

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5780011
 ชื่อโครงการ : การศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย และการประยุกต์ใช้ฮอริโมนนิวโรเปปไทด์เอฟ ต่อการเจริญเติบโต การพัฒนารังไข่ และการตกไข่ ของกึ่งก้ามกราม
 ชื่อนักวิจัย: รศ.ดร.ยศวันต์ ตินิกุล
 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
 อีเมลล์ : yotsawan.tin@mahidol.ac.th, anatch2002@gmail.com
 ระยะเวลาโครงการ : 15 มิถุนายน 2557 ถึง 16 มิถุนายน 2560

กึ่งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าสูงทางเศรษฐกิจของประเทศไทยซึ่งมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางในแถบภูมิภาคเอเชียและประเทศไทย ปัญหาและอุปสรรคที่มักพบในการเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามกรามในปัจจุบัน โดยเฉพาะประสิทธิภาพในการผลิตพ่อแม่พันธุ์และแม่พันธุ์ที่สามารถผลิตเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนก็ยังมียู่มาก เนื่องจากการเลี้ยงในสภาพกักขังและมีประชากรหนาแน่นทำให้กึ่งเกิดความเครียดโดยปล่อยฮอริโมนความเครียด ทำให้กึ่งลดประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ลง นอกจากนี้การตัดตาแม่พันธุ์กึ่ง เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ การฟักออกเป็นตัวของลูกกึ่งให้เร็วขึ้น ซึ่งวิธีการเหล่านี้นอกจากจะเป็นวิธีการทรมานกึ่งแล้ว ยังส่งผลต่ออายุขัยและจำนวนครั้งของการสืบพันธุ์ของแม่พันธุ์กึ่ง และปริมาณของลูกกึ่งในแต่ละครั้งด้วย ซึ่งวิธีการเหล่านี้อาจจะไม่เป็นที่ยอมรับในอนาคต อีกทั้งอาหารสำเร็จที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กึ่งอาจจะไม่เหมาะสมที่จะกระตุ้นให้กึ่งมีประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้คือ ทำการศึกษาคุณลักษณะ การกระจาย ตรวจสอบผลของนิวโรเปปไทด์เอฟ (NPF) ต่อวงจรการพัฒนาของรังไข่และการตกไข่ ของกึ่งก้ามกรามเพศเมีย นอกจากนี้เราได้ศึกษาระดับ การปรากฏและการกระจายของสารสื่อประสาทและความสัมพันธ์ที่เป็นไปได้กับ NPF ต่อการพัฒนาของระยะตัวอ่อนในกึ่งก้ามกราม โดยผู้วิจัยพบว่า NPF ประกอบด้วยสองกลุ่มหลัก คือ Long NPF (MrNPF-I, MrNPF-II, MrNPF-III) และ Short NPF โดยยังพบว่า การแสดงออกของยีน NPF และการกระจายตัวของ NPF ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายโดยใช้วิธี RT-PCR และ Immunohistochemistry มีการแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายแห่งด้วยกัน อาทิ สมอง ปมประสาทช่องอก ปมประสาทลำตัว และ รังไข่ นอกจากนี้ยังได้ทำการกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์กึ่งด้วย NPF พบว่า NPF ทำให่วงจรการพัฒนาของรังไข่และการตกไข่สั้นลง และส่วนค่า GSI และ oocyte diameter มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าสารสื่อประสาทมีการกระจายตัว และมีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนด้วย อย่างไรก็ตาม หน้าทีหลักของ NPF และความสัมพันธ์ของ NPF กับสารสื่อประสาท ในการควบคุมการพัฒนาของรังไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนในเชิงลึกยังต้องมีการศึกษาเป็นลำดับต่อไป จากการศึกษาในครั้งนี้มีประโยชน์อย่างมากในการได้รับองค์ความรู้พื้นฐานใหม่ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบและหน้าที่ของ NPF ในกึ่งก้ามกรามเพศเมีย และอาจจะสามารถนำ NPF มาประยุกต์ใช้ในการกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่และการฟักออกเป็นตัวของลูกกึ่งก้ามกรามให้เร็วขึ้นแทนการใช้วิธีตัดตาได้ในอนาคต

