4: 15-24.

ประดิษฐา ณ ร้อยเอ็ด. 2551. **การใช้วิธีโคเมทในพืชติดตามผลกระทบของก๊าซชีวภาพและน้ำชะมูลฝอย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประจวบ หลำอุบล. 2530. **ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล. คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ ฯ.

ประภาพร อุทารพันธุ์. 2006. การโคลนยีนไวเทลลินและการหาปริมาณการแสดงออกของไวเทลโลจีนินเอ็มอาร์เอ็นเอในกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*), น.123-131. *ใน* รายงานประจำปี 2554 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2546. ศาสตร์การเลี้ยงกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม. **สัตว์น้ำ.** 14 (162): 119-122.

ประภาภรณ์ เทอดสุทธิรณภูมิ. 2550. **ผลของโปรเจสเตอโรนที่เคลือบด้วยไคโตซานและมอลโทเดกซ์ทรินต่อการพัฒนารังไข่กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มณธิรา ศรีจักรโคตร. 2550. **การทดสอบไมโครนิวเครียสและโคเมทของสารสีที่ได้จากการเพาะเลี้ยงรางเงินรางทองและรางนาก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. **วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture).** สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม็กกาซีน, สมุทรปราการ.

วรรณวิภา สุทธิไกร. 2537. **การตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรฟิน รีลิสซิ่ง ระยะหลังคลอดในกระบือปลัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิไลวรรณ ตันจ้อย นาฏนลิน ศาสตรี และประไพพิศ สุปรารภ. 2550. การใช้วิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ เพื่อวิเคราะห์การปนเปื้อนอะทราซีนในสิ่งแวดล้อม *ใน* การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ครั้งที่ 10: 16-17 สิงหาคม 2550.

สิทธิโชค จันทร์ย่อง. 2545. **ผลของความเค็มต่างระดับและเกลือแร่บางชนิดต่อ. การพัฒนารังไข่และการวางไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวลักษณ์ เอี่ยมไผ่. 2548. **ผลของการสกัดโพรเจสเตอโรน และ 17แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเตอโรนจากแม่เพรียง *Perinereis* sp. ต่อการเจริญของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศิริพร สิทธิประณีต. 2531. **พันธุวิศวกรรมปฏิบัติการเบื้องต้น.** คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Adiyodi, R.G. 1985. **Reproduction and development**, pp.139-185. In: The Biology of the Land Crabs (ed. by W.W. Burggren & B.R. McMahon). Cambridge University Press, Cambridge, MA, USA.

Altschul, S. F., W. Gish., W. Miller., E. W. Myers and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410.

Alfaro, J., N. Munoz, M. Vargas and J. Komen. 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. **Aquaculture.** 216(1-4): 371-381.

Alfaro, J., K. Ulate and M. Vargas. 2007. Sperm maturation and capacitation in the open thelycum shrimp Litopenaeus (Crustacea : Decapoda : Penaeoidea). **Aquaculture.** 270 (1-4): 436-442.

Andriantahina, F., X. L. Liu, H. Huang, J. H. Xiang and C. M. Yang. 2012. Comparison of reproductive performance and offspring quality of domesticated Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 324: 194-200.

AQUACOP. 1983. **Constitution of broodstock, maturation, spawning and hatching systems for penaeid shrimps in the Centre Oceanologique du Pacifique.** In: J.P. McVey (Editor), Handbook of Mariculture, Vol.1, Crustacean Aquaculture. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp.105-121.

Arcos, F. G., A. M. Ibarra and L. S. Racotta. 2011. Vitellogenin in hemolymph predicts gonad maturity in adult female *Litopenaeus vannamei* shrimp. **Aquaculture.** 316(1-4): 93-98.

Auttarat, J., P. Phiriyangkul and P. Utarabhand. 2006. Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 143: 27–36.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Avishai, N., C. Rabinowitz, E. Moiseeva and B. Rinkevich. 2002. Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** 518(1): 21-37.

Avarre, J. C., R. Michelis, A. Tietz and E. Lubzens. 2003. Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complimentary DNAs. **Biol. Reprod.** 69: 355-364.

Bartlett, J. M. S. and D. Stirling. 2003. **A Short History of the Polymerase Chain Reaction.** PCR Protocols. 226. pp. 3-6.

Benzie, J.A.H. 1997. A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. **Aquaculture.** 155(1-4): 69-85.

Berson, S.A. and R.S. Yallow.1971. **Introduction and general considerations Principles of Competitive Protein Binding Assays.** J.B. Lippincott Company, 429 p.

Bose, R., C. Majumdar and S. Bhattacharya. 1997. Steroids in *Achatina fulica* (Bowdich): steroid profile in haemolymph and *in vitro* release of steroids from endogenous precursors by ovotestis and albumen gland. **Comp Biochem Physiol C.** 116:179-182.

Borst, D.W., H. Laufer, M. Landau and E.S. Chang. 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. **Insect Biochem.** 17(7): 1123-1127.

Braga, A. L., D. L. A. Lopes, L. H. Poersch and W. Wasielesky. 2013. Spermatophore and sperm quality of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* fed with fresh food supplemented with pollen and paprika. **Aquaculture.** 380: 29-32.

Bray, W.A., A.L. Lawrence and J.R. Leung-Trujillo. 1989. Reproductive performance of ablated *Penaeus stylirostris* fed a soy lecithin supplement. **J. World Aquac. Soc.** 20(1): 19A.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Brown, A., J.P. McVey, B.S. Middleditch and A.L. Lawrence. 1979. The maturation of white shrimp (*Penaeus setiferus*) in captivity. **Proc. World Maric. Soc.** 10: 435-444.

Buaklin, A., S. Klinbunga and P. Menasveta. 2008. Characterization and expression of farnesoic acid-o-methyltransferase (FAMET) of the giant tiger shrimp *penaeus monodon,* pp. 111-112. *In* **34th Congress on Science and Technology of Thailand**. Bangkok, Thailand.

Caillouet, C. W. 1972. Ovarian maturation induced by eyestalk ablation in pink shrimp, *Penaeus duorarum* burkenroad1. **World Mariculture Society.** 3(1-4): 205-225.

Castille, F. L. and A. L. Lawrence. 1989. Relationship between Maturation and Biochemical Composition of the Gonads and Digestive Glands of the Shrimps *Penaeus aztecus* Ives and *Penaeus setiferus*. **Journal of Crustacean Biology.** 9(2): 202-211.

Chamberlain, G.W. and A. L. Lawrence. 1981. Maturation, reproduction, and growth of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* fed natural diets. **J. World Maric. Soc.** 12(1): 209-224.

Charniaux-Cotton, H. and G. Payen. 1988. **Crustacean reproduction.** Endocrinology of Selected Invertebrate Types. New York.

Chamberlain, G.W., J. K. Johnson and D.H. Lewis. 1983. Swelling and melanization of the male reproductive system of captive adult penaeid shrimp. **J. World Maric. Soc.** 14:135-136.

Chamberlain, G.W. 1988. **Stepwise investigation of environmental and nutritional requirements for reproduction of penaeid shrimp.** Ph.D. Thesis, Texas A and M University.

Charmantier, G., M. Charmantier-Daures and D. E. Aiken. 1997. Metamorphosis in the lobster *Homarus* (Decapods). **A review. J. Crust. Biol.** 11: 481-494.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ceballos-Vazquez, B.P., C. Rosas and I. Racotta. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture.** 228: 141-151.

Cheng, S., C. Fockler, W. M. Barnes and R. Higuchi. 1994. Effective Amplification of Long Targets from Cloned Inserts and Human Genomic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 91(12): 5695-5699.

Chien, A., D.B. Edgar and J.M. Trela. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. **J. Bacteriol.** 127(3): 1550-1557.

Collins, W.P.1985. **Alternative immunoassay.** Chichester: John Wiley. Coman, G. J., S. J. Arnold, M. J. Jones and N. P. Preston. 2007. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. **Aquaculture.** 264(1-4): 175-183.

Crocos, P. J. and J. D. Kerr. 1986. Factors affecting induction of maturation and pawning of the tiger prawn, *Penaeus esculentus* (Haswell), under laboratory conditions. **Aquaculture.** 58(3-4): 203-214.

Darvas, B., A. Székács, A. Fónagy, M. Szécsi and I. Tóth. 1997. Progesterone in *Periplaneta americana* and *Neobellieria bullata* Adults from the Procuticle Phase until First Progeny Production. **General and Comparative Endocrinology.** 107(3): 450-460.

Deshimaru, O. and Y. Yone. 1978. Effect of dietary carbohydrate sources on the growth and feed efficiency of prawn. **Japan Society Science Fishery.** 44: 1161-1163.

