



ความสัมพันธ์ระหว่างวงจรลอกคราบกับพัฒนาการของเซลล์อสุจิ
ในพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดิน

**The Relationship between Molting Cycle and Sperm Development of
Male Domesticated Broodstock *Penaeus monodon***

จุฑาทิพย์ พร้อมมุล

Juthatip Prommoon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Aquatic Science**

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ระหว่างวงจรการลอกคราบกับพัฒนาการของเซลล์อสุจิในพ่อ
พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดิน
ผู้เขียน นางสาวจุฑาทิพย์ พร้อมมูล
สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนา วีระชาติยานุกุล)

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.นพ.บุญเสริม วิทย์ชำนานุกุล)

.....กรรมการ
(ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

.....
(ดร.พรพิมล เชื้อดวงสุข)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.นพ.บุญเสริม วิทย์ชำนานุกุล)

.....
(ดร.รพีพรรณ วานิชวิริยกิจ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์คารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ระหว่างวงจรการลอกคราบกับพัฒนาการของเซลล์อสุจิใน พ่อพันธุ์กึ่งกุลาค่าที่เลี้ยงในบ่อดิน
ผู้เขียน	นางสาวจุฑาทิพย์ พร้อมมูล
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

เนื่องจากระบบสืบพันธุ์ของกึ่งกุลาค่าเพศผู้ มีความสำคัญในโครงการพัฒนาสายพันธุ์กึ่งกุลาค่า ซึ่งต้องอาศัยประสิทธิภาพของเซลล์อสุจิ ได้มีการตั้งสมมุติฐานว่า นอกจากอายุของกึ่ง ซึ่งต้องโตเต็มวัย และสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมแล้ว ความสมบูรณ์ของเซลล์อสุจิยังอาจเกี่ยวข้องกับวงจรการลอกคราบด้วย ในงานทดลองครั้งนี้ จึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการสร้างเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ ในระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบ โดยมุ่งไปที่การสร้างเซลล์อสุจิใน testis ลักษณะของเซลล์อสุจิและเนื้อเยื่อวิทยาใน vas deferens ลักษณะและปริมาณของเซลล์อสุจิ และเนื้อเยื่อวิทยาของ terminal ampoule และ spermatophore โดยทำการศึกษาทางสัณฐานวิทยาด้วย light และ transmission electron microscope และศึกษา protein profiles ของเซลล์อสุจิใน testis ใน vas deferens และใน spermatophore ในระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบ จากผลงานวิจัยนี้ พบว่า มีการสร้างเซลล์อสุจิของกึ่งอย่างต่อเนื่องใน testis และมีการลำเลียงเซลล์อสุจิมาตามท่อ vas deferens อย่างต่อเนื่องเช่นกัน ตลอดวงจรการลอกคราบ เซลล์อสุจิถูกนำมาสะสมและหุ้มห่อด้วยเนื้อเยื่อเหนียวๆ เพื่อรับการปกป้อง ที่ terminal ampoule โดยเซลล์อสุจิและเนื้อเยื่อเหนียวๆ นั้น ประกอบกันเป็น spermatophore ซึ่งจะมีขนาดและปริมาณของเซลล์อสุจิสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ เริ่มจากการลอกคราบ (ระยะ E) หลังจากระยะ E วงจรจะเปลี่ยนไปเป็นระยะ A, B, C, และ D ตามลำดับ โดยที่ระยะ D ประกอบด้วย D0-D4 และระยะ D4 เป็นระยะสุดท้าย ก่อนการลอกคราบหนึ่งวงจรของการลอกคราบ กินเวลา 15 วัน การศึกษานี้ พบว่าระยะ D1-D2 จะเป็นระยะที่มีปริมาณเซลล์อสุจิใน spermatophore มากที่สุด เมื่อมาถึงระยะ D3-D4 ปริมาณเซลล์อสุจิจะน้อยลง และเริ่มมีการแตกออกของเนื้อเยื่อที่หุ้มเซลล์อสุจิ เกิดการสูญหาย หรือหลุดออกของเซลล์อสุจิจาก spermatophore เมื่อถึงระยะลอกคราบ จะไม่พบ spermatophore และเซลล์อสุจิใน terminal ampoule เลย นอกจากนั้นยังพบการเปลี่ยนแปลงของ protein profile ในเซลล์ที่สกัดออกมาจาก testis จาก vas deferens และจาก spermatophore ด้วย จากผลงานนี้ สามารถสรุปได้ว่า การสะสมของเซลล์อสุจิของกึ่งกุลาค่าเพศผู้โตเต็มวัยใน spermatophore มีการเปลี่ยนแปลงไปตามวงจรของ

การลอกคราบ โดยมีปริมาณของเซลล์อสุจิใน spermatophore มากที่สุดในระยะ D1-D2 แต่เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction พบว่ามีค่าสูงที่สุดในระยะ A-B และระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสืบพันธุ์ คือระยะ D1-D2 ซึ่งมีเซลล์อสุจิปริมาณมากที่สุดใน spermatophore

Thesis Title The Relationship between Molting Cycle and Sperm Development of Male Domesticated Broodstock *Penaeus monodon*

Author Miss Juthatip Prommoon

Major Program Aquatic science

Academic Year 2010

ABSTRACT

In addition to the female fertility, reproductive performance of male *Penaeus monodon* also plays a vital role in the breeding program of the species. Apart from being sexually mature and reared under suitable environment, the ability to reproduce may depend on molting stages of the males as well. In this study, spermatogenesis in testis, sperm transport to vas deferens and sperm storage in spermatophore were examined in sexually mature male shrimp, correlating to the molting stages. The studies were performed by light and transmission electron microscopy, and protein profiling of cell extracts from testes, vas deferens and spermatophores. Histologically, spermatogenesis was considered to be a continuous process as the synchronized development of the germ cells could be found in all the lobes of the testis in every molting stages. This process appeared not to be dependent on the molting stages. The sperm were transported through the vas deferens and stored in the terminal ampoule, where they were embedded in the glutinous matrix that formed the thick protective layer for the sperm. Sperm were completely depleted from the spermatophore during stage E (molting) and their number progressively increased from stages A, B, C and D (subdivided into D0 to D4). The molting cycle from stage E to D4 took 15 days. We found that spermatophore of D1-D2 stages contained the highest number of sperm. The spermatophores of the stages D3-D4 possessed a gradual decreased number of the sperm with a sign of detaching matrix from the sperm mass, resulting in several empty spaces within the spermatophore. The terminal ampoule at stage E was devoid of spermatophore. The protein profiles of the cell extracts from the testis, vas deferens and spermatophore were different among the cell types but the profiles were not dissimilar among the subgroups (A-E) of each cell type. In conclusion, molting stages affect the number of sperm in the spermatophores which was highest in stages D1-D2. However, the ability of sperm to undergo acrosome reaction was slightly

higher in stages A-B. Therefore, it may be reasonable to propose that stages D1-D2 would be the best period for mating based on the number of sperm.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ โดยได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่าย บุคคลเหล่านี้ล้วนให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ผู้วิจัยกราบขอบพระคุณ ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัยและตรวจข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.นพ. บุญเสริม วิทย์ชานาญกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย อีกทั้งช่วยในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ดร.พรพิมล เชื้อดวงสุข กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะนำข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณ ดร.ระพีพรรณ วานิชวิริยกิจ ให้คำปรึกษาและสอนเทคนิคในการทำ protein profile และ western blotting analysis ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในงานวิจัยของวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วง

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ สุภมาตย์ ให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำเนื้อเยื่อวิทยาในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ CENTEX SHRIMP มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ได้อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย รวมทั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้งที่อนุเคราะห์กุ้งทดลองในการวิจัยและให้โอกาสในการทำวิจัย และขอบคุณครอบครัวเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจให้มาโดยตลอด

จุฑาทิพย์ พร้อมมูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
สารบัญตาราง	(10)
สารบัญรูป	(11)
บทที่ 1 บทนำ	
1.1. บทนำตั้งเรื่อง	1
1.2. บทตรวจเอกสาร	2
1.2.1. ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้	2
1.2.2. การสร้างและการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งกูดาคำเพศผู้	4
1.2.3. กระบวนการเกิด acrosome reaction	5
1.2.4. ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของอสุจิ	10
1.2.5. การลอกคราบ	16
1.2.6. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการลอกคราบของสัตว์กลุ่ม crustacean	17
1.2.7. ความสัมพันธ์เกี่ยวกับวงจรการลอกคราบต่อการสร้างเซลล์อสุจิ	20
1.3. วัตถุประสงค์	21
บทที่ 2 วิธีการวิจัย	
2.1. การเตรียมพ่อพันธุ์กิ้งกูดทดลอง	22
2.2. ความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบต่อการสร้าง spermatophore	22
2.3. การหาค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของ spermatophore และ testis	22
2.4. การศึกษา total sperm count อัตราร้อยละของ abnormal sperm และ acrosome reaction	24
2.5. การศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา	24
2.6. การศึกษาด้วย TEM	25
2.7. การศึกษา protein profile ใน testis, vas deferens และ spermatophore	25
	(8)

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8. การทำ western blotting analysis	26
บทที่ 3 ผลการทดลอง	
3.1. ความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบต่อการสร้าง spermatophore	27
3.2. ค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของ spermatophore และ testis	27
3.3. ปริมาณและคุณภาพของอสุจิมี่ชีวิตจาก spermatophore	29
3.4. สัณฐานวิทยาของเซลล์ต่างๆ ใน testis, vas deferens และ spermatophore	32
3.5. Protein profile ของเซลล์อสุจิจาก testis, vas deferens และ spermatophore	44
บทที่ 4 วิจัยณ์ผลการทดลอง	47
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	51
เอกสารอ้างอิง	52
ภาคผนวก	60
ประวัติผู้เขียน	67

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของน้ำกับการสร้างอสุจิในกุ้งขาว <i>Penaeus vannamei</i> ที่อยู่ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน	10
2. คุณภาพ ปริมาณ และประสิทธิภาพของอสุจิของกุ้งกุลาดำ (<i>P. monodon</i>) ที่มีน้ำหนักตัวต่างกัน	12
3. คุณภาพ ปริมาณ และประสิทธิภาพของอสุจิของกุ้งขาว (<i>L. vannamei</i>) ที่มีอายุต่างกัน	13
4. น้ำหนักตัวกุ้งในแต่ละระยะของการลอกคราบ (N = 10)	28

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>)	3
2. ส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์อสุจิ ในกุ้งทะเล <i>Sigyonia ingentis</i>	6
3. การเกิด acrosome reaction ในอสุจิของกุ้ง <i>Sigyonia ingentis</i>	8
4. ภาพจาก electron microscope แสดงขั้นตอนการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิของกุ้งกุลาดำ (<i>Penaeus monodon</i>)	9
5. ระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบในกุ้งกุลาดำ	18
6. ระดับ molting hormone (MH), molt-inhibiting hormone (MIH), gonad-inhibiting hormone (GIH) และ gonad-stimulating hormone (GSH) ในเลือดปูตามระยะของวงจรการลอกคราบ	19
7. การชำแหละถุงและแยก testis, vas deferens และ spermatophore เพื่อชั่งน้ำหนักและหาค่า gonado-somatic index (GSI) และ spermatophore-somatic index (SSI)	23
8. ลักษณะของ spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อกุ้งในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ	28
9. ค่า gonado-somatic index (A) และ spermatophore-somatic index (B) ของกุ้งกุลาดำเพศผู้ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ superscripts ที่ต่างกัน หมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)	30
10. ค่า total sperm count (A) และอัตราร้อยละของ abnormal sperm (B) ของกุ้งกุลาดำเพศผู้ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ	31
11. ค่าอัตราร้อยละของเซลล์อสุจิที่เกิด acrosome reaction ในกุ้งกุลาดำเพศผู้ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ superscripts ที่ต่างกัน หมายถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)	32
12. ภาพ light microscope และ ultrastructure ของ testis ของพ่อกุ้ง	35
13. ภาพ light microscope ของส่วนบนของ vas deferens ของพ่อกุ้ง	36
14. ภาพ light microscope ของส่วนปลายของ vas deferens ของพ่อกุ้ง	36