คำสำคัญ: นิวโรเปปไทด์เอฟ, ซีโรโทนิน, โดพามีน, ระบบประสาท, รังไข่, วงจรการพัฒนาของรังไข่, การตกไข่ ตัวอ่อน, กึ่งก้ามกราม

Abstract

Project Code : RSA5780011

Project Title : Characterization and localization of neuropeptide F, and its applications in growth, ovarian maturation and spawning of the female freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

Investigators : Assoc. Prof. Dr. Yotsawan Tinikul
Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University

E-mail Address : yotsawan.tin@mahidol.ac.th, anatch2002@gmail.com

Project Period : 15 June 2014 to 16 June 2017

The giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, is one of the most commercially important freshwater crustacean species cultured in Thailand. The prawn aquaculture has lower productivity due to disease problems and the fecundity of female broodstocks which leads to the production of gametes, embryos larvae declines due to culture in captivity with a high population density, which may cause the release of stress hormones. At present, the best food that has been used for feeding prawns and shrimps in farms, but they are expensive and inconvenient in storage and feeding. Alternatively, the use of hormones could be one way to stimulate ovarian maturation and spawning. Neuropeptide F (NPF) is a neuropeptide with an R_xRFamide carboxy terminus, and has been proposed to play an important role in feeding, energy homeostasis, and reproduction in invertebrates. In this proposal, we investigated the characterization, expression, distribution of NPF in the central nervous system and ovary, and its role in controlling ovarian maturation and spawning in the female freshwater prawn, *M. rosenbergii*. There were four putative NPFs identified using transcriptomic analysis of cDNA from our research group, and we further validated the data in this study using molecular cloning and RT-PCR techniques. They were designated as MrNPF-I, MrNPF-II, MrNPF-III and a short NPF (sNPF). The sequencing results showed that the deduced amino acid sequences of all MrNPF isoforms were similar to the sequence data obtained from transcriptomic analysis. Thus, this can ascertain the NPF sequences in female *M. rosenbergii*. We further produced, tested the specificity of MrNPF antibody and used it for further immunohistochemical studies. MrNPF-ir was distributed extensively in neurons, fibers, and neuropils in the brain, SEG, thoracic ganglia and abdominal ganglia. MrNPF-immunoreactivity (-ir) was detected in the ovaries and was more intense in the early- and mid-stages of ovarian development, and suddenly decreased in the mature stages. By RT-PCR, *MrNPF* transcript levels also increased during the early- and middle stages of ovarian development, and suddenly fell at late stage. MrNPF-treated prawns showed significantly decreased ovarian maturation periods, and increased GSI, OD, Vg levels compared with those of control groups. MrNPF also caused significantly earlier spawning compared with the control groups, and the numbers of eggs per spawn among experimental groups were higher compared with those of the controls. However, the mean fecundity between MrNPF-treated prawns and controls did not differ significantly. In addition to the investigation of the effects of MrNPF on female ovarian maturation and spawning, we further investigated whether NPF is involved in controlling embryonic development and/or in relation to major neurotransmitters. First, we examined the expression and changes in the levels, and possible actions of major neurotransmitters (5-HT and DA) in this grant, since we believed that 5-HT and DA could be the first hierarchical molecules in regulation of NPF in reproduction and probably embryonic development. The 5-HT concentrations gradually increased from the pale yellow egg to orange egg stages, and reaching a maximum at the black egg stage, while DA concentrations were much lower in the early embryos than those of 5-HT ($P < 0.05$). 5-HT was firstly detected in the early embryonic stages, whereas DA developed later than 5-HT. Functionally, 5-HT-treated prawns produced embryos with significantly shortened lengths of early embryonic stages, whereas DA-treated prawns lengthened the period of mid-embryonic stage onwards. However, the expression and precise action of NPF and mechanisms between 5-HT/DA and NPF in the regulation of ovarian maturation and embryonic development of this female prawn needed to be clarified by further studies. Finally, the results of this project should improve the basic knowledge of NPF and neuroendocrine-hormonal regulation in the prawn reproduction, and in finding the way to enhance the prawn reproduction for aquaculture.

Keywords: Neuropeptide F; Neurotransmitter; Ovarian maturation; Spawning; Central nervous system, Embryonic development; Freshwater prawn; *Macrobrachium rosenbergii*