D, Croz, L., L. Wong, G. Justines and M. Gupta. 1988. Prostaglandins and related compounds from the Polychaete Worm *Americonuphis reesei* Fauchald as possible inducer of gonad maturation in pennaeid shrimps. **Rev. Biol. Trop.** 36(1): 331-332.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books, Huntington, New York.

Dougherty, W. J. and M. Dougherty. M. 1989. Electron microscopical and histochemical observations on melanized sperm and spermatophores of pond-cultured shrimp, *Penaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology.** 54(3): 331-343.

Fairs, N.J., R.P. Evershed, P.T. Quinlan and L. I. Goad. 1989. Detection of unconjugated and conjugated steroids in the ovary eggs and haemolymph of the decapod crustacean *Nephrops norvegicus*. **Gen. Comp. Endocrinol.** 74: 199-208.

Fairs, N. J., P. T. Quinlan and L. J. Goad. 1990. Changes in ovarian unconjugated and conjugated steroid titers during vitellogenesis in *Penaeus monodon*. **Aquaculture.** 89(1): 83-99.

Faires, R. and G.G. J. Boswell. 1981. **Radioisotope laboratory techniques.** 4th ed. London: Butterworths. A.W., 1991. Development of appropriate and economically viable shrimp pond grow-out technology for the United States. pp. 197-239.

Fingerman, M. 1987. The endocrine mechanisms of crustaceans. **Journal of Crustacean Biology.** 7: 1-24.

Fingerman, M., R. Nagabhushanam and R. Sarojini.1993. Vertebratetype hormones in crustaceans: localization, identification and functional significance. **Zool. Sci.** 18: 13-29.

Fox, C., J.H. Brown and M. Briggs.1994. **The Nutrition of Prawns and Shrimp in Aquaculture: A Review of Recent Research.** In: Recent Advances in Aquaculture, Muir, J.F. and R.J. Roberts (Eds.). Blackwell Scientific Publications, Oxford, England, pp: 131-206.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Garron, C., L. D. Knopper, W. R. Erns and P. Mineau. 2012. Assessing the Genotoxic Potential of Chlorothalonil Drift from Potato Fields in Prince Edward Island, Canada. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology.** 62(2): 222-232.

Ghosh, D. and A.K. Ray. 1994. Estrogen stimulated lipogenic activity in the ovary of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. **Invert. Reprod. Dev.** 25: 43-47.

Gichner, T. 2003. Comet assay in higher plants. In: J. Maluszynska, M. Plewa, editors. **Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health.** Katowice: Wydawnictwo Uniwersytetu Slaskiego. pp.123-132.

Gunawardene, Y. I. N. S., S. S. Tobe, W. G. Bendena, B. K. C. Chow, K. J. Yagi and S. M. Chan. 2002. Function and cellular localization of farnesoic acid O- methyltransferase (FAMeT) in the shrimp, *Metapenaeus ensis*. **European Journal of Biochemistry.** 269(14): 3587-3595.

Gwo, J. C., C. Y. Wu, W. S. P. Chang and H. Y. Cheng. 2003. Evaluation of damage in Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spermatozoa before and after cryopreservation using comet assay. **Cryoletters.** 24(3): 171-180.

Hall, M.R., N. Yong and M. Kenway. 2000. Manual for the determination of egg fertility in *Penaeus monodon*. Available from:http://www.aims.gov.au/pages/research/mdef-00.html. May 15, 2000.

Harrison, K.E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. **J. Shellfish Res.** 9(1): 1-28.

He, H., A. L. Lawrence and R. Liu. 1992. Evaluation of dietary essentiality of fat soluble vitamins A D E and K for penaeid shrimp (*Penaeus vannamei*). **Aquaculture.** 103(2): 177-185.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Heitzmann, J.C., A. Diter and A. Aquacop. 1993. Spermatophore formation in the white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone 1931: dependence on the intermolt cycle. **Aquaculture.** 116: 91-98.

Holthuis, L.B. 1980. FAO species catalogue. Vol.1. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fisheries Synopsis.** 125(1) : 1-261.

Ibarra, A. M., T. R. Famula and F. G. Arcos. 2009. Heritability of vitellogenin in hemolymph, a pre-spawning selectable trait in *Penaeus* (*Litopenaeus*) *vannamei*, has a large genetic correlation with ovary maturity measured as oocytes mean diameter. **Aquaculture.** 297(1-4): 64-69.

Jasmani, S., I. Kawazoe, T.W. Shih, Y. Suzuki and K. Aida. 2000. Haemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn (*Penaeus japonicus*). **Fisheries science.** 66: 535-539.

JohnSamuel, M., T. Kannupand and P. Soundarapandian. 1999. Nutritional effects on male reproductive performance in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards). **Aquaculture.** 172(3–4): 327-333.

Kamonpatana, M., D. F.M. Van De Wie, W. Koops, L. Dumtong, C. Ngramsuriyaroj and S. Usanakornkul. 1979. Oestrus control and early pregnancy diagnosis in swamp buffalo: comparison of enzyme immunoassay and radio immunoassay for plasma progesterone. **Theriogenology.** 11(5): 399-409.

Kanazawa, A., S.Teshima, K. Ono and K. Chalayodeja. 1979. Biosynthesis of fatty acids from acetate in the prawn, *Penaeus monodon* and *Penaeus merguiensis*. **Memoirs Fac Fisheries.** 28: 21-26.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Khayat, M., E. Lubzens, A. Tietz and B. Funkenstein. 1994. Are vitellin and vitellogenin coded by one gene in the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. **J. Mol. Endo.** 12: 251-254.

Khayat, M., W.J. Yang, K. Aida, H. Nakasawa, A. Tiezt, B. Funkenstein and E. Lubzens. 1998. Hyperglycemic hormones inhibit protein and mRNA synthesis in in vitro incubated ovarian fragments of the marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. **Gen. Comp. Endrocrinol.** 110: 307-318.

King, J. E. 1948. A study of the reproductive organs of the common marine shrimp, *Penaeus setiferus* (Linnaeus). **Biol. Bull.** 94: 244-262.

Kleinsasser,N.H., K. Schmid, A.W. Sassen, U.A. Harréus, R. Staudenmaier, M. Folwaczny, J. Glas and F.X. Reichl. 2006. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis **(**Comet) assay. **Biomaterials.** 27(9): 1762-1770.

Kuballa, A. V., K. Guyatt, B. Dixon, H. Thaggard, A. R. Ashton, B. Paterson and A. Elizur. 2007. Isolation and expression analysis of multiple isoforms of putative farnesoic acid O-methyltransferase in several crustacean species. **Gen Comp Endocrinol.** 150(1): 48-58.

Lafont, R. 1991. Reverse endocrinology, or hormones seeking functions. **Insect Biochemistry.** 21(7): 697-721.

Lawyer, F., S. Stoffel, R. Saiki, S. Chang, P. Landre, R. Abramso and D. Gelfand. 1993. Highlevel expression, purification, and enzymatic characterization of full-length Thermus aquaticus DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. **PCR methods and applications.** 2(4): 275-287.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Laufer, H., D. W. Borst, M. Landau, E.S. Chang, W.A. Hertz, F.C. Baker and D.A. Schooley. 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. **Insect Biochem.** 17: 1123-1127.

Laufer, H., D. Borst, F.C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C.C. Reuter, L.W. Tsai and D.S. Schooley. 1987. Identification of a juvenile hormone like compound in a crustacean. **Science.** 235: 202-205.

Lee, F.Y., T.W. Shin and C.F. Chang. 1997. Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: comparison with ovarian vitellin. **General Composition Endocrinology.** 108: 406-415.

Leung-Trujillo, J. R. and A. L. Lawrence. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. **Aquaculture.** 65(3-4): 363-370.

Leung-Trujillo, J. R. and A. L. Lawrence. 1991. Spermatophore generation times in *Penaeus setiferus*, *P. vannamei* and *P. stylirostris*. **J. World Aquacult. Soc.** 22:244-251.

Lin, Y.C. and J.C. Chen. 2001. Acute toxicity of ammonia on Litopenaeus vannamei Boone juveniles at different salinity levels. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.** 259(1): 109-119.

Liu, C.H. and J.C. Chen. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to Vibrio alginolyticus. **Fish &amp: Shellfish Immunology.** 16(3): 321-334.

Longyant, S., P. Sithigorngul, N. Thammapalerd, W. Sithigorngul and P. Menasveta. 2000. Characterization of vitellin and vitellogenin of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

using monoclonal antibodies specific to vitellin subunits. **Invertebr. Reprod. Develop.** 37: 211-221.

Mai, W. J., J. L. Yan, L. Wang, Y. Zheng, Y. Xin and W. N. Wang. 2010. Acute acidic exposure induces p53-mediated oxidative stress and DNA damage in tilapia (*Oreochromis niloticus*) blood cells. **Aquatic Toxicology.** 100(3): 271-281.