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
15. ภาพ light microscope ของ cross sections ของ spermatophore ใน terminal ampoule ของพ่อกิ่งในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ	38
16. ภาพ light microscope ของ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ D1-D2 และระยะ D3-D4 ของวงจรการลอกคราบ	39
17. ภาพ light microscope ของ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ E ของวงจรการลอกคราบ	39
18. ภาพ ultrastructure ของ nucleus ของ epithelial cell ของ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ E ของวงจรการลอกคราบ	40
19. ภาพ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ A-B ของวงจรการลอกคราบ	40
20. ภาพ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ C-D0 ของวงจรการลอกคราบ โดยมี	41
21. ภาพ spermatophore ของพ่อกิ่งในระยะ D1-D2 (a) และของระยะ D3-D4 (b) ของวงจรการลอกคราบ	42
22. ภาพ ultrastructure ของเซลล์สุจิของพ่อกิ่งในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ	43
23. Protein profile ของเซลล์สุจิใน testis ในแต่ละระยะของการลอกคราบ	44
24. Protein profile ของเซลล์สุจิใน vas deferens ในแต่ละระยะของการลอกคราบ	45
25. Protein profile ของเซลล์สุจิใน spermatophore ในแต่ละระยะของการลอกคราบ	45
26. Protein profile ของเซลล์สุจิใน vas deferens (Vsp) และ spermatophore (Ssp) ในแต่ละระยะของการลอกคราบ	46
27. Protein profile (A) และ Western blot analysis ด้วยการจับด้วย actin-antibody (B) ของเซลล์สุจิใน vas deferens และ spermatophore ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1. บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันมีการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อดินลดน้อยลงมาก เนื่องจากพบปัญหาในการเลี้ยง ไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อไวรัส กุ้งไม่โต อัตรารอดน้อย และการจัดการการเลี้ยงทำได้ยาก ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำลดจำนวนลงเรื่อยๆ จนในปัจจุบัน (พ.ศ. 2553) เหลือเพียง 5 % ของประเทศ ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำจึงมีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้ลูกกุ้งที่มีสายพันธุ์ที่พึงประสงค์ มีอัตราการเจริญเติบโตดี อัตรารอดสูง และสามารถต้านทานเชื้อโรคได้ แต่ในการปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำพบปัญหาในเรื่องของพ่อแม่พันธุ์กุ้ง เนื่องจากต้องเลี้ยงกุ้งจนเป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดินทำให้ความสมบูรณ์เพศทั้งเพศผู้และเพศเมียมีน้อยกว่าในธรรมชาติ และต้องใช้ระยะเวลาเลี้ยงอย่างน้อย 1 ปี จึงจะนำมาผลิตลูกกุ้ง และในพ่อแม่พันธุ์กุ้ง มีการพบว่าให้อัตราการผสมติดน้อยกว่าในธรรมชาติ การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์กุ้งในขณะนี้สิ่งที่จำเป็นต้องมีการศึกษาพบว่าปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ อายุที่เหมาะสมที่จะเป็นพ่อแม่พันธุ์ สารอาหารและฮอร์โมนที่จำเป็นต่อการเจริญพันธุ์ (Harrison, 1990) สิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ น้ำ ปริมาณของแสงที่ได้รับต่อวัน (Benzie, 1998) ความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยง ความแข็งแรงของพ่อแม่พันธุ์ และปัจจัยอื่นๆที่ยังไม่ทราบ จากรายงานในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) พบว่าหลังจากพ่อแม่กุ้งลอกคราบใหม่ๆ จะพบว่า spermatophore มีสีขาวขุ่นและลักษณะนูน ซึ่งเป็นลักษณะของ spermatophore ที่สมบูรณ์ และจะเริ่มมองเห็น spermatophore ค่อย ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้นหลังจากลอกคราบไปแล้วระยะเวลาหนึ่ง และก่อนถึงการลอกคราบอีกครั้ง หากไม่มีการผสมพันธุ์ spermatophore จะค่อย ๆ หายไป ซึ่งยังไม่ทราบว่าหายไปนั้นเกิดจากสาเหตุใด (Parnes *et al.*, 2006)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาเกี่ยวกับ พัฒนาการของเซลล์อสุจิโดยสัมพันธ์กับวงจรการลอกคราบในพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดิน เพื่อเป็นประโยชน์ในการเลือกระยะเวลาที่เหมาะสมในการนำอสุจิมาใช้ในการผสมกับแม่กุ้ง และเพื่อการกระตุ้น spermatogenesis ด้วยฮอร์โมนหรือสารอาหารที่จำเป็นต่อไป

1.2. บทตรวจเอกสาร

1.2.1. ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

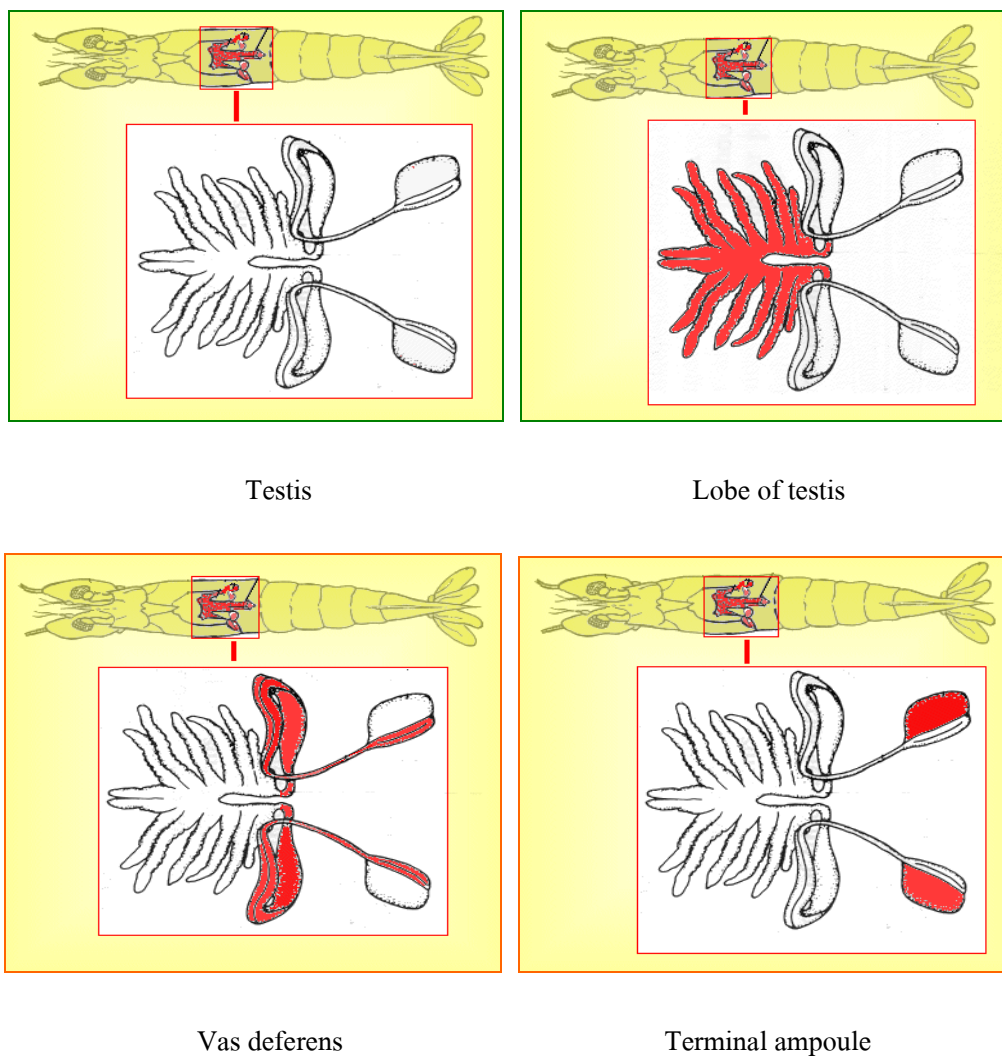
อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของกิ้ง มีลักษณะสมมาตรทั้งสองข้าง (bilateral symmetry) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. อัณฑะ (testis)
2. ท่อนำอสุจิ (vas deferens)

Testis อยู่ทางด้านบนของลำตัวกิ้งในระดับ ออก ได้หัวใจ แผ่คลุมเนื้อส่วนตับ (hepatopancreas) ประกอบด้วย testicular lobes จำนวน 8 คู่ โดยคู่แรกยื่นชี้ตรงไปทางด้านหัวของกิ้ง คู่ที่ 2-8 ชี้ไปทางด้านข้างของลำตัว testicular lobes มีลักษณะคล้ายนิ้วมือ ภายในประกอบด้วยหลอดสร้างอสุจิ (semiferous tubules) สีขาวขุ่น ขดไปมา อัดกันแน่น ทำหน้าที่ในการสร้างอสุจิผนังของ semiferous tubules เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่บางมาก ภายใน semiferous tubules พบเซลล์อสุจิในระยะต่างๆ และเซลล์พี่เลี้ยง (nurse cells) ที่ทำหน้าที่ให้อาหารกับเซลล์อสุจิ (วนิดา และคณะ 2540)

Vas deferens ลักษณะเป็นท่อกลม สีขาวขุ่น ต่อจาก testis ไปทางด้านท้ายของส่วนหัว ประกอบด้วย 4 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง ส่วนปลาย และ terminal ampoule โดยอสุจิที่สร้างจาก testis ถูกส่งเข้ามาใน vas deferens ส่วนต้น แล้วส่งออกไปตาม vas deferens ส่วนกลางและส่วนปลาย ไปเก็บไว้ในส่วนของ terminal ampoule เยื่อบุด้านในของ vas deferens ประกอบด้วยต่อมและชั้นเยื่อผิวที่มีเซลล์ทรงสูงชั้นเดียวด้านบนมีขน (cilia) ผนังท่อประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกล้ามเนื้อ การบีบตัวของกล้ามเนื้อผนังท่อและการโบกพัดของขนบนเซลล์ช่วยในการเคลื่อนตัวของอสุจิ ต่อมาในบริเวณเยื่อผิวจะหลั่งสารที่ช่วยรวบรวมอสุจิและช่วยสร้างถุงเก็บอสุจิ (spermatophore) ห่อหุ้มกลุ่มของอสุจิไว้ เมื่ออสุจิมีการพัฒนาที่สมบูรณ์ terminal ampoule จะสกัด spermatophore และนำไปสอดใส่ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (thelycum) ในขณะผสมพันธุ์

Spermatophore มีลักษณะค่อนข้างกลม สังเกตได้ที่บริเวณ โคนขาเดินคู่ที่ 5 ภายใน spermatophore มีสารหล่อเลี้ยงอสุจิและอสุจิที่มีลักษณะสมบูรณ์แล้วดั่งรูปที่ 1 (นวลจันทร์, 2537) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) (ที่มา Hall *et.al.*, n.d.)

1.2.2. การสร้างและการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ของกิ้งกูด้าเพศผู้

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้และเพศเมีย เกี่ยวข้องโดยตรงกับฮอร์โมนที่ผลิตจากเซลล์ประสาทบริเวณก้านตา คือ X-organ และ sinus gland (De Kleijn *et al.*, 1992) การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือการสร้างเซลล์อสุจิ จะเริ่มมีขึ้นเมื่อกิ้งกูด้ามีอายุ 135 วัน (บุญรัตน์ และ เฉลิมชัย, 2540) โดยสร้างจาก seminiferous tubule ที่อยู่ภายในอัมทะ ภายใน seminiferous tubule มีเซลล์พีเลียและเซลล์อสุจิที่อยู่ในช่วงพัฒนาการแต่ละระยะ ดังนี้ (วนิดา และคณะ 2540)

Nurse cell เป็นเซลล์พีเลียที่มีขนาดใหญ่กว่าตัวบนผนัง seminiferous tubule เรียงตัวชั้นเดียว นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน พบ heterochromatin จับตัวเป็นกลุ่มบริเวณกลางนิวเคลียส แต่ละ nurse cell มีเซลล์อสุจิทุกระยะ ยกเว้น spermatogonia ฝังอยู่ใน cytoplasm ของ nurse cell ซึ่งมีหน้าที่ให้อาหารแก่เซลล์อสุจิ

Spermatogonia เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของอสุจิ รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 11.25 ± 0.52 ไมครอน พบอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเกาะที่ขอบด้านฐานตลอดความยาวของ seminiferous tubule นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ รูปร่างกลม อยู่กลางเซลล์ โครมาตินมีลักษณะเป็น dark clump กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส เมื่อเข้าสู่ระยะการแบ่งตัวแบบ meiosis ครั้งที่ 1 เรียกว่า primary spermatocyte

Primary spermatocyte เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 9.74 ± 0.65 ไมครอน เห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียสชัดเจน เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ prophase I เริ่มเห็นเส้นใยละเอียดของโครโมโซม และหนาตัวขึ้นมากที่สุดในระยะ diakinesis พบ inclusion body ขนาดใหญ่ 1 อันที่ขั้วหนึ่งของเซลล์ ซึ่งสามารถย้อมติดสี eosin ได้ โครงสร้างนี้จะหายไปในระยะ metaphase I เมื่อสิ้นสุดการแบ่งตัวระยะ meiosis I จะให้เซลล์ลูก 2 เซลล์เรียกว่า secondary spermatocyte

Secondary spermatocyte เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า primary spermatocyte รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6.91 ± 0.51 ไมครอน เข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบ meiosis ครั้งที่ 2 ได้เป็น spermatid 4 เซลล์

Spermatid เป็นเซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างกลม นิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.45 ± 0.46 ไมครอน โครมาตินมีลักษณะเป็น dark clump กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส ต่อมาเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น spermatozoa

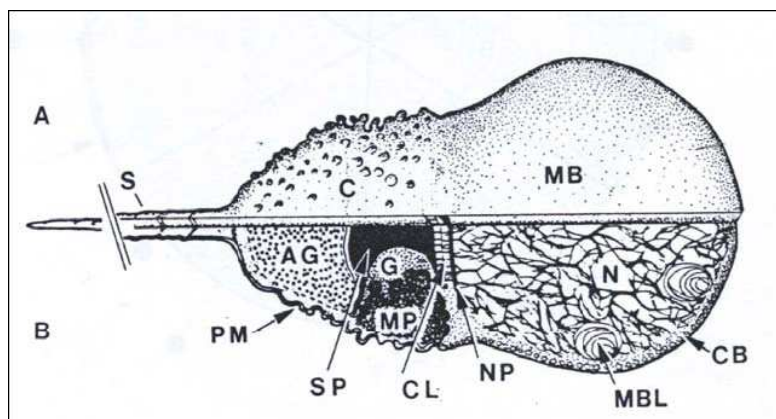
Spermatozoa เปลี่ยนแปลงมาจาก spermatid โดยเริ่มต้นจากการมีช่องว่างขนาดเล็กมากใน cytoplasm รวมตัวกันกลายเป็นช่องว่างขนาดใหญ่อยู่ที่ขั้วเซลล์ด้านหนึ่ง คั่นนิวเคลียสไปอยู่ชิดขอบเซลล์ ต่อมาพบโครงสร้างรูปร่างกลมเรียกว่า acrosomal granule มีขนาด 1

ไมครอน ย้อมติดสี periodic acid-Schiff (PAS) ในช่วงนี้นิวเคลียสมีขนาดเล็กลงจากเดิม 1/5 เท่า ต่อมานิวเคลียสขยายตัวใหญ่ขึ้น มีการกระจายตัวของเส้นใยโครมาติน ทำให้ความเข้มข้นของนิวเคลียสจางลง (decondensation) ช่องว่างภายในเซลล์ลดขนาดลงครึ่งหนึ่ง รูปทรงช่องว่างเปลี่ยนจากกลมเป็นรูปร่างคล้ายถ้วยรองรับนิวเคลียส acrosomal granule เปลี่ยนจากทรงกลมเป็นรูปกรวย เบียดเข้ามาในช่องว่าง ต่อมาเกิดการเจริญของโครงสร้างคล้ายหนามแหลมเรียกว่า spike ยื่นออกจาก acrosomal granule ทางด้านตรงข้ามกับนิวเคลียส ช่องว่างภายในเซลล์มีขนาดลดลงมากมีรูปร่างแบนคล้ายหามรองรับนิวเคลียส และบรรจุ acrosomal granule (วนิดา และคณะ 2540 และ นวลจันทร์ 2537) spike ของอสุจิในสัตว์กลุ่ม decapod มีลักษณะแตกต่างกับหางของอสุจิในสัตว์ชนิดอื่นทั้งด้านโครงสร้างและหน้าที่ คือโครงสร้างของ spike ไม่เป็น flagellum จึงไม่ได้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของอสุจิ อสุจิของสัตว์ในกลุ่ม decapod ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Langreth, 1969; Lynn & Clark, 1987; Clark, 1973) จากลักษณะดังกล่าวทำให้อสุจิของกุ้งกุลาดำ และสัตว์ในกลุ่ม decapod ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วน main body บรรจุนิวเคลียส ส่วน cap บรรจุ acrosomal granule และส่วน spike เป็นโครงสร้างคล้ายหนามแหลมยื่นออกจาก cap ดังรูปที่ 2 (Medina *et al.*, 1994)

1.2.3. กระบวนการเกิด acrosome reaction

ในขณะเกิดการปฏิสนธิ อสุจิจะถูกกระตุ้นด้วยเซลล์ไข่ หรือส่วนประกอบของเซลล์ไข่ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้านลักษณะรูปร่างและชีวเคมี เพื่อให้มีความสามารถในการเจาะผนังไข่เพื่อนำนิวเคลียสของเซลล์อสุจิเข้าสู่ cytoplasm ของเซลล์ไข่ เพื่อไปรวมกับนิวเคลียสของเซลล์ไข่ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์อสุจินี้ เรียกว่า acrosome reaction (Clark *et al.*, 1981)

ในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอยเม่น (sea urchin) (Colwin and Colwin., 1963) กุ้งกุลาดำ (วนิดา และคณะ 1997; Pongtippatee *et al.*, 2007) กุ้ง *P. aztecus* (Lu, 1976) และ *S. ingentis* (Kleve *et al.*, 1980) พบว่า acrosome reaction ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ acrosomal exocytosis และ acrosomal filament formation โดยระยะแรกเป็น exocytosis ของ acrosomal granule เพื่อปล่อย enzyme ที่บรรจุอยู่ในเซลล์อสุจิออกมาย่อยชั้นที่หุ้มเซลล์ไข่ และระยะที่สองเป็นระยะที่โครงสร้างภายใน acrosomal granule ถูกปล่อยยึดออกมาเพื่อจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ก่อนที่เยื่อหุ้มเซลล์ของทั้งเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิจะเชื่อมติดกัน แล้วปล่อยนิวเคลียสเข้ามารวมกัน

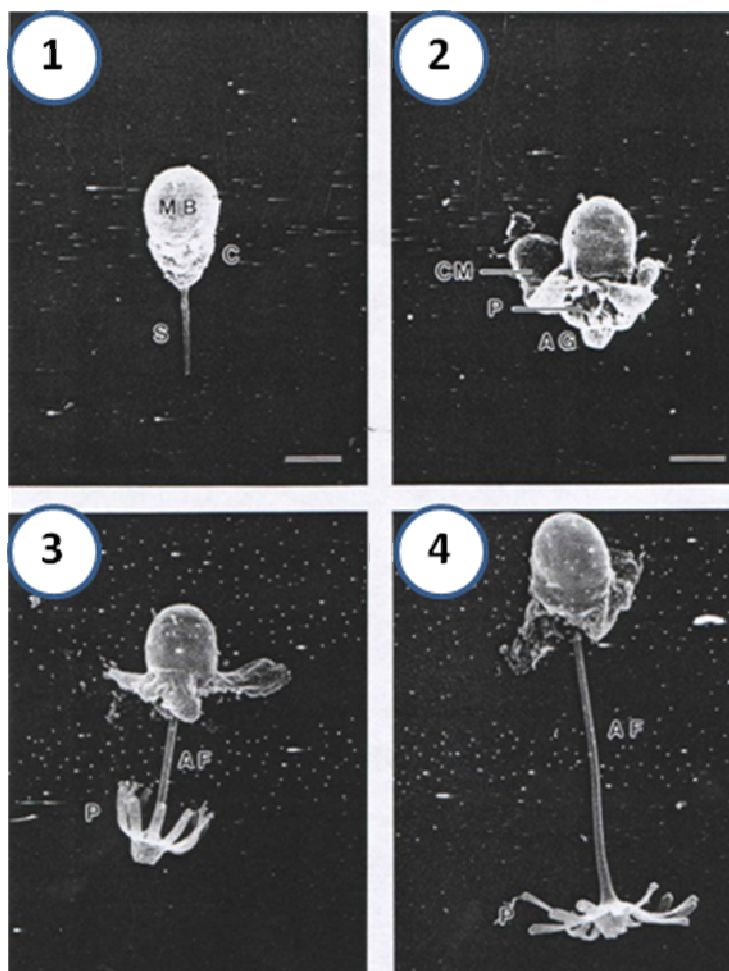


รูปที่ 2 แสดงส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์อสุจิ ในกิ้งทะเล *Sigyonia ingentis* A. ลักษณะภายนอกของเซลล์อสุจิ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ main body (MB), cap (C) และ spike (S) B. ลักษณะภายในของส่วนต่างๆ main body ประกอบด้วย nucleus (N), membranous lamellar bodies (MBL), cytoplasmic band (CB) และ nuclear plate (NP) ส่วน cap ประกอบด้วย membrane pouches (MP) และ anterior granule (AG) (ที่มา Clark *et al.*, 1984)