Martins, J., K. Ribeiro, T. Rangel-Figueiredo and J. Coimbra. 2007. Reproductive cycle ovarian development and vertebrate-type steroids profile in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Journal of Crustacean Biology.** 27(2): 220-228.

McCarthy, P.J., S.F. Sweetman, P.G. Mckenna and V.J. Mckelvy.1997. Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. **Mutagenesis.** 12(4): 209-214.

McGraw, W.J., D.A. Davis, D. Teichert-Coddington and D.B. Rouse. 2002. Acclimation of *Litopenaeus vannamei* postlarvae to low salinity: influence of age, salinity endopoint and rate of salinity reduction. **J. World Aquac. Soc.** 33: 78-84.

Meunpol, O., P. Meejing and S. Piyatiratitivorakul. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. **Aquaculture Research.** 36(12): 1216-1225.

Meunpol, O., S. Iam-Pai, W. Suthikrai and S. Piyatiratitivorakul. 2007. Identification of progesterone and 17 alpha-hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development in vitro. **Aquaculture.** 270(1-4): 485-492.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Meunpol, O., E. Duangjai, R. Yoonpun and S. Piyatiratitivorakul. 2010. Detection of prostaglandinE_2 in polychaete *Perinereis* sp. and its effect on *Penaeus monodon* oocyte development in vitro. **Fisheries Science.** 76(2): 281-286.

Millamena, O. M., R. A. Pudader and M.R. Catacutan. 1993. Tissue Lipid-Content and Fatty-Acid Composition during Ovarian Maturation of Ablated *Penaeus monodon*. **Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh.** 45(3): 120-125.

Misamore, M. J. and C. L. Browdy. 1996. Mating Behavior in the White Shrimps *Penaeus setiferus* and *P. vannamei*: A Generalized Model for Mating in Penaeus. **Journal of Crustacean Biology.** 16(1): 61-70.

Motoh, H. 1981. **Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in the Philippine.** Technical report, No.7. Tigbauan, Iloilo: SEAFDEC quaculture Department, 128 pp.

Monteith, D.K. and J. Vanstone. 1995. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage. **Mutat Res.** 345: 97-103.

Nagabhushanam, R., P.K. Joshi and G.K. Kulkarni. 1980. Induced spawning in prawn *Parapenaeopsis stylifera* (H. Milne-Edwards) using a steroid hormone 17 hydroxy-progesterone. **Indian J. Mar. Sci.** 9(3): 227.

Okumura, T. and K. Aida. 2000. Haemolymph vitellogenin levels and ovarian development During the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fisheries science.** 66: 678-685.

Okumura, T., Y. K. Kim, I. Kawazoe, K. Yamano, N. Tsutsui and K. Aida. 2006. Expression of vitellogenin and cortical rod proteins during induced ovarian development by eyestalk

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ablation in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology.** 143(2): 246-253.

Okumura, T., K. Yamano and K. Sakiyama. 2007. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology.** 147(4): 1028-1037.

Quackenbush, L.S. 1991. **Regulation of vitellogenesis in penaeid shrimp.** In: DeLoach, P., ougherty, W.J., Davidson, M.A. (Eds.), Frontiers in Shrimp Research. Elsevier, Amsterdam, pp. 125-140.

Quackenbush, L. S. 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. **Comp. Biochem. Physiol.** 103: 711-714.

Quackenbush, L.S. 2001.Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. **American Zoolology.** 41: 458-464.

Quinitio, E.T., A. Hara, K. Yamauch and S. Nakao. 1994. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Comp. Biochem. Physiol.** 109: 21-26.

Palacios, E., D. Carreño, M.C. Rodrígez-Jaramillo and I.S. Racotta. 1999. Effect of eyestalk ablation on maturation, larval performance, and biochemistry of *Penaeus vannamei* broodstock. **J. Appl. Aquac.** 9: 1-23.

Paolucci, M., C. D. Cristo and A. D. Cosmo. 2002. Immunological evidence for progesterone and estradiol receptors in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes*. **Molecular Reproduction and Development.** 63(1): 55-62.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Parnes, S., E. Mills, C. Segall, S. Raviv, C. Davis and A. Sagi. 2006. Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. **Aquaculture.** 236(1-4): 593-606.

Pascual, C., E. Valera, C. Re-Regis, G. Gaxiola, A. Sánchez, L. Ramos, L.A. Soto and C. Rosas. 1998. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. **J. World Aquac. Soc.** 29: 447-484.

Parnes, S., E. Mills, C. Segall, S. Raviv, C. Davis and A. Sagi. 2004. Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. **Aquaculture.** 236(1-4): 593-606.

Pérez Farfante, I. and B. Kensley. 1997. **Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera.** Memoires du Museum National d' *Historie Naturelle*, Paris, France. 233 pp.

Perez-Velazquez, M., W. A. Bray, A. L. Lawrence, D. M. Gatlin Iii and M. L. Gonzalez-Felix. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture.** 198(3-4): 209-218.

Phiriyangkul, P. and P. Utarabhand. 2006. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin in the banana shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) merguiensis* and sites of vitellogenin mRNA expression. **Mol Reprod Dev.** 73(4): 410-23.

Phiriyangkul, P., P. Puengyam, I. B. Jakobsen and P. Utarabhand. 2007. Dynamics of vitellogenin mRNA expression during vitellogenesis in the banana shrimp Penaeus (*Fenneropenaeus merguiensis*) using real-time PCR. **Mol. Reprod. Dev.** 74: 1198-1207.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pina-Guzman, B., M. J. Solis-Heredia, A. E. Rojas-Garcia, M. Uriostegui-Acosta and B. Quintanilla-Vega. 2006. Genetic damage caused by methyl-parathion in mouse spermatozoa is related to oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol.** 216(2): 216-224.

Primavera, J.H. 1988. **Maturation reproduction and broostock technology.** Biology and Culture Of *Penaeus Monodon* Brackishwater Aquaculture Information System, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines, pp. 37-57.

Primavera, J.H. 1988. **Maturation reproduction and broostock technology Biology and Culture Of *Penaeus monodon* Brackishwater Aquaculture Information System**, Aquaculture Department, Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Iloilo, Philippines. pp. 37-57.

Primavera, J.H. and R.V. Caballero. 1992. Light quality and ovarian maturation in unablated and ablated giant tiger prawn *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture.** 108: 247-256.

Pudadera, R.A. and J. H.Primavera. 1981. Effect of light quality and eyestalk ablation on ovarian maturation in *Penaeus monodon.* Kalikasan. **Philipp. J. Biol.** 10:231-241.

Raviv, S., S. Parnes, C. Segall, C. Davis and A. Sagi. 2006. Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females. **General and Comparative Endocrinology.** 145(1): 39-50.

Rotllant, G., N. Pascual, F. Sarda, P. Takac and H. Laufer. 2001. Identification of methyl farnesoate in the hemolymph of the Mediterranean deep-sea species Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. **J. Crustacean Biol.** 21(2): 328-333.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rotllant, G., T. Peter, L. Lei, L. Grant Scott and H. Laufer. 2000. Role of ecdysteroids and methyl farnesoate in morphogenesis and terminal moult in polymorphic males of the spider crab *Libinia emarginata*. **Aquaculture.** 190: 103-118.

Rotllant, J., G. P.Worthington, J. Fuentes, P. M. Guerreiro, C. A. Teitsma and P. M. Ingleton. 2003. Determination of tissue and plasma concentrations of PTHrP in fish: development and validation of a radioimmunoassay using a teleost 1-34 N-terminal peptide. **General and Comparative Endocrinology.** 133(1): 146-153.

Rozgaj, R., V. Kasuba and A. Fucic. 2002. Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. **J.Trace Elem. Med. Biol.** 16: 187-192.

Rodriguez, E.M., L.S. Lopez Greco, D.A. Medesani, H. Laufer and M. Fingerman. 2002. Effect of Methyl farnesoate, Alone and in Combination with Other Hormones, on Ovarian Growth of the Red Swamp Crayfish (*Procambarus clarkia*) during Vitellogenesis. **Gen. Comp. Endocrinol.** 125(1): 34-40.

Rubery, E. D., Doran, J. F. and R. J. Thompson. 1982. Brain-type creatine kinase BB as a potential tumour marker-Serum levels measured by radioimmunoassay in 1015 patients with histologically confirmed malignancies. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology.** 18(10): 951-956.

Rychlik, W., Spencer, WJ. and RE. Rhoads. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. **Nucl Acids Res.** 18(21): 6409-6412.