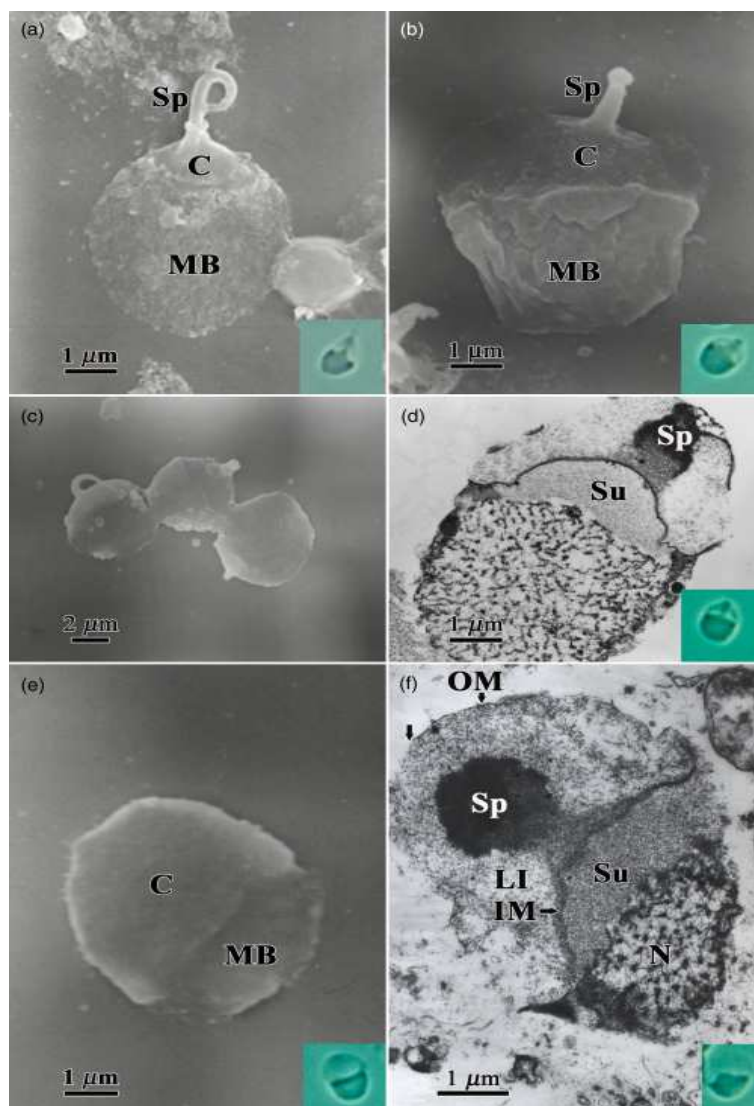
การทดลองการเกิด acrosome reaction ในกิ้ง *S. ingentis* (Clark *et al.*, 1980; 1981) พบว่า การเกิด acrosomal exocytosis เริ่มจากส่วนปลายของ spike สัมผัสกับชั้นนอกสุดของเซลล์ไข่ (จากการทดลองแบบ *in vivo*) หรือองค์ประกอบของไข่ที่อยู่ในน้ำไข่ ที่เรียกว่า egg water (จากการทดลองแบบ *in vitro*) เกิด depolymerization ของ microfilament ใน spike ทำให้ spike อ่อนตัวและหลุดร่วงลง ต่อมาเกิดการรวมและแตกออกของ acrosomal granule เพื่อปล่อยเอนไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในออกมา โดยมี Ca^{++} เป็นตัวชักนำซึ่งเป็นลักษณะเดียวกันกับการเกิด exocytosis ในเซลล์ทั่วไป ต่อมา exocytosed sperm จะย่อยผ่านชั้นวุ้น (egg jelly) ของไข่เข้าไป และเข้าสู่ระยะ acrosomal filament formation โดยมีการยึดโครงสร้างที่เรียกว่า acrosomal filament ยาวประมาณ 10 ไมครอน มาแตะกับเชื้อหุ้มเซลล์ไข่ (รูปที่ 3) ในกิ้งกุลาดำ การเกิด acrosome reaction คล้ายกับในกิ้ง *S. ingentis* แต่ในระยะ acrosomal filament formation เป็นเพียงการยึดตัวของโครงสร้างที่อยู่ใต้ acrosomal granule (subacrosomal region) ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนกลมเท่านั้น จึงเรียกระยะนี้ว่า spherical mass formation การเกิด acrosome reaction ทั้งสองระยะในกิ้งกุลาดำใช้เวลาประมาณ 1-2 นาที (Pongtippatee *et al.*, 2007) (รูปที่ 4) นอกจากนี้ในอสุจิของกิ้ง *Trachypenaeus byrdis*, *Xiphopenaenus riveti* และ *Litopenaenus occidentalis* ก็มีการเกิด acrosome reaction เช่นกัน (Alfaro *et al.*, 2003)

วัฒนา และคณะ (2549) ศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการเกิด acrosome reaction และการเกิดปฏิสนธิในกึ่งกลาดำ พบว่าการปฏิสนธิของกึ่งกลาดำที่มีประสิทธิภาพ ต้องเกิดจากการที่เชื้ออสุจิอยู่ใน thelycum ของเพศเมียอย่างน้อย 3 วัน ภายใน thelycum มีขบวนการพัฒนาความสามารถในการเกิด acrosome reaction เรียกว่า การเกิด capacitation ซึ่งหมายถึงการปรับเปลี่ยนผิวเซลล์อสุจิ และการเพิ่มระดับของ tyrosine phosphorylation เพื่อให้เกิดความพร้อมในการเกิด acrosome reaction ในขณะที่ปฏิสนธิ ทำให้ได้อัตราการผสมติดและผลผลิตนอเพลียสที่มีเปอร์เซ็นต์สูง นอกจากนี้การนำอสุจิจาก thelycum ของแม่กึ่งมาปฏิสนธิกับไข่ให้เปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction ได้มากกว่าการใช้อสุจิจาก spermatophore ของพ่อกึ่งโดยตรง (Pongtippatee-Taweepreda *et al.*, 2003) เช่นเดียวกับการทดลองในกึ่ง *S. ingentis* และ *P. aztecus* ซึ่งพบว่า เปอร์เซ็นต์การเกิด acrosome reaction และการผสมติดที่ได้จากอสุจิที่เก็บไว้ใน thelycum ของแม่กึ่งสูงกว่าที่ได้จากอสุจิของพ่อกึ่งโดยตรง (Clark *et al.*, 1973; Griffin and Clark., 1990)

จากการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่แสดงถึงพัฒนาการของอสุจิของกึ่งกลาดำ พบว่า บริเวณ subacrosome มีโปรตีน actin เป็นองค์ประกอบ และพบว่าในอสุจิที่เกิด acrosome reaction มีโปรตีน actin เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ spherical mass (Vanichviriyakit *et al.*, 2007)



รูปที่ 3 แสดงการเกิด acrosome reaction ในอสุจิของกุ้ง *Sigyonia ingentis* 1. เซลล์อสุจิปกติ ประกอบด้วย main body (MB), cap (C) และ spike (S) 2. การเกิด acrosome reaction ในระยะ acrosomal exocytosis. AG, anterior granule 3. และ 4. การเกิด acrosome reaction ในระยะ acrosome filament formation. AF, acrosomal filament (ที่มา Griffin *et al.*, 1988)



รูปที่ 4. ภาพจาก electron microscope แสดงขั้นตอนการเกิด acrosome reaction ของเซลล์อสุจิของ กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) หลังจากนำมา incubate ด้วย egg water ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน (ภาพเล็กด้านในแสดงอสุจิภายใต้ light microscope) a. แสดงอสุจิที่ส่วนของ spike อ่อนตัวใน ระยะแรกของการเกิด acrosome reaction b-d. แสดงอสุจิที่ส่วนของ spike หดสั้นลงในระยะต่อมา ของการเกิด acrosome reaction e, f. แสดงอสุจิที่ส่วน cap บวมขึ้น ในระยะต่อมาของการเกิด acrosome reaction C, cap; IM, inner limiting membrane; LI, low density inner layer; MB, main body; N, nucleus; OM, outer limiting membrane; Sp, spike; Su, subacrosomal region (ที่มา Pongtippatee *et al.*, 2007)

1.2.4. ปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาคุณภาพของอสุจิ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศผู้นั้น ยังมีอยู่น้อยมาก และมักกระจัดกระจาย ในบางครั้งผลที่ได้ก็ขัดแย้งกัน อันอาจเนื่องมาจากการใช้กุ้งที่มีอายุต่างกัน อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกัน (เช่นความเค็มของน้ำ อุณหภูมิ ระดับออกซิเจนในน้ำ ฯลฯ) และเป็นเพราะสายพันธุ์ของกุ้งที่ต่างกัน ในการศึกษาเรื่องนี้การใช้กุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงเอง (domesticated *Penaeus monodon*) จะให้ข้อมูลที่เป็นวิทยาศาสตร์ได้ดีกว่าการใช้กุ้งกุลาดำธรรมชาติ เพราะ (1) สามารถทราบอายุกุ้งอย่างแน่นอน (2) สามารถเลือกสายพันธุ์กุ้งที่เหมือนกัน เพื่อหลีกเลี่ยงผลเบี่ยงเบนที่เกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic variation) และ (3) สามารถจัดการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ต้องการ เช่นที่อุณหภูมิและความเค็มที่เหมาะสมได้

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศผู้และต่อการสร้างอสุจิ อาจแบ่งออกได้เป็นสองปัจจัยใหญ่ๆ ได้แก่ปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายใน ปัจจัยภายนอกหมายถึงสิ่งที่ยอยู่นอกตัวกุ้ง เช่นคุณภาพน้ำและอาหาร ปัจจัยภายในได้แก่สิ่งที่มีกับตัวกุ้ง เช่นอายุ น้ำหนักตัว และฮอร์โมนเพศ

คุณภาพน้ำ ในด้านคุณภาพน้ำนั้น ข้อมูลทางวิชาการที่ค้นพบได้คือเรื่องอุณหภูมิ ความเค็ม คุณภาพน้ำ และอาหาร ในด้านอุณหภูมินั้น Bray and Lawrence (1992) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งในกลุ่ม penaeid ส่วนใหญ่ ซึ่งรวมทั้งกุ้งกุลาดำ *P. monodon* จะอยู่ในช่วงระหว่าง 27-29 °C ในกุ้งขาว *P. vannamei* นั้น ซึ่งเป็นกุ้ง penaeid เหมือนกัน มีอุณหภูมิที่เหมาะสม อยู่ที่ 26 °C (Perez-Velazquez *et al*, 2001) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิของน้ำกับการสร้างอสุจิในกุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่อยู่ในอุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน (Perez-Velazquez *et al.*, 2001)

อุณหภูมิ (°C)	จำนวนอสุจิต่อ spermatophore (ล้าน)	อสุจิรูปร่างผิดปกติ (%)
26	18.6	36.7
29	0.1	99.7
32	0	-

เช่นเดียวกัน ในกุ้งทะเล *Penaeus setiferus* การเลี้ยงที่อุณหภูมิ 24-27 °C ทำให้ความเสื่อมประสิทธิภาพของอสุจิช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 °C (Pascual *et al*, 1998) โดยพบว่าวันแรกของการทดลอง กุ้งมีอสุจิ 2.06 ล้านตัวต่อ 1 spermatophore โดยมีจำนวนอสุจิที่ผิดปกติอยู่ระหว่าง 10-25% และในวันที่ 3 จนถึงวันที่ 10 ของการทดลองพบจำนวนอสุจิที่ผิดปกติเพิ่มขึ้นเป็น 60-90%

ในด้านความเค็มของน้ำนั้น ยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับการสร้างอสุจิในกุ้งอย่างเป็นระบบ การศึกษาที่ผ่านมาค่อนข้างน้อยและสรุปไม่ได้ชัดเจน จากประสบการณ์ในโรงเพาะฟัก สามารถกล่าวได้แน่นอนว่า ทั้งกุ้งขาว *P. vannamei* และกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ต้องการความเค็มในระดับน้ำทะเลปกติ (30 ppt หรือมากกว่า) ในการสร้างอสุจิที่มีประสิทธิภาพ แม้จะพบว่าในกุ้งขาว *P. vannamei* นั้น ความเค็มที่ 2-3 ppt ก็สามารมืออสุจิปริมาณปกติได้แต่ประสิทธิภาพในการปฏิสนธินั้น ยังไม่มีการยืนยันแน่ชัดว่าใช้ได้ (Parnes *et al*, 2004) ในกุ้งกุลาดำนั้น มีหลักฐานว่าความเค็มที่สูงถึง 52 ppt. ไม่ก่อผลเสียต่อปริมาณและประสิทธิภาพของอสุจิ (Bray and Lawrence, 1998) แต่ที่ความเค็มต่ำกว่า 30 ppt จะมีผลหรือไม่นั้น ไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

การติดเชื้อแบคทีเรียที่เรื้อรังอาจมีผลต่อการสร้างอสุจิได้ มีรายงานว่ากุ้งถูกนำมาพักขังในบ่อ concrete หรือถึง fiberglass มี spermatophore ที่เปลี่ยนจากสีขาวขุ่นนึ่ม เป็นสีน้ำตาลและแข็งขึ้น (Talbot *et al*, 1989) และพบการติดเชื้อแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม *Pseudomonad sp.* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำทะเล ที่ spermatophore และที่บริเวณ ampules ของ vas deferens เป็นไปได้ว่าสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นปริมาณแอมโมเนียที่มากขึ้นในบ่อเลี้ยง อาจก่อความเครียดให้แก่กุ้งและมีการติดเชื้อตามมา ในการทดลองในกุ้ง *P. setiferus* ที่นำมาเลี้ยงในถัง fiberglass เป็นเวลา 7 สัปดาห์ Leung-Trujillo และ Lawrence (1987) พบว่า spermatophore มีน้ำหนักลดลง และปริมาณอสุจิต่อ 1 spermatophore มีจำนวนลดลง พร้อมทั้งการเพิ่มปริมาณของอสุจิที่ผิดปกติ

อาหาร การทดลองที่น้อยมากเกี่ยวกับผลของอาหารที่มีต่อการสร้างและประสิทธิภาพของอสุจิ ในกุ้ง Perez-Velazquez และคณะ (2002) ทำการทดลองในกุ้งขาว *P. vannamei* พบว่าอาหารที่มีโปรตีนสูง (45%) เมื่อนำมาให้พร้อมกับปลาหมึกสด จะทำให้น้ำหนักของ spermatophore และจำนวนอสุจิมียมากกว่ากลุ่มที่ได้รับปลาหมึกสดเพียงอย่างเดียว Meunpol และคณะ (2005) ได้ศึกษาในกุ้งกุลาดำเพศผู้โดยให้อาหารทดลองที่มีปริมาณของ arachidonic acid (AA) สูงกว่า eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) ในอัตราส่วน 5:1:1 ตามลำดับ มีโปรตีนรวม 48.62% และไขมันรวม 15.1% และวัดน้ำหนักของ spermatophore จำนวนอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต โดยเปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับอาหารสด ซึ่งประกอบด้วย แม่

เพรียง ปลาหมึก และหอย ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ซึ่งหมายความว่าอาหารสำเร็จรูปที่มี AA สูง อาจจะเป็นอาหารที่ดีในการกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศผู้

อายุและน้ำหนักตัว น้ำหนักตัวเป็นปัจจัยภายในที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศผู้ Pratoomchat และคณะ (1993) ได้รายงานไว้ในกุ้งตัวผู้ที่มีอายุเท่ากัน น้ำหนักตัวจะมีผลต่อขนาดของ spermatophore ต่อจำนวนและคุณภาพของอสุจิ และต่ออัตราการปฏิสนธิ และการฟักตัว โดยกุ้งที่มีน้ำหนักตัวมากกว่าจะมีค่าดังกล่าวมากกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักตัวน้อยกว่า (ตารางที่ 2)

น่าแปลกใจว่าอสุจิที่มีรูปร่างปกตินั้นมีเพียงประมาณ 20% ซึ่งน้อยกว่าที่ น่าจะเป็น อาจเป็นเพราะว่าเป็นกุ้งที่เพาะเลี้ยงจากบ่อเลี้ยง (domesticated shrimp) และน่าจะเป็นรุ่นที่เกิดจากพ่อแม่กุ้งที่จับจากทะเล (F0 generation) ในรายงานนั้น ไม่ได้บอกอายุกุ้งและสิ่งแวดล้อม (เช่น ความเค็มและอุณหภูมิ) ทำให้ไม่ทราบว่าเป็นปัจจัยเหล่านั้นมีผลเพียงใดต่อการสร้างอสุจิ

ตารางที่ 2 คุณภาพ ปริมาณ และประสิทธิภาพของอสุจิของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) ที่มีน้ำหนักตัวต่างกัน (Pratoomchat *et al.*, 1993)

น้ำหนักตัว (กรัม)	น้ำหนัก spermatophore (มิลลิกรัม)	จำนวนอสุจิต่อ spermatophore (ล้าน)	อสุจिरูปร่าง ปกติ (%)	อัตราการ ปฏิสนธิ (%)	อัตราการ ฟักตัว (%)
41-50	22.7	0.8	17.1	35.3	14.5
61-90	56.6	2.5	21	67.6	60.1

ผลของการศึกษาในกุ้งขาว *P. vannamei* ในลักษณะเดียวกันนี้ แต่เน้นที่อายุกุ้ง (Ceballos-Vazquez *et al.*, 2003) พบว่ากุ้งเพศผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 6 ถึง 12 เดือน มีน้ำหนักของ spermatophore จำนวนอสุจิต่อ spermatophore และจำนวนอสุจิที่มีชีวิต เพิ่มขึ้นตามอายุกุ้ง และผู้วิจัยให้ความเห็นว่าอายุของกุ้งมีความสำคัญมากกว่าน้ำหนักกุ้ง ในแง่ของการสร้างอสุจิ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 คุณภาพ ปริมาณ และประสิทธิภาพของอสุจิของกุ้งขาว (*P. vannamei*) ที่มีอายุต่างกัน (Ceballos-Vazquez *et al.*, 2003)

อายุ (เดือน)	น้ำหนักร spermatoaphore (มิลลิกรัม)	จำนวนอสุจิต่อ spermatoaphore (ล้าน)	อสุจิรูปร่างปกติ (%)
6	19.1	1.96	12.8
12	93.3	4.57	68.2

ในงานวิจัยนั้น ได้พบเช่นกันว่า กุ้งตัวผู้ที่มีอายุเท่ากัน ตัวที่มีน้ำหนักมากกว่าก็จะมี น้ำหนักของ spermatoaphore และจำนวนอสุจิต่อ spermatoaphore มากกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักน้อยกว่า แต่ สิ่งที่ไม่ทราบคือประสิทธิภาพในการปฏิสนธินั้นจะต่างกันหรือไม่ ในกุ้งที่มีอายุเท่ากัน แต่น้ำหนัก ตัวต่างกัน

ในปี พ.ศ. 2549 ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง ซึ่งเป็นหน่วยงานภายใต้การดูแล ของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ได้พบว่าพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เพาะเลี้ยงเอง เมื่ออายุ 8 เดือน จะให้อัตราการปฏิสนธิตั้งแต่ 0 ถึง 30% ส่วนพ่อพันธุ์อายุ 12-18 เดือน ให้อัตราการปฏิสนธิ ตั้งแต่ 30 ถึง 80% และมีน้ำหนักของ spermatoaphore และจำนวนอสุจิเพิ่มขึ้น โดยที่น้ำหนักตัว ต่างกันเพียงเล็กน้อย (บุญเสริม, ข้อมูลส่วนตัว) บ่งชี้ว่าน้ำหนักตัวอาจมีความสำคัญน้อยกว่าอายุ กุ้ง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาอย่างเป็นระบบว่าอายุของกุ้งที่เริ่มสร้างอสุจิที่มีประสิทธิภาพนั้น อยู่ที่อายุกี่เดือน และสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมนั้นเป็นอย่างไร

ฮอร์โมน เช่นเดียวกับสัตว์ชนิดอื่นๆ การเจริญและพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของ crustaceans ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนต่างๆ และความรู้เกี่ยวกับฮอร์โมนที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ใน crustaceans ยังมีอยู่น้อยมาก ส่วนหนึ่งที่ทราบคือ ในสมองส่วนก้านตา (optic lobe) มีเซลล์ประสาท ที่ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมน (neurosecretory cells) อยู่กลุ่มหนึ่ง เรียกเซลล์กลุ่มนี้ว่า X-organ เซลล์ กลุ่มนี้ส่งปลายประสาท (axon terminals) ไปที่รวมกันที่จุดหนึ่งที่ติดกับ optic lobe และถูกล้อมรอบ ด้วย haemolymph ปลายประสาทนี้รวมกันเรียกว่า sinus gland และเป็นที่ตั้งของฮอร์โมนชนิด ต่างๆที่สร้างจาก X-organ เนื่องจากทั้ง X-organ และ sinus gland เป็นส่วนของเซลล์กลุ่มเดียวกัน จึง มักจะเรียกส่วนทั้งสองนี้รวมกันว่า X-organ-sinus gland complex (XOSG)

ฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างใน XOSG ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์คือ gonad-inhibiting hormone (GIH) ในกิ้งก่าเพศเมีย ฮอร์โมนชนิดนี้ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่ โดยจะป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างสาร vitellogenin ที่ตับและตับอ่อน (hepatopancreas) และสารนี้เป็น protein ที่จะต้องถูกลำเลียง (transported) ไปเข้าสู่เซลล์ไข่ (oocytes) ในรังไข่ (ovary) ดังนั้น จึงมีผู้เรียกฮอร์โมน GIH นี้ว่าเป็น vitellogenin-inhibiting hormone (VIH) เช่นกัน ฮอร์โมน GIH นี้ในกิ้งก่าได้มีการศึกษาถึงขั้นทราบ amino acid sequence และ mRNA ของฮอร์โมน GIH แล้ว (Treerattrakool *et al.*, 2008)

ในกิ้งก่าเพศผู้จะมี GIH หรือฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของ testis และการสร้างอสุจิ หรือไม่ ยังไม่มีหลักฐานใดทางวิทยาศาสตร์ยืนยันได้ อย่างไรก็ตามก็มีผู้ทดลองตัดตากิ้งก่าเพศผู้ เพื่อที่จะดูว่าการสร้างอสุจินั้นจะดีขึ้นหรือไม่ ผลที่ได้ก็แตกต่างกันไป มีทั้งที่รายงานว่าไม่ได้ผล (Pratoomchat *et al.*, 1993) และที่รายงานว่าได้ผล (Gomes and Honculada-Primavera., 1993) ทั้งๆที่ทดลองในกิ้งก่าเพศผู้เหมือนกัน