Sagi, A., E. Homola and H. Laufer. 1991. Methyl farnesoate in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: systhesis by the mandibular organ in vitro, and titers in the hemolymph. **Comp. Biochem. Physiol.** 99: 879-882.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sagi, A., E. Homola and H. Laufer. 1993. Distinct reproductive types of male spider crab *Libinia emarginata* differ in circulation and synthesizing methyl farnesoate. **Biol. Bull.** 185: 168-173.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science.** 230(4732): 1350-1354.

Saiki, R., D. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K.Mullis and H. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science.** 239(4839): 487-491.

Sainz-Hernandez, J. C., I. S. Racotta, S. Dumas and J. Hernandez-Lopez. 2008. Effect of unilateral and bilateral eyestalk ablation in Litopenaeus vannamei male and female on several metabolic and immunologic variables. **Aquaculture.** 283(1-4): 188-193.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.1989. **Molecular cloning: A labolatory manual**. Cold Spring Harbor Labolatory Press., New York.

Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.).** Cold Spring Harbor Labolatory Press., New York.

Samocha, T.M., A.L. Lawrence and D. Poser. 1998. Salinity effect on growth and survival of juvenile *Penaeus vannamei* in a semi-closed recirculating system. **Isr. J. Aqua. Bam.** 50: 55-59.

Santos, E.A., L.E.M. Nery, R. Keller and A.A. Goncalves. 1997. Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. **Physiol. Zool.** 70: 415-420.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schroepfer, G.J. 2000. Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes . **Physiological reviews.** 80(1): 361-554.

Sharkey, D. J., E. R. Scalice, K. G. Christy, S. M. Atwood and J. L. Daiss. 1994. Antibodies as Thermolabile Switches: High Temperature Triggering for the Polymerase Chain Reaction. **Bio/Technology.** 12(5): 506-509.

Singh, N. P.,M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research.** 175(1): 184-191.

Silva Gunawardene, Y. I. N., W. G. Bendena, S. S. Tobe and S. M. Chan. 2003. Comparative immunohistochemistry and cellular distribution of farnesoic acid O-methyltransferase in the shrimp and the crayfish. **Peptides**. 24(10): 1591-1597.

Souty-Grosset, C. 1997. **Vitellogenin synthesis in marine invertebrates**. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. and Thompson, M. (Eds.). Recent Advances in Marine Biotechnology, Endocrinology and Reproduction. New Hampshire, Science Publishers: 203-247.

Spaziani, E. P., G. W. Hinsch and S. C. Edwards. 1993. Changes in prostaglandin E_2 and F_2 alpha during vitellogenesis in the Florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. **J Comp Physiol B.** 163(7): 541-545.

Speit, G., S. Haupter and A. Hartmann.1998. Evaluation of the genotoxic properties of paraquat in V79 Chinese hamster cells. **Mutat. Res.** 412: 187-193.

Sriussadaporn, C., K. Yamamoto., K. Fukushi and D. Simazaki. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environment. **Mut. Res.** 514: 31-44.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sreenivasula Reddy P., P. Ramachandra Reddy and G. Purna Chandra Nagaraju. 2004. The synthesis and effects of prostaglandins on the ovary of the crab Oziotelphusa *senex senex* .**General and Comparative Endocrinology.** 135(1): 35-41.

Stickney, R. R. and J. W. Andrews. 1971. Combined effects of dietary lipids and environmental temperature on growth, metabolism and body composition of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **J. Nutr.** 101: 1703-1710.

Subramoniam, T. 2011. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. **Fisheries Science.** 77(1): 1-21.

Tan-Fermin, J.D. and R.A. Pudadera. 1989. Ovarian Maturation Stages of the Wild Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture.** 77: 229-242.

Tahara, D. and I. Yano. 2003. Development of hemolymph prostaglandins assay systems and their concentration variations during ovarian maturation in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. **Aquaculture.** 220(1-4): 791-800.

Talbot, P., D. Howard, J. Leung-Trujillo, T.W. Lee, W.Y. Li, H. Ro and A.L. Lawrence. 1989. Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). **Aquaculture**. 78: 365-377.

Tan-Fermin, J.D., Pudadera, R.A., 1989. Ovarian Maturation Stages of the Wild Giant Tiger Prawn, *Penaeus monodon* Fabricius. **Aquaculture.** 77: 229-242.

Taylor, S. A., K. Celuch and S. Goodwin. 2004. The importance of brand equity to customer loyalty. **Journal of Product & Brand Management.** 13(4): 217-227.

Thompson, R. J., E. Rubery and H. Jones. 1980. Radioimmunoassay of serum creatine kinase-bb as a tumour marker in breast cancer. **The Lancet.** 316(8196): 673-675.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Tiu, S. H. K., J. Benzie and S.M. Chan. 2008. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. **Biol. Reprod.** 79(1): 66-74.

Tiu, S. H. K., J. H. Hui, A. S. Mak, J. G. He and S. Chan. M. 2006. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture.** 254: 666-674.

Treerattrakool, S., S.Panyim, S. M.Chan, B. Withyachumnarnkul and A. Udomkit. 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. **FEBS J.** 275(5): 970-980.

Tritek, 2013. About the TriTek Corp. Available Source: http://www.tritekcorp.com/index.php?id=autocomet. December 17, 2013.

Tsukimura, B. and F.A. Kamemoto. 1991. In-vitro stimulation of oocytes by presumptive madibular secretion in the shrimp *Penaeus vanamei*. **Aquaculture.** 92: 59-66.

Tsutsui, N., I. Kawazoe, T. Ohira, S. Jasmani, W. J. Yang, M. N. Wilder and K. Aida. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the Kuruma Prawn, *Penaenus japonicus*. **Zool. Sci.** 17: 651-660.

Tu, C., H.T. Huang, S.H. Chuang, J.P. Hsu, S.T. Kuo, N.J. Li, T.L. Hsu, M.C. Li and S.Y. Lin. 1999. Taura syndrome in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* cultured in Taiwan. **Dis. Aquat. Org.** 38:159-161.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Van Herp. F. and J.L. Kallen. 1991. **Neuropeptides and neurotranmitters in the X-organsinus gland complex, an important neuroendocrine integration centre in the eyestalk of Cruatacaen.** Comparative Aspects of Neuropeptides. 211-221 pp.

Vargas-Albores, F., M.A. Guzmán and J. L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology.** 106(2): 299-303.

Va´zquez-Boucard, C.G., P. Levy, H.J. Ceccaldi and C.H. Brogren. 2002. Developmental changes in concentrations of vitellin, vitellogenin, and lipids in hemolymph, hepatopancreas, and ovaries from different ovarian stages of Indian white prawn *Fenneropenaeus indicus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 281: 63-75.

Wang, W. N., J. Zhou, P. Wang, T. T. Tian, Y. Zheng, Y. Liu. . . and A. L. Wang. 2009. Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme gene expression in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* when exposed to acute pH stress. **Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology.** 150(4): 428-435.

Wainwright, G., S.G. Webster and H. H. Rees. 1998. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagarus*. **Biochem. J.** 334: 651-657.

Wang, Z., Q. Ding, K.J. Yagi and S.S. Tobe. 1994. Terminal stages in juvenile hormone biosynthesis in Corpora Allata of *Diploptera punctata*: development changes in enzyme activity and regulation by allatostatins. **J. Insect Physiol.** 40: 217-223.

Wang, Q., M. Misamore, C.Q. Jiang and C.L. Browdy. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. **J. World Aquac. Soc.** 26(3): 261-271.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Watanabe, M., S. M. Houten, C. Mataki, M. A. Christoffolete, B. W. Kim, H. Sato and J. Auwerx. 2006. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. **Nature.** 439(7075): 484-489.

Wainwright, G., S.G. Webster and H.H. Rees. 1998. Neuropeptide regulation of biosynthesis of the juvenoid, methyl farnesoate, in the edible crab, *Cancer pagarus*. **Biochem. J.** 334: 651-657.

Wang, C. and R. P. Croll. 2006. Effects of sex steroids on spawning in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **Aquaculture.** 256(1-4): 423-432.

Werner, S.C., G. Acebedo and I. Radichevich. 1974. Rapid radioimmunoassay for both T4 and T3 in the same sample of human serum. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 38(3): 493-5.

Wilder, M. N., T. Okumura and N. Tsutsui. 2010. Reproductive mechanisms in Crustacea focusing on selected prawn species: Vitellogenin structure, processing and synthetic control. **Aqua-BioScience Monographs.** 3(3): 73-110.

Wongsawang, P., A. Phongdara, A. Chanumpai and W. Chotigeat. 2005. Detection of CHH/GIH activity in fractionated extracts from the eyestalk of Banana prawn. **Songklanakarin J. Sci. Tech.** 27: 789-798.