Pratoomchat *et al.* (1993) ศึกษาโดยการตัดตากิ้งก่าเพศผู้ โดยใช้กิ้งก่าเพศผู้ที่มีน้ำหนัก 50 กรัม แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลองคือ กลุ่มที่ตัดตาพ่อพันธุ์กิ้ง และกลุ่มที่ไม่ตัดตาพ่อพันธุ์กิ้ง ใช้ระยะเวลาในการทดลอง 60 วัน พบว่าทั้งปริมาณและคุณภาพของอสุจิของทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ในขณะที่เดียวกัน Gomes และ Honculada-Primavera (1993) ได้ตัดตากิ้งที่มีน้ำหนักแรกเริ่ม 68.6 กรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักที่ใกล้เคียงกับการทดลองของ Pratoomchat และคณะ (1993) แต่ก็เป็นพ่อพันธุ์ที่มีขนาดเล็ก (น้อยกว่า 80 กรัม ซึ่งน่าจะเป็นขนาดที่เหมาะสม) ใช้ระยะเวลาในการทดลอง 6 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าอสุจิของกิ้งในกลุ่มที่ตัดตามีปริมาณสูงกว่ากิ้งกลุ่มที่ไม่ตัดตาสองเท่าตัวและกิ้งกลุ่มที่ตัดตามีความผิดปกติของอสุจิน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ตัดตา แต่ไม่มีความแตกต่างระหว่างน้ำหนักของ spermatophore จำนวนอสุจิมิชีวิต และ gonadal index [(น้ำหนักของ testis x 100)/น้ำหนักตัวกิ้ง] ของทั้งสองกลุ่มการทดลอง

นอกจาก GIH แล้ว ในกิ้งยังมีฮอร์โมน gonad-stimulating hormone (GSH) ที่ทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับ GIH ฮอร์โมนชนิดนี้สร้างจากเซลล์ประสาท neurosecretory cells ที่อยู่ในสมองกิ้ง (supra-esophageal ganglion) และที่อยู่ในปมประสาทส่วนช่วงอกของกิ้ง (thoracic ganglia) (Otsu, 1963; Gomez, 1965; เรณู และ พิษณุ, 2540) กลไกการทำงานของ GSH นั้นยังไม่ทราบแน่นอน และยังไม่มีการศึกษาถึง amino acid sequence ของ GSH ด้วย

การศึกษาฮอร์โมน GIH และ GSH นั้น มีเฉพาะใน crustaceans เพศเมียเป็นส่วนใหญ่ ในกิ้งก่าเพศผู้ ยังไม่เคยมีรายงานที่ศึกษาฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้เลย งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของกิ้งก่าเพศผู้ เป็นเรื่องเกี่ยวกับฮอร์โมนที่สร้างมาจาก androgenic

gland ซึ่งเป็นต่อมที่อยู่ทีปลาย ampoules ของ vas deferens และสร้างฮอร์โมนที่เรียกว่า androgenic gland hormone (AH) งานวิจัยที่เกี่ยวกับฮอร์โมนชนิดนี้ ส่วนใหญ่เน้นไปที่การพัฒนาเซลล์ต้นกำเนิดให้เป็นอวัยวะเพศผู้คือเกิด differentiation ของ primary germ cells ให้เป็น testis และ vas deferens และอาจจะเกี่ยวกับการเกิด secondary sexual characteristics ด้วย ยังไม่มีรายงานที่ AH ช่วยในการพัฒนาอสุจิ หรือ spermatophore

ฮอร์โมนอีกชนิดหนึ่งที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของ crustaceans คือ ฮอร์โมน methyl farnesoate (MF) ฮอร์โมนชนิดนี้สร้างจาก mandibular organ (Tamone *et al.*, 1997) มีผู้ค้นพบว่าทำให้ exogenous MF สามารถกระตุ้นให้เกิด ovarian maturation ในเพศเมีย และการพัฒนา testicular follicles ในเพศผู้ของปูน้ำจืด *Oziotelphusa senex senex* Fabricius (Reddy and Ramamurthi, 1998; Kalavathy *et al.*, 1999) ในกุ้ง *Macrobrachium malcolmsonii* (Nagaraju *et al.*, 2004) และสามารถกระตุ้นให้เกิด ovarian maturation ในกุ้ง *Procambarus clarkii* (Laufer *et al.*, 1987a) ได้ ยังไม่มีรายงานถึงกลไกการทำงานของ MF มีการคาดเดาว่าอาจทำงานโดยผ่านการกระตุ้นฮอร์โมน GSH หรือ AH หรือยับยั้งฮอร์โมน GIH หรืออาจออกฤทธิ์โดยตรงต่ออวัยวะสืบพันธุ์นั้น

ในแมลง MF เป็น precursor ของ juvenile hormone III (รูปที่ 5) (Laufer *et al.*, 1987b) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์เช่นกัน (Laufer *et al.*, 1992) แต่ในขณะเดียวกัน ฮอร์โมนชนิดนี้ก็ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีน (Soroka *et al.*, 1993) การเจริญเติบโต (Laufer *et al.*, 1987a) การลอกคราบ (Yudin *et al.*, 1980) และ morphogenesis (Laufer *et al.*, 1997) ด้วย

มีหลักฐานทางวิจัยที่บ่งชี้ว่า MF ใน crustaceans น่าจะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนจาก XOSG จาก optic lobe ของก้านตาเช่นกัน เพราะพบว่า eyestalk ablations ในปู *Libinia emarginata* ในกุ้ง *Homarus americanus* และในกุ้ง *Orconectes virilis* ทำให้ปริมาณฮอร์โมน MF ใน haemolymph เพิ่มขึ้น (Laufer *et al.*, 1987b; Tsukimura and Borst, 1992; Tsukimura *et al.*, 1989) ดังนั้นจึงมีผู้คิดว่าจะมี mandibular organ inhibiting hormone (MOIH) สร้างจาก XOSG ไปยับยั้งการทำงานของ mandibular organ ต่อมา ได้มีการศึกษาและพบว่า MOIH มีโครงสร้างที่คล้ายกับ crustacean hyperglycemic hormone (CHH), GIH และ molt-inhibiting hormone (MIH) (Wainwright *et al.*, 1996; Liu and Laufer, 1996)

1.2.5. การลอกคราบ

การลอกคราบเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อการเจริญเติบโตโดยการสลัดเอาเปลือกเก่าที่ห่อหุ้มตัวออกและสร้างเปลือกใหม่ขึ้นมาแทนที่ และเป็นกระบวนการที่มีการเปลี่ยนแปลงของร่างกายเป็นวงจรต่อเนื่อง Wessenberg และ Hill (1984) ได้ศึกษาพฤติกรรมการลอกคราบของกิ้ง *P. esculentus* พบว่าการลอกคราบจะพบในตอนกลางคืนเวลาประมาณ 04.00 น. กิ้งจะยกส่วนท้องขึ้นและติดตัว ส่วนท้องจะงอ การแตกตัวของเปลือกจะเกิดขึ้นที่รอยต่อระหว่าง carapace และ abdomen antennal scale จะโปกพัดมากขึ้น ตัวจะสันเป็นสาเหตุให้ carapace ถูกยกขึ้นทางด้านท้าย ต่อมากุ้งจะนอนตะแคงข้าง antennal scale และ rostrum จะต่ำลง carapace แยกจากส่วนของ cephalothorax ตา antennal scale และ antennae ถูกแยกออกจากเปลือกเก่าเป็นอันดับแรก ตามด้วยส่วนของปากและขา จากนั้นกิ้งจะติดตัวอย่างแรง ระยะเวลาที่กิ้งใช้ในการลอกคราบสั้นมากเพียง 18.10 วินาที และในคืนที่ลอกคราบกิ้งจะไม่กินอาหาร การแบ่งระยะการลอกคราบสามารถ แบ่งย่อยเป็นระยะต่างๆ 4 ระยะ ได้แก่ ระยะก่อนการลอกคราบ (premolt) ระยะลอกคราบ (molt) ระยะหลังการลอกคราบ (postmolt) และระยะระหว่างวงจรการลอกคราบ (intermolt) โดยมีรายละเอียดในแต่ละระยะของการลอกคราบดังนี้

1. ระยะก่อนการลอกคราบ premolt (D stage) สามารถแบ่งย่อยออกได้เป็น 5 ระยะย่อย
 - D0: เริ่มเห็นขอบของ epidermis tissue และเป็นฐานของ setal cones (รูป b ในรูปที่ 5)
 - D1: พบว่ามี clear zone อยู่ระหว่าง setal cones และ epidermis (รูป c ในรูปที่ 5)
 - D2: clear zone กว้างขึ้น และขอบของ epidermis มีลักษณะเป็นลอน (รูป d ในรูปที่ 5)
 - D3: clear zone กว้างขึ้นจาก D2 ขอบของ epidermis เป็นลอนเพิ่มขึ้น และมีชั้นบางๆ สีขาวเกิดขึ้นที่ขอบของ epidermis (รูป e ในรูปที่ 5)
 - D4: clear zone กว้างขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ขอบของ epidermis มีลักษณะเป็นฟันเลื่อย ชั้นบางๆสีขาวใสที่ขอบของ epidermis (รูป f ในรูปที่ 5)
2. ระยะลอกคราบ molt (E stage) เป็นระยะที่กิ้งสลัดเปลือกเก่าทิ้ง
3. ระยะหลังการลอกคราบ postmolt (A-B stage) แบ่งย่อยได้ 2 ระยะ คือ
 - A: setae นุ่มและเปราะบาง ไม่ปรากฏ setal cones (รูป g ในรูปที่ 5)
 - B: เริ่มเห็น young setal cones (รูป h ในรูปที่ 5)
4. ระยะพักการลอกคราบ intermolt (C stage) พบ setae cones มีการพัฒนาเต็มที่ และแพร่กระจายเต็มชั้น epidermis (รูป a ในรูปที่ 5)

1.2.6. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการลอกคราบของสัตว์กลุ่ม crustacean

ปัจจัยภายนอก ได้แก่

1. จากการศึกษากุ้งกุลาดำอายุ 90 วัน พบว่าวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำมีระยะเวลา 9-12 วัน แบ่งเป็นระยะก่อนการลอกคราบ 6-7 วัน ระยะหลังลอกคราบ 2-3 วัน และระยะพัก 1-2 วัน (Promwikorn *et al.*, 2007) ซึ่งวงจรการลอกคราบของกุ้งกุลาดำมีความแตกต่างจากปูทะเล เนื่องจากปูทะเลในระยะก่อนการลอกคราบใช้เวลาน้อยกว่าในระยะพัก โดยในระยะก่อนการลอกคราบปูทะเลใช้ระยะเวลา 24% ระยะหลังการลอกคราบใช้เวลา 10 % ระยะพักใช้เวลา 66% ของการลอกคราบ (โครงการปู, ม.ป.ป.)

2. แสง ระยะเวลาการลอกคราบจะสั้นลงหากได้รับแสงน้อย

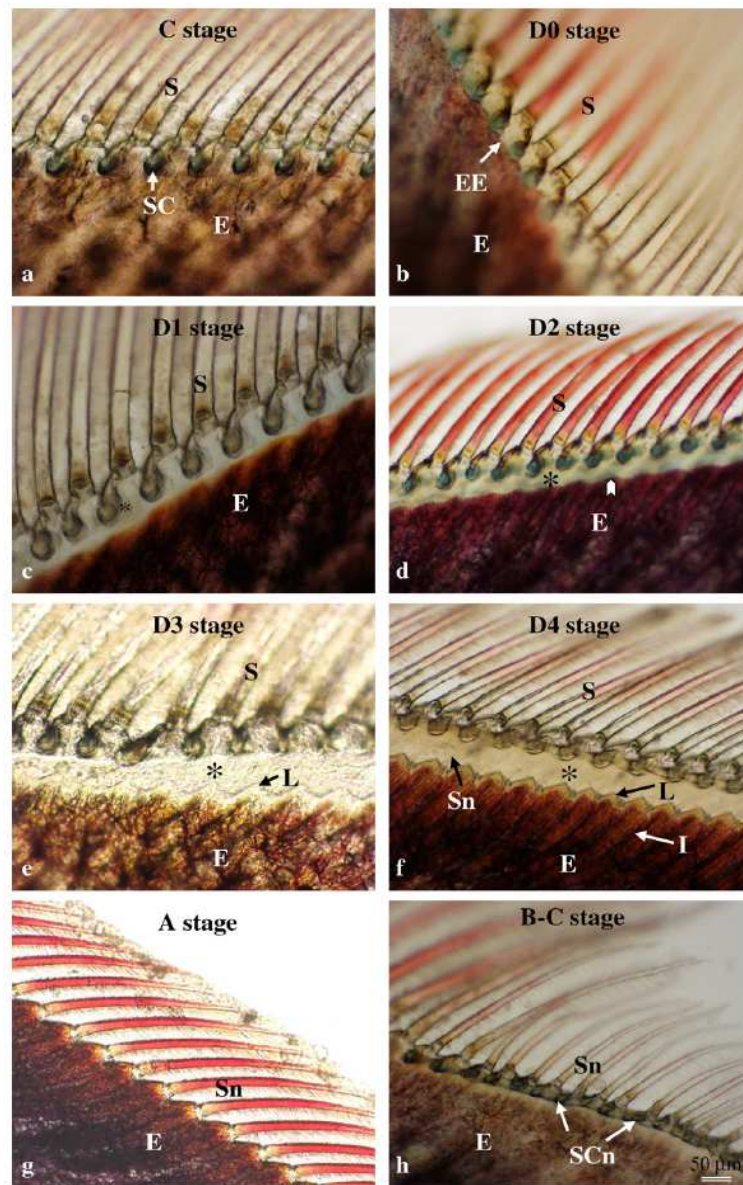
3. อุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิต่อการลอกคราบจะช้าลง ในขณะที่อุณหภูมิสูงการลอกคราบของสัตว์จะดีขึ้น (Passano and Skinner, 1986)

4. ความเค็ม สัตว์ที่อยู่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มสูงจะมีช่วงการลอกคราบยาวกว่าสัตว์ที่อยู่ในน้ำที่ความเค็มต่ำ เช่น ที่ความเค็ม 32 ppt. ปูทะเลจะลอกคราบภายในระยะเวลา 58 วัน ขณะที่ความเค็ม 20 และ 5 ppt. ปูจะใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ 50 และ 44 วัน ตามลำดับ (โครงการปู, ม.ป.ป.)

ปัจจัยภายใน ได้แก่

1. น้ำหนัก (ขนาด) จากการศึกษาระยะเวลาในการลอกคราบของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง พบว่า ระยะเวลาของการลอกคราบของกุ้งขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวซึ่งแปรผลโดยตรงต่อขนาดตัว โดยกุ้งที่มีน้ำหนักมากจะมีระยะเวลาในการลอกคราบมากกว่ากุ้งที่มีน้ำหนักตัวน้อย เช่น กุ้งที่มีน้ำหนัก 2-5, 6-9, 10-15, 16-22 และ 23-31 กรัม ใช้ระยะเวลาในการลอกคราบ 6-7, 7-8, 9-10, 12-13 และ 14-16 วัน ตามลำดับ (ไพโรจน์, 2538)

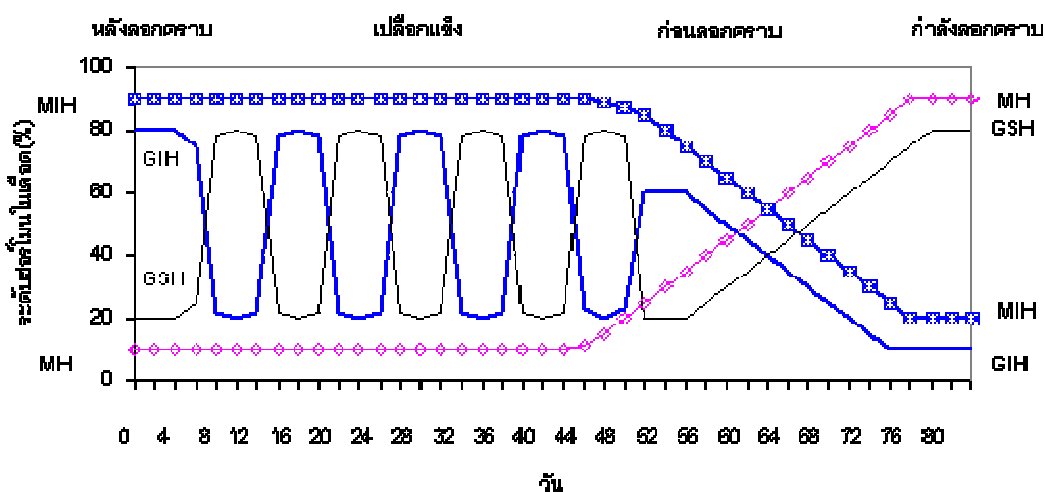
2. ฮอร์โมน การลอกคราบเป็นขบวนการภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ ฮอร์โมนเร่งการลอกคราบ (Molting hormone, MH) และฮอร์โมนยับยั้งการลอกคราบ (Molt inhibiting hormone, MIH) ซึ่งผลิตโดยเซลล์ประสาทส่วนกลาง ฮอร์โมนทั้งสองชนิดจะทำงานควบคู่กันไป และมีการควบคุมซึ่งกันและกัน



รูปที่ 5 ระยะเวลาต่างๆ ของวงจรการลอกคราบในกิ้งกูดาคำ โดยการศึกษาลักษณะของ uropods a. ระยะเวลา intermolt b-f. ระยะเวลา premolt g, h. ระยะเวลา postmolt EE, epidermal edge; I, indent pattern of the epidermis; L, white layer at the edge of the epidermis; S, setae; SC, seta cone; SCn, newly-formed setal cones; Sn, newly-formed seta; →, wavy edge of epidermis; *, clear zone between cuticle and epidermis (ที่มา Promwikorn *et al.*, 2004)

ก่อนการลอกคราบ เซลล์ประสาทจะส่งสัญญาณให้ X-organ ผลิตฮอร์โมน MH เก็บไว้ที่ sinus gland ก่อนส่งเข้ากระแสเลือดเพื่อให้ตัวมีโอกาสสะสมสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สำหรับการลอกคราบ เมื่อตัวสะสมสารอาหารปริมาณเพียงพอสำหรับการลอกคราบแล้ว ก็จะมีการส่งสัญญาณไปให้ระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้ Y-organ ผลิตฮอร์โมน MH เพื่อช่วยเร่งการลอกคราบและส่งเข้ากระแสเลือด เมื่อระดับของฮอร์โมนควบคุมการลอกคราบในเลือดต่ำกว่าฮอร์โมนเร่งการลอกคราบกระบวนการลอกคราบก็จะเริ่มต้น ดังแสดงในรูปที่ 6

สำหรับการกินอาหารของกิ้งกูดาคพบว่า กุ้งที่มีน้ำหนัก 3.8-28.6 กรัม ในช่วงลอกคราบจะกินอาหารลดลง 16.21 เปอร์เซ็นต์ และหลังลอกคราบจะกินอาหารเพิ่มขึ้น 16-22 เปอร์เซ็นต์ กุ้งที่ลอกคราบใหม่จะมีน้ำหนักของตัวน้อยกว่ากุ้งที่เปลือกแข็ง เมื่อเปรียบเทียบที่น้ำหนักตัวใกล้เคียงกัน และในกุ้งที่กำลังจะลอกคราบจะพบชั้นของเปลือกทั้ง 4 ชั้น คือ epicuticle, exocuticle, endocuticle และ membranous layer และมีเปลือกใหม่อยู่ใต้เปลือกเก่า ในกุ้งลอกคราบจะพบชั้น และ exocuticle ไม่พบชั้น endocuticle และ membranous layer (ไพโรจน์, 2538)



รูปที่ 6 ระดับ molting hormone (MH), molt-inhibiting hormone (MIH), gonad-inhibiting hormone (GIH) และ gonad-stimulating hormone (GSH) ในเลือดตามระยะของวงจรการลอกคราบ (ที่มา: โครงการปู, ม.ป.ป.)

1.2.7. ความสัมพันธ์เกี่ยวกับวงจรการลอกคราบต่อการสร้างเซลล์อสุจิ

โดยทั่วไปในสัตว์ชนิดต่าง ๆ มักมีความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ เพื่อการใช้พลังงานที่มีอยู่ในร่างกายอย่างมีประสิทธิภาพ ได้มีงานวิจัยที่พบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในสัตว์จำพวก แมลง และ ครัสเตเชียน ดังนี้

ในแมลง *Ornithodoros parkeri* พบว่า ฮอร์โมน ecdysone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ทำให้มีการลอกคราบมีการกระตุ้น spermatogenesis ของอสุจิในเพศผู้ด้วย โดยการกระตุ้น DNA synthesis ของ spermatocyte (Oliver and Dotson, 1993; Zhang *et al.*, 1995)

ในปู *Metopograpsus messor* พบว่า การเกิด vitellogenesis ในเพศเมีย พบเฉพาะช่วงที่ไม่ได้อยู่ในระยะ premolt ของการลอกคราบเท่านั้น (Sudha and Anilkumer, 1996) สำหรับในเพศผู้ ได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ของการลอกคราบต่อการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน ecdysteroid ซึ่งเป็น molting hormone และกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิใน testis พบว่า ในระยะ intermolt พบอสุจิในระยะต่าง ๆ เช่น spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa ในปริมาณหนึ่ง แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ premolt ซึ่งเป็นระยะที่มีฮอร์โมน ecdysone เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดอย่างรวดเร็ว ก็มีการเพิ่มขึ้นของ spermatogonia, spermatocyte และ spermatozoa อย่างรวดเร็วเช่นกัน (Suganthi and Anilkumar, 1999)

ในกุ้ง natantian พบว่า การเจริญเติบโตซึ่งหมายถึงการลอกคราบมักจะเกิดขึ้นเป็นเหตุการณ์ควบคู่กับพัฒนาการของรังไข่ในเพศเมีย (Okumura *et al.*, 1992) และได้มีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างวงจรการลอกคราบและการสร้าง spermatophore ในกุ้งขาว *L. vannamei* พบว่า spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้ง จะหายไปในระยะ premolt ประมาณ 12 ชั่วโมงก่อนการลอกคราบ และจะพบ spermatophore อีกครั้งที่โคนขาเดินคู่ที่ 5 หลังจากกุ้งลอกคราบไปแล้ว 36 ชั่วโมง หรือในระยะ postmolt (Parnes *et al.*, 2006) ในกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่า ในระยะท้ายของ premolt มีการเพิ่มปริมาณของ spermatogonia อย่างมากมายเช่นเดียวกับที่มีรายงานในปู *M. messor* และกลายเป็น spermatocyte ในระยะ postmolt ซึ่งจะกลายเป็น spermatozoa ในระยะ intermolt และ ระยะต้นของ premolt (Okumura, 2004) สำหรับในกุ้งกุลาดำมีข้อมูลจากการสังเกตจากการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในโรงเพาะฟักเพื่อผลิต nauplius เท่านั้น คือ ในการผสมเทียม (artificial insemination, AI) จะมีการรีด spermatophore ออกจากโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งมาใส่ใน thelycum ของแม่พันธุ์กุ้ง หลังจากแม่กุ้งลอกคราบ พบว่าโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งหลังจากรีด spermatophore ออก จะเริ่มเห็นสีขาวของ spermatophore ขึ้นมาอีกครั้งหลังจากพ่อกุ้งลอกคราบแต่ยังไม่ขุ่น และมีสีขาวขุ่นชัดเจนเมื่อลอกคราบไปแล้วประมาณ 3 วัน