Wouters, R., C. Molina, P. Lavens and J. Calderóna. 2001. Lipid composition and vitamin content of wild female *Litopenaeus vannamei* in different stages of sexual maturation. **Aquaculture.** 198: 307-323.

Wyban, J.A., C.S. Lee, J.N. Sweeney and W.R. Richards. 1987. Observations on development of a maturation system for *Penaeus vannamei*. **J. World Aquacult. Soc.** 18: 198-200.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yano, I. 1985. Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis* by progesterone. **Aquaculture.** 47: 223-229.

Yano, I., B.T. Tsukimura, J.N. Sweeney and J.A. Wyban. 1988. Induced ovarian maturation of *Penaeus vannamei* by implantation of lobster ganglion. **J. World Aquacult. Soc. 19**(4): 204-209.

Yano, I. 1995. Final oocyte maturation, spawning and mating in penaeid shrimp. **Journal of Experimental Biology and Ecology.** 193: 113-118.

Yang, Y., H. Ye, H. Huang, Z. Jin and S. Li. 2012. Cloning, expression and functional analysis of farnesoic acid O -methyltransferase (FAMeT) in the mud crab, *Scylla paramamosain*. **Marine & Freshwater Behaviour & Physiology.** 45(3): 209-222.

Xie, S., L. Sun, F. Liu and B. Dong. 2009. Molecular characterization and mRNA transcript profile of vitellogenin in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Mol. Biol. Rep.** 36: 389-397.

Xu, R.A. and M.F. Barker. 1990. Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (echinodermata: asteroidean) during the reproductive cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 95: 127-133.

Zapata, V., L. S. López Greco, D. Medesani and E. M. Rodríguez. 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulate* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. **Aquaculture.** 224(1-4): 339-352.

Zhang, P., X. Zhang, J. Li and G. Huang. 2006. The effects of body weight temperature salinity pH light intensity and feeding condition on lethal DO levels of white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture.** 256(1-4): 579-587.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ค่าความถูกต้อง (Recovery, %) ของการตรวจวัดระดับฮอร์โมน P_4 และ E_2 ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ

ปริมาณฮอร์โมน (pg/ml)		จำนวนหลอด (ก)	ปริมาณที่ตรวจวัดได้ ($\bar{X} \pm SD$)		Recovery (%)	
E_2	P_4		E2	P4	E2	P4
0	0	5	BS	BS	-	-
5	5	5	3.87 ± 0.61	4.87 ± 1.54	96.2	90.3
10	10	5	9.11 ± 1.04	9.34 ± 2.12	98.2	95.8
25	25	5	25.08 ± 2.25	24.37 ± 2.11	99.2	98.4

ตารางผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 ppt (Mean±SD, n=5)

15 ppt	P_4 (ngP_4/mgProtein)	E_2 (pgE_2/mgProtein)	$PGF_{2\alpha}$ ($\mu gPGF_{2\alpha}$/mgProtein)	GSI
Initial study	61.66±5.66	17.77±2.95	15.11±5.82	0.32±0.05
30	269.28±63.12	43.76±19.64	33.51±4.10	0.48±0.10
60	407.55±59.33	244.53±62.66	35.25±5.61	1.30±0.19
90	453.08±92.11	168.59±10.86	22.19±4.26	1.55±0.26
120	583.04±76.21	215.00±68.64	52.16±6.84	1.82±0.44

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 3 ความเข้มข้นของฮอร์โมน P_4 E_2 และ $PGF_{2\alpha}$ ในตัวอย่างน้ำเลือดกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และ ค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 30 ppt (Mean±SD, n=5)

30 ppt	P_4 (ngP_4/mgProtein)	E_2 (pgE_2/mgProtein)	$PGF_{2\alpha}$ ($\mu gPGF_{2\alpha}$/mgProtein)	GSI
Initial study	48.26±12.69	44.24±8.59	18.26±9.60	0.31±0.06
30	1182.14±254.31	487.47±80.11	65.62±12.06	1.38±0.23
60	1682.33±201.52	1009.98±139.41	117.10±11.10	1.83±0.23
90	1222.12±186.51	1495.89±165.91	98.39±12.87	2.02±0.34
120	1214.60±260.55	1778.45±122.51	129.25±18.46	2.32±0.51

ตารางผนวกที่ 4 อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)

Vg gene	Water salinity		GSI	
	15 ppt	30 ppt	15 ppt	30 ppt
Initial study	0.56±0.17	0.63±0.13	0.32±0.05	0.31±0.06
30	0.65±0.33	1.59±0.69	0.48±0.10	1.38±0.23
60	0.96±0.48	1.68±0.75	1.30±0.19	1.83±0.23
90	1.51±0.72	1.87±0.63	1.55±0.26	2.02±0.34
120	1.69±0.92	2.01±0.94	1.82±0.44	2.32±0.51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 5 ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ Vg gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)

Vg gene	Water salinity		GSI	
	15 ppt	30 ppt	15 ppt	30 ppt
Initial study	0.38±0.15	0.52±0.16	0.32±0.05	0.31±0.06
30	0.67±0.39	1.62±0.75	0.48±0.10	1.38±0.23
60	0.85±0.42	1.84±0.51	1.30±0.19	1.83±0.23
90	1.36±0.66	1.91±0.86	1.55±0.26	2.02±0.34
120	1.55±0.78	1.93±0.41	1.82±0.44	2.32±0.51

ตารางผนวกที่ 6 ค่าอัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)

FAMeT gene	Water salinity		GSI	
	15 ppt	30 ppt	15 ppt	30 ppt
Initial study	0.57±0.13	0.64±0.18	0.32±0.05	0.31±0.06
30	1.05±0.94	1.92±0.93	0.48±0.10	1.38±0.23
60	1.29±0.87	2.15±0.74	1.30±0.19	1.83±0.23
90	1.87±1.06	2.14±0.98	1.55±0.26	2.02±0.34
120	1.95±0.82	2.1±0.38	1.82±0.44	2.12±0.51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 7 อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ของ FAMeT gene ในตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียในช่วงการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปฐมภูมิ และค่า GSI ที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt (Mean±SD, n=5)

FAMeT gene	Water salinity		GSI	
	15 ppt	30 ppt	15 ppt	30 ppt
Initial study	0.61±0.21	0.42±0.17	0.32±0.05	0.31±0.06
30	1.22±0.71	2.05±0.89	0.48±0.10	1.38±0.23
60	1.43±0.95	2.48±0.94	1.30±0.19	1.83±0.23
90	1.57±0.86	1.99±0.73	1.55±0.26	2.02±0.34
120	1.68±0.64	2.23±0.38	1.82±0.44	2.12±0.51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 8 ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ กลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธีแบบดังเดิม (Mean±SD, n=5)

Parameters	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Males weight (g) (initial study)	35.6±5.74 [a]	36.2± 6.1 [a]	36.9±4.6 [a]	36.4±7.9 [a]
Males weight (g) (final study)	38.8± 6.1 [a]	37.9 ± 4.2 [a]	41.1 ±3.1 [a]	42.5±8.2 [a]
Males length (cm) (initial study)	15.3±0.8 [a]	15.2±0.9 [a]	15.9±0.8 [a]	15.1±0.8 [a]
Males length (cm) (final study)	16.1±0.7 [a]	16.0±0.6 [a]	16.0 ±0.7 [a]	16.5±0.8 [a]
Total sperm counting ($x10^5$) (vas deferens)	65.4±13.6 [a]	67.3±17.2 [a]	72.9± 5.2 [a]	71.2±9.1 [a]
Total sperm counting (spermatophores)	6.4($x10^4$)±1.3 [b]	9.0($x10^4$)±2.9 [b]	19.5($x10^5$)±3.6 [a]	23.9($x10^5$)±3.7 [a]
Dead cell (%) (1 hr. incubation)	63.2± 17.9 [a]	40.3±15.2 [b]	12.8±3.7 [c]	5.5±1.6 [d]
Dead cell (%) (3 hr. incubation)	86.2±13.4 [a]	79.5±15.0 [a]	28.6±10.8 [b]	16.5±3.3 [b]
Sperm diameter (3µm) (%)	91.2±22.1 [a]	83.2± 29.7 [a]	39.1±11.8 [b]	5.3±2.1 [c]
Sperm diameter (5µm) (%)	8.7±1.6 [d]	16.7±3.2 [c]	60.8±19.1 [b]	94.7±21.6 [a]

หมายเหตุ : อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 9 ค่าตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มของกุ้งขาวแวนนาไม ในกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ ความเค็มน้ำ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)

Parameters	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Heath cell (%)	12.2±2.3 [b]	11.6±2.4 [b]	41.2±7.9 [a]	42.8±12.3 [a]
Cell dead (%)	35.2±6.5 [a]	39.1±6.0 [a]	18.5±3.2 [b]	8.4±1.6 [c]
Comet cell (%)	52.4±8.3 [a]	49.1±9.6 [a]	40.2±6.7 [a]	48.6±5.3 [a]

หมายเหตุ : อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางผนวกที่ 10 ผลการวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งทดลองเลี้ยงที่ความเค็มน้ำ 15 และ 30 ppt ในบ่อดินและบ่อซีเมนต์ วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)

Comet parameter	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
Comet Length	447.3±34.0[a]	233.4±15.4[b]	126.5±2.9[c]	78.7±14.1[d]
Comet Height	171.2±13.2[a]	97.4±14.7[b]	61.6±13.9[b]	47.5±13.1[b]
Comet area	29131±2620[a]	17813±1006.7[b]	7724±1280[c]	3818±816.9[d]
Comet Mean Intensity	89.9±13.8[a]	84.6±2.9[a]	53.8±3.9[b]	32.5±7.0[b]
Head Diameter	19.6±13.6[c]	22.3±9.2[c]	48.1±6.2[b]	67.9±1.7[a]
Head Mean Intensity	21.3±4.3[c]	22.9±2.7[c]	32.7±4.3[b]	58.3±7.0[a]
Tail Length	225.6±30.6[a]	121.1±13.9[a]	88.4±18.6[b]	30.7±13.3[c]
DNA in Head (%)	21.0±12.9[b]	31.9±11.6[b]	56.6±8.1[a]	76.0±7.7[a]
DNA in Tail (%)	28.9±2.9[a]	20.0±1.6[a]	15.3±1.1[b]	3.9±1.7[c]
Tail moment (%)	37.3±10.2[a]	8.6±1.1[b]	5.7±1.5[b]	1.4±0.8[b]
Olive Moment	17.8±4.6[a]	4.4±0.8[b]	3.3±1.1[b]	0.9±0.4[c]

หมายเหตุ : ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างชนิดกันกำกับเหนือตัวเลขแถวเดียวกัน ณ ตัวบ่งชี้วัด (comet parameter) ชนิดเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 11 ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศผู้ กลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 คัดเลือกตัวอย่างสเปิร์มจากกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธีแบบดังเดิม (Mean ±SD, n=5)

Parameters	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Males weight (g) (final study)	41.5±2.3 [a]	42.5±1.5 [a]	43.6±1.1 [a]	43.0±0.6 [a]
Males length (cm) (final study)	16.3±0.2 [a]	16.2±0.2 [a]	16.1±0.5 [a]	16.4±0.2 [a]
Total sperm counting (10^6)	4.1±0.6 [a]	4.7±0.9 [a]	4.8±0.2 [a]	4.2±0.3 [a]
Dead cell (%)	34.4±7.0 [a]	36.9±11.9 [a]	37.6±10.5 [a]	42.0±10.3 [a]
Spermatophore weight (g)	0.202±0.0 [a]	0.202±0.0 [a]	0.2014±0.0 [a]	0.203±0.0 [a]
Spermatophore formation (day)	7.2±1.0 [a]	5±0.7 [a]	4.6±0.5 [a]	3.4±0.5 [a]

หมายเหตุ: อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางผนวกที่ 12 ข้อมูลพื้นฐานของกุ้งขาวแวนนาไมเพศเมีย กลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน (Mean ±SD, n=5)

Parameters	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Females weigth (g/shrimp)	68.2±2.0 [a]	68.0±2.9 [a]	69.9±1.4 [a]	68.8±0.8 [a]
Females length (cm/shrimp)	18.2±0.7 [a]	18.7±0.7 [a]	19.1±1.0 [a]	19.9±0.4 [a]
Nauplius (x10^4) (shrimp)	6.7±1.6 [a]	12.1±1.1 [a]	16.7±0.9 [a]	21.3±1.1 [a]

หมายเหตุ: อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 13 ค่าตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)

Parameters	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Heath cell (%)	38.4±14.3	37.0±14.2	70.0±4.0	82.4±8.2
Cell dead (%)	32.0±10.2	27.8±10.7	14.2±6.0	9.2±5.2
Comet cell (%)	29.6±10.1	30.8±10.1	13.4±6.1	8.4±4.1
Cell dead + Comet cell (%)	61.6±15.3	58.6±10.6	27.6±7.9	17.6±8.2

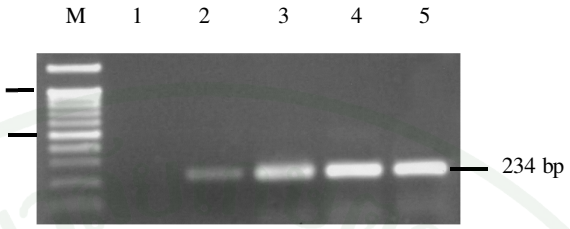
หมายเหตุ : อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ตารางผนวกที่ 14 ค่า Comet parameter ใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาวแวนนาไม ในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 4 ซึ่งแต่ละกลุ่มทดลองมีปริมาณลูกกุ้งขาวแวนนาไมวัยอ่อนต่างกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี comet assay (Mean ±SD, n=5)

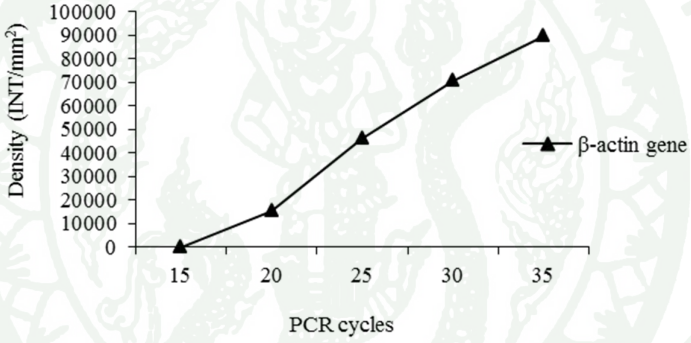
Comet parameter	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3	กลุ่มที่4
Comet Length	150.6±113.9^{a}	116.8±48.8^{b}	79.2±19.3^{c}	71.6±24.1^{c}
Comet Mean Intensity	115.2±28.8^{a}	94.1±22.8^{a}	87.7±11.5^{b}	70.9±26.0^{b}
Head Diameter	27.4±5.4^{b}	28.2±4.5^{b}	38.9±10.9^{a}	39.9±19.7^{a}
Head Area	2032.5±1001.3^{c}	2266.7±774.4^{c}	4949.9±3269.81^{b}	7908.9±9127.5^{a}
Head Mean Intensity	59.9±26.2^{d}	88.4±23.3^{b}	82.4±12.0^{c}	112.0±29.8^{a}
Tail Length	110.7±97.9^{a}	77.8±41.2^{b}	50.9±18.1^{c}	44.1±21.8^{c}
Tail Mean Intensity	112.0±29.8^{a}	88.4±23.3^{b}	82.4±12.0^{c}	59.9±26.2^{d}
%DNA in Head	83.1±10.1^{c}	93.5±4.9^{b}	93.7±3.6^{b}	96.7±3.5^{a}
%DNA in Tail	16.8±10.1^{a}	16.8±10.1^{a}	6.2±3.6^{b}	3.2±3.5^{c}
Tail moment	23.9±16.8^{a}	6.1±1.1^{b}	3.1±0.2^{c}	1.5±1.01^{c}
Olive Moment	12.6±14.7^{a}	3.9±4.6^{b}	1.4±0.8^{c}	0.8±1.0^{c}

หมายเหตุ : อักษรที่แสดงด้านบนตัวเลขที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

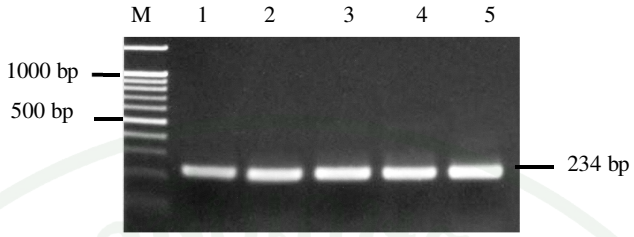


(B)

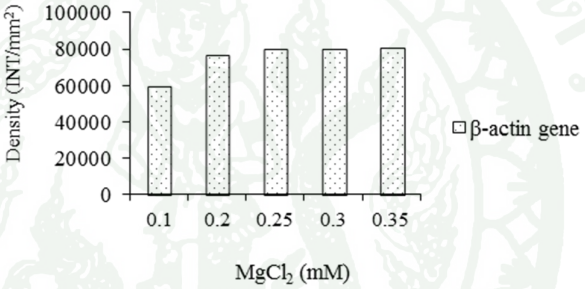
ภาพผนวกที่ 1 แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนด PCR Cycle ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ β-actin gene ที่ PCR cycle เท่ากับ 15 20 25 30 และ 35 รอบ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)