1.3. วัตถุประสงค์

วัตถุประสงค์หลัก

เพื่อศึกษาพัฒนาการของอสุจิและความสัมพันธ์ระหว่างพัฒนาการของอสุจิและวงจรการลอกคราบในพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงเองในบ่อดิน

วัตถุประสงค์ย่อย

1.3.1. เพื่อศึกษาพัฒนาการของ spermatophore ในลักษณะของขนาดและความสูงในในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ

1.3.2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิที่เรียกว่าการเกิด acrosome reaction ใน testis, vas deferens และ spermatophore เปรียบเทียบในแต่ละระยะของการลอกคราบ

1.3.3. เพื่อศึกษาลักษณะทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาและ ultrastructure ของอสุจิใน testis, vas deferens และ spermatophore เปรียบเทียบในแต่ละระยะของการลอกคราบ

1.3.4. เพื่อศึกษารูปแบบของชนิดโปรตีน (protein profile) ของอสุจิใน testis, vas deferens และ spermatophore เปรียบเทียบในแต่ละระยะของการลอกคราบ

1.3.5. เพื่อศึกษาพัฒนาการของอสุจิใน testis, vas deferens และ spermatophore เปรียบเทียบในแต่ละระยะของการลอกคราบโดยใช้ การสร้างโปรตีน actin เป็นตัวบ่งชี้

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมพ่อพันธุ์กุ้งทดลอง

นำพ่อพันธุ์กุ้งจากบ่อคินที่มีอายุ 400 วัน น้ำหนักเฉลี่ย 90 – 100 กรัม เข้าอาคารเพาะฟักลูกกุ้ง เพื่อปรับสภาพกุ้งโดยการนำพ่อพันธุ์กุ้งมาเลี้ยงในความเค็ม 30 ppt ให้อาหารสด 10 - 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน โดยให้แม่เพรียงทรายและปลาหมึกสดหั่นชิ้น ใช้ระยะเวลาในการปรับสภาพ 1 สัปดาห์

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบต่อการสร้าง spermatophore

นำพ่อพันธุ์กุ้งหลังจากการปรับสภาพ จำนวน 10 ตัว มาพักในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร ใส่น้ำทะเลปริมาตร 170 ลิตร ใส่น้ำพ่อพันธุ์กุ้ง 1 ตัวต่อถัง โดยสังเกตบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งด้วยตาเปล่าว่า กุ้งแต่ละตัวนั้นเริ่มสร้าง spermatophore ที่เห็นได้จากโคนขาเดินคู่ที่ห้าในระยะใดของวงจรการลอกคราบ โดยบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ spermatophore ทั้งสองข้าง (ซ้ายและขวา) ในแต่ละวัน และถ่ายภาพไว้ โดยสังเกตลักษณะใสหรือขาวขุ่น เช่น ขาวขุ่นบางส่วน ขาวขุ่นตลอดทั้ง spermatophore ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ

2.3 การหาค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของ spermatophore และ testis

นำพ่อพันธุ์กุ้งจำนวน 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ตามระยะของการลอกคราบ ได้แก่ molt (E), postmolt (A-B), intermolt (C), early premolt (D1-D2) และ late premolt (D3-D4) กลุ่มละ 10 ตัว ผ่า carapace เพื่อนำ testis, vas deferens และ spermatophore ออกมา โดยการใช้กรรไกรตัดบริเวณกึ่งกลางเปลือกคลุมหัว (carapace) เลาะ carapace ออก ตัดเนื้อที่หุ้มส่วนหัวออก ยกเอาหัวใจของกุ้งออกมา จะพบ testis วางอยู่บน hepatopancreas และมีท่อนำเซลล์อสุจิ (vas deferens) ต่อก่อนออกจาก testis ยาวจนถึงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 และมี spermatophore อยู่ที่ปลาย (รูปที่ 7) ใช้

ปากคืบดึง testis, vas deferens และ spermatophore ออกมา ชั่งน้ำหนัก testis และ spermatophore นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของพ่อกุ้งเพื่อหาค่าน้ำหนักสัมพัทธ์

สำหรับน้ำหนักของ spermatophore คำนวณค่าเป็น ผลรวมน้ำหนักของ spermatophore ทั้งสองข้าง (mg) x 100/น้ำหนักตัวกุ้ง (g) เป็นค่า spermatophore-somatic index (SSI) สำหรับ testis นำมาคำนวณค่า น้ำหนัก testis (mg) x 100/น้ำหนักตัวกุ้ง (g) เป็นค่า gonado-somatic index (GSI)



Dissected cephalothorax

from dorsal side

รูปที่ 7 การชำแหละกุ้งและแยก testis, vas deferens และ spermatophore เพื่อชั่งน้ำหนัก และหาค่า gonado-somatic index (GSI) และ spermatophore-somatic index (SSI)

2.4 การศึกษา total sperm count อัตราร้อยละของ abnormal sperm และ acrosome reaction

การศึกษาปริมาณและคุณภาพของเซลล์อสุจิ ในการศึกษาใช้พ่อกุ้งทั้งหมด 33 ตัว โดยศึกษาจากเซลล์อสุจิใน spermatophore ที่อยู่ในวงจรการลอกคราบ 5 ระยะ คือ ระยะ E (7 ตัว) ระยะ A-B (6 ตัว) ระยะ C (6 ตัว) ระยะ D1-D2 (7 ตัว) และระยะ D3-D4 (7 ตัว)

นำ spermatophore มาบดใน Ca^{2+} - free seawater ปริมาตร 1 mL ที่อุณหภูมิ 4 °C ตั้งทิ้งไว้จนส่วนหยาบตกตะกอน นำส่วน supernatant ที่เป็น sperm suspension ปริมาตร 25 μL ย้อมด้วย 0.4% trypan blue 15 μL ตั้งทิ้งไว้ ประมาณ 5 นาที แล้วนำมาหยดบน hemacytometer โดยหยดข้างละ 15 μL ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา นับจำนวนอสุจิไม่มีชีวิต มีชีวิต (โดยดูจากการติดสี trypan blue) อสุจิที่ปกติ และผิดปกติ (เช่น spike ขาดหรืออ หรือ main body บิดเบี้ยว) คำนวณค่า total sperm count แยกเป็น live และ dead sperm และคำนวณค่า percentage of abnormal sperm

การศึกษาอัตราร้อยละของ acrosome reaction ศึกษาการเกิด acrosome reaction ตามวิธีของ Pongtippatee และคณะ (2007) โดยการนำ sperm suspension ที่ได้จากการแยก sperm ดังกล่าวข้างต้นมาปั่นตกที่ความเร็ว 200 g นาน 5 นาที เก็บส่วนตะกอนโดยการ resuspend ด้วย Ca^{2+} - free seawater แล้วนำ sperm suspension มา incubate กับ egg water (ความเข้มข้น 16 μg protein/mL) ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาตรวจสอบอัตราการเกิด acrosome reaction บน hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

2.5 การศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา

ตัดเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ออกเป็น 3 ส่วน คือ testis, vas deferens และ spermatophore นำมาแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (Davidson's fixative) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ล้างและแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1979) ย้อมด้วยสี eosin และ hematoxylin นำตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสีมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.6 การศึกษาด้วย TEM

ตัดเนื้อเยื่อ testis, vas deferens และ spermatophore fix ด้วย 4 % paraformaldehyde ใน artificial seawater, pH 7.8 ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาล้างด้วย artificial seawater 3 ครั้ง post-fix ด้วย 1% osmium tetroxide ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 1 ชั่วโมง ล้างตัวอย่าง 3 ครั้ง ด้วย artificial seawater และ dehydrate ด้วย ethanol ความเข้มข้น 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100 % ตามลำดับ infiltrate และ embed ด้วย low-viscosity resin ตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome นำมาย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (100-CX II, JEOL)

2.7 การศึกษา protein profile ใน testis, vas deferens และ spermatophore

ตัดเนื้อเยื่อของ testis, vas deferens และ spermatophore แช่ Ca^{2+} -free seawater ที่อุณหภูมิ 4 °C บดเพื่อแยกให้เซลล์อสุจิหลุดออกมา นำมาปั่นตกที่ความเร็ว 100 g นาน 1 นาที เพื่อแยกเซลล์อสุจิออกจากเยื่อหุ้มต่างๆ เรียกว่า sperm suspension นำส่วน sperm suspension ล้างทำความสะอาดเซลล์อสุจิโดยการปั่นตกที่ความเร็ว 200 x g นาน 5 นาที นำส่วน pellet มา resuspend และแยกส่วนหนึ่งไปนับจำนวน total sperm count ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำ sperm suspension ที่เหลือปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl pH 7.4, 1.0 mM PMSF) เพื่อสกัดโปรตีน บนน้ำแข็ง ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกโปรตีนส่วนใส วัดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนที่สกัดได้ด้วยวิธี Bradford เทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน เตรียมชุด gel จากนั้นผสมสารละลายโปรตีนที่สกัดได้กับ 2 x SDS loading dye ผสมให้เข้ากัน และ protein marker นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 นาที เพื่อ denature protein ใส่ตัวอย่างโปรตีนที่ denature แล้วลงไปใน gel รวมทั้ง protein marker ใช้ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง นำ gel ที่ได้มาย้อมโปรตีนด้วย coomassie brilliant blue 1 ก็น ล้างสีออกด้วย destained I และ destained II นำ gel ที่ผ่านการย้อมสีมาศึกษาความแตกต่างของโปรตีนที่เกิดขึ้น

2.8 การทำ Western blotting analysis

การเตรียมตัวอย่างเหมือนกับการศึกษา protein profile โดยนำ gel ที่ผ่านกระบวนการเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง มาศึกษาโปรตีน actin ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิของกิ้งกูดาค่าที่มีความพร้อมในกระบวนการเกิด acrosome reaction โดยย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่ 0.45 ไมโครเมตร nitrocellulose membrane แทนการย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue หลังจากนั้นทำการ block non-specific binding ด้วย 5% skimmed milk ในสารละลาย TBS ที่ประกอบด้วย 0.1% Tween-20 (TBS-T) นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง incubate ด้วย anti-actin ที่ความเจือจาง 1:1,000 นาน 3 ชั่วโมง ล้าง anti-actin ด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที incubate ด้วย goat anti rabbit-HRP ที่ความเจือจาง 1:5,000 นาน 1 ชั่วโมง ล้าง goat anti rabbit-HRP ด้วย PBS-T จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้น detection ด้วย ECL kit (Amersham biosciences) เพื่อให้เกิด chemiluminescence โดย incubate นาน 1 นาที แล้วนำไป expose ลงบนแผ่นฟิล์ม ในห้องมืด

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1. ความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบต่อการสร้าง spermatophore

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบต่อการสร้าง spermatophore โดยดูจากลักษณะภายนอกบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 พบว่าสีขาขุ่นของ spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อกุ้งเริ่มหายไปในระยะก่อนการลอกคราบช่วงปลาย (D4) โดยเริ่มหายไปก่อนการลอกคราบ 6-12 ชั่วโมง โดยสีขาขุ่นของ spermatophore เริ่มจางลงและค่อยๆหายไปจนกุ้งเพศผู้ลอกคราบและเริ่มเห็นสีขาขุ่นของ spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 หลังจากกุ้งลอกคราบไปอย่างน้อย 3 ชั่วโมง และสีขาขุ่นจะเริ่มมีสีขาเข้มขึ้นเรื่อยๆ มากขึ้นในระยะพักของการลอกคราบ (รูปที่ 8)

3.2. ค่าน้ำหนักสัมพันธ์ของ spermatophore และ testis