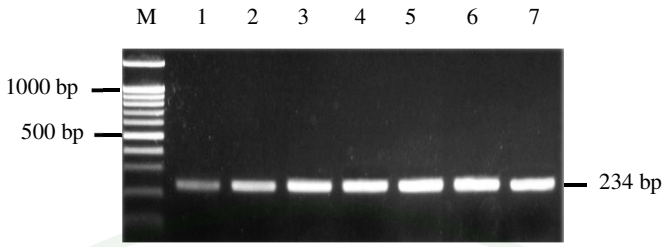
(B)

ภาพผนวกที่ 2 แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน และรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ โดย

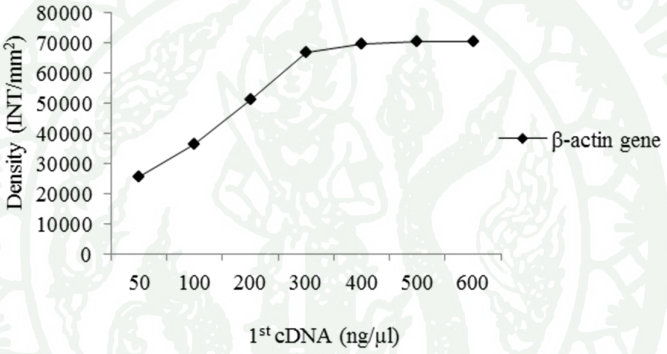
- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ β-actin gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.1 0.2 0.25 0.3 และ 0.35 mM ตามลำดับ

\

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

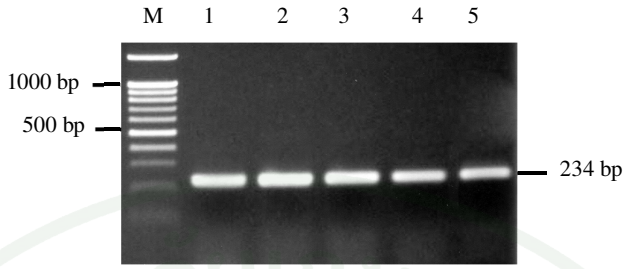


(B)

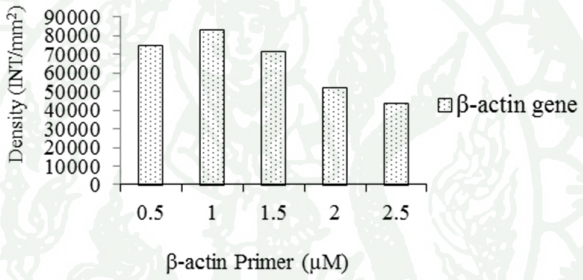
ภาพผนวกที่ 3 แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1stcDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-7 คือ การแสดงออกของ β-actin gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1stcDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ คือ 50 100 200 300 400 500 และ 600 ng/µl ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

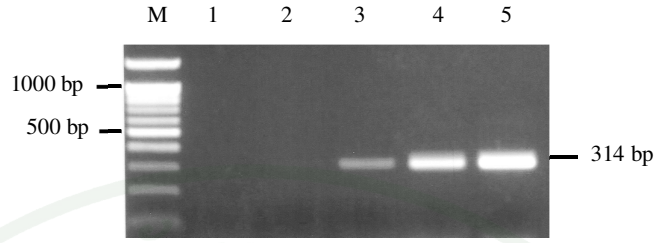


(B)

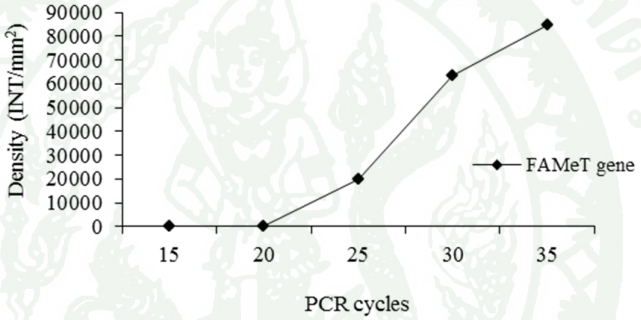
ภาพผนวกที่ 4 แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ β-actin primer ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ β-actin gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ β-actin Primer ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 μM ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

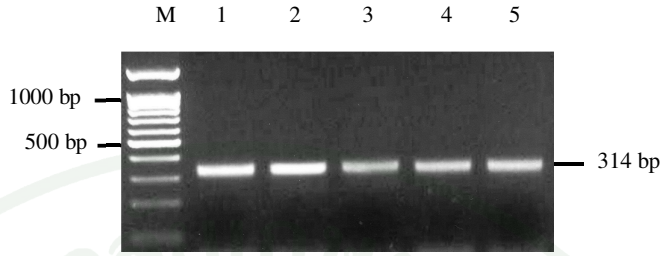


(B)

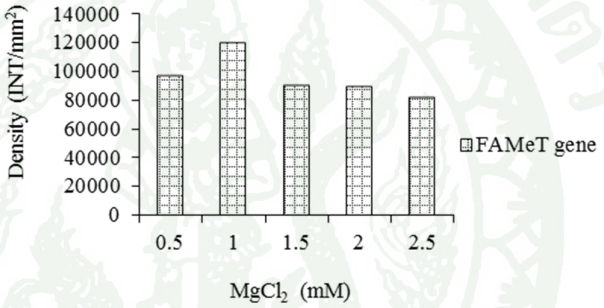
ภาพผนวกที่ 5 แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนด PCR Cycle ที่ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ FAMeT gene ที่ PCR cycle เท่ากับ 15 20 25 30 และ 35 รอบ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

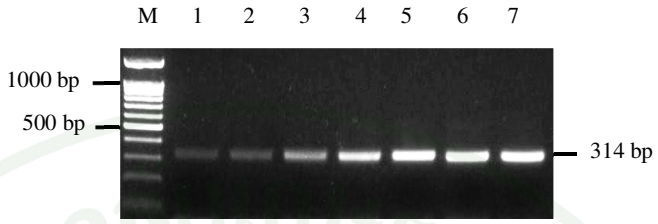


(B)

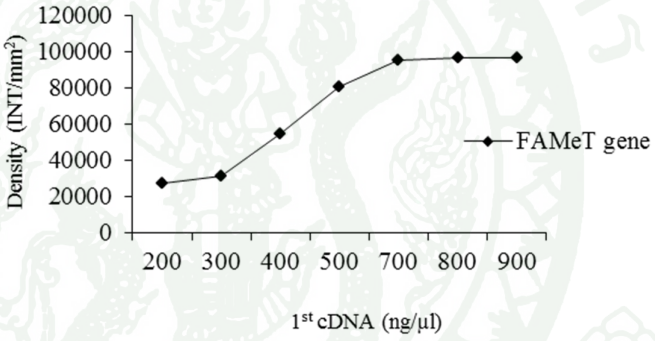
ภาพผนวกที่ 6 แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ FAMeT gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (components) โดยมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 mM ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

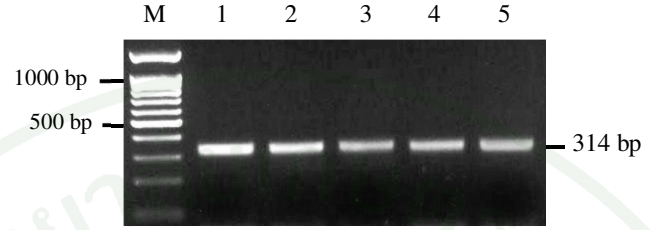


(B)

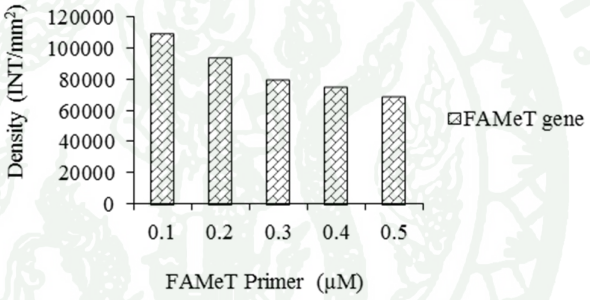
ภาพผนวกที่ 7 แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density(INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน กุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-7 คือ การแสดงออกของ FAMeT gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ คือ 200 300 400 500 700 800 และ 900 ng/µl ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

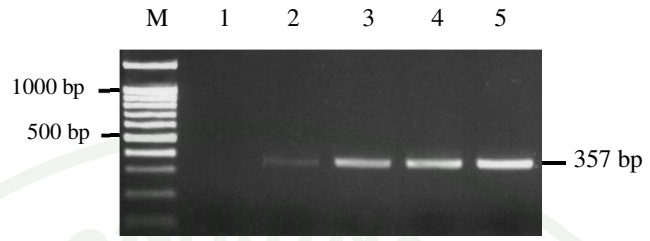


(B)

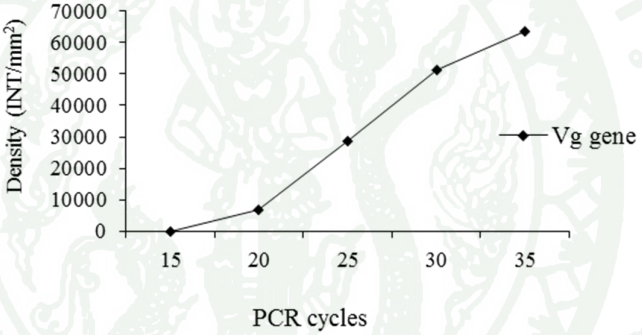
ภาพผนวกที่ 8 แถบดีเอ็นเอของ FAMeT gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1stcDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้น FAMeT Primer ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ FAMeT gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ FAMeT Primer ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 µM ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

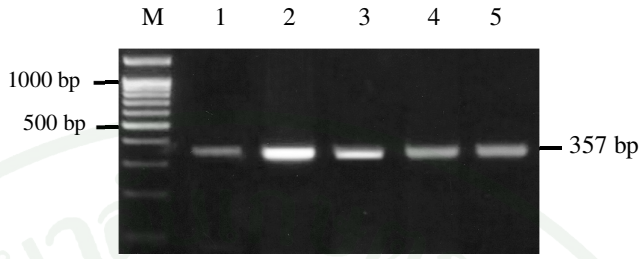


(B)

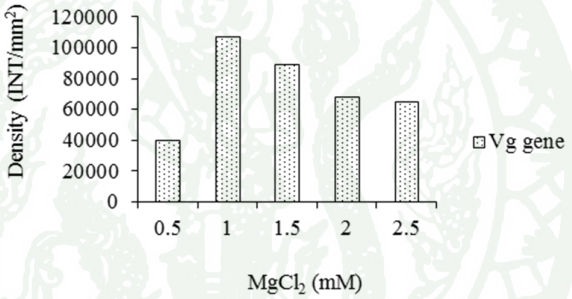
ภาพผนวกที่ 9 แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1^{st}cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนด PCR Cycle ที่ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ Vg gene ที่ PCR Cycle เท่ากับ 15 20 25 30 และ 35 รอบ ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

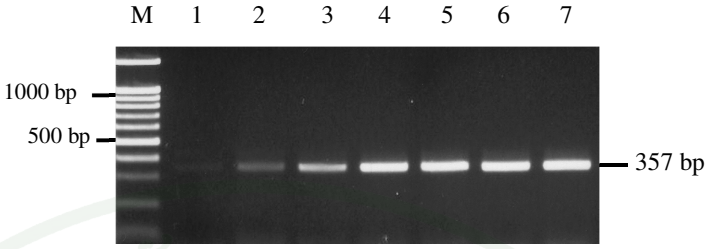


(B)

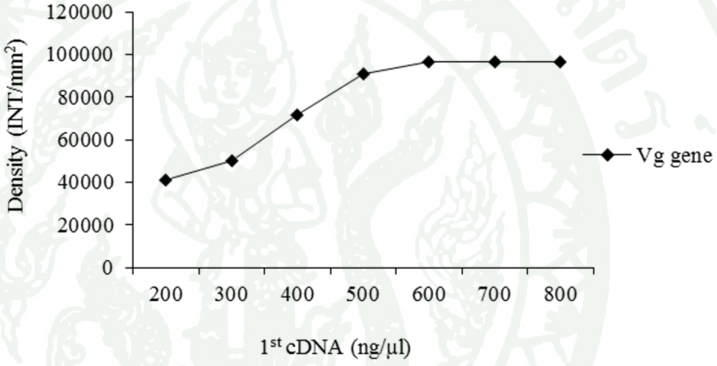
ภาพผนวกที่ 10 แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับโดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ Vg *gene* จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยมีความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.5 1 1.5 2 และ 2.5 mM ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

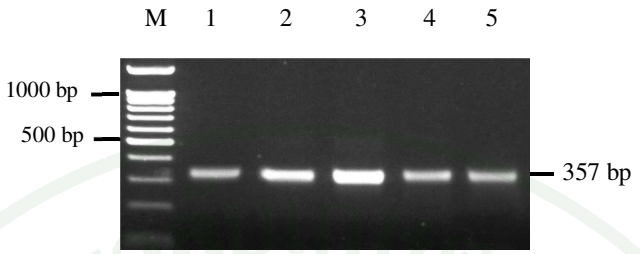


(B)

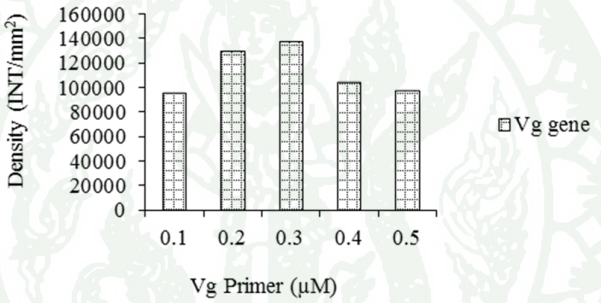
ภาพผนวกที่ 11 แถบดีเอ็นเอของ Vg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-7 คือ การแสดงออกของ Vg gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ 1^{st}cDNA Template ต่างกัน 7 ระดับ คือ 200 300 400 500 600 700 และ 800 ng/µl ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



(A)

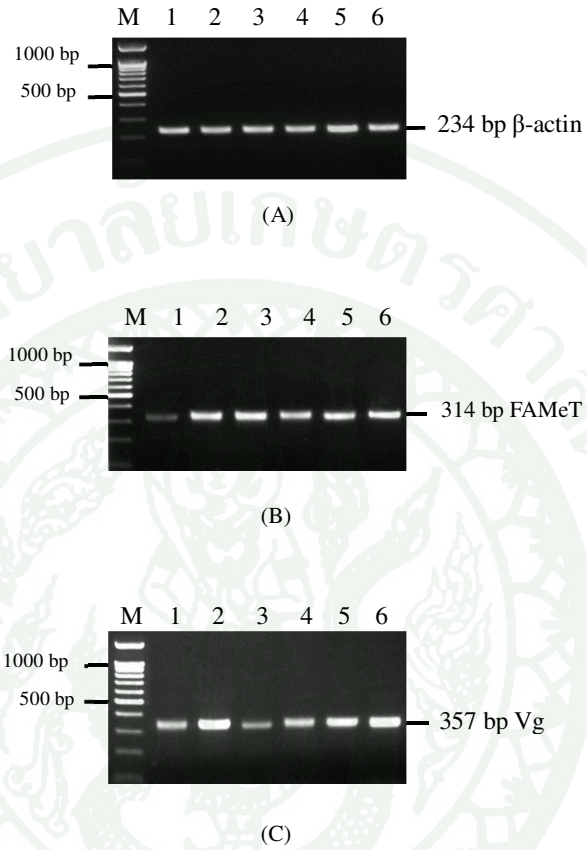


(B)

ภาพผนวกที่ 12 แถบดีเอ็นเอของVg gene (A) และ ค่า Density (INT/mm^2) (B) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไมผสมกัน วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ Vg Primer ต่างกัน 5 ระดับ โดย

- Lane M คือ 100 bp DNA ladders marker
- Lane 1-5 คือ การแสดงออกของ Vg gene จากส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR โดยกำหนดความเข้มข้นของ Vg Primer ต่างกัน 5 ระดับ คือ 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 µM ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 13 แถบดีเอ็นเอของ β-actin gene (A) FAMeT gene (B) และ Vg gene (C) ซึ่งสังเคราะห์ 1st cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ และตับและตับอ่อน ของกุ้งขาวแวนนาไม วิเคราะห์ผลด้วยวิธี RT-PCR โดย

- Lanes M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (a 100 bp DNA ladder)
- Lanes 1-3 คือ แถบดีเอ็นเอซึ่งสังเคราะห์จาก 1st cDNA สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่ของกุ้งขาวแวนนาไม
- Lanes 4-6 คือ แถบดีเอ็นเอซึ่งสังเคราะห์จาก 1st cDNA สกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวแวนนาไม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นายเอกชัย ดวงใจ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	6 มีนาคม 2520
สถานที่เกิด	จังหวัดศรีสะเกษ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	พนักงานมหาวิทยาลัย (อาจารย์)
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สาขาสัตวศาสตร์และประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การเกษตรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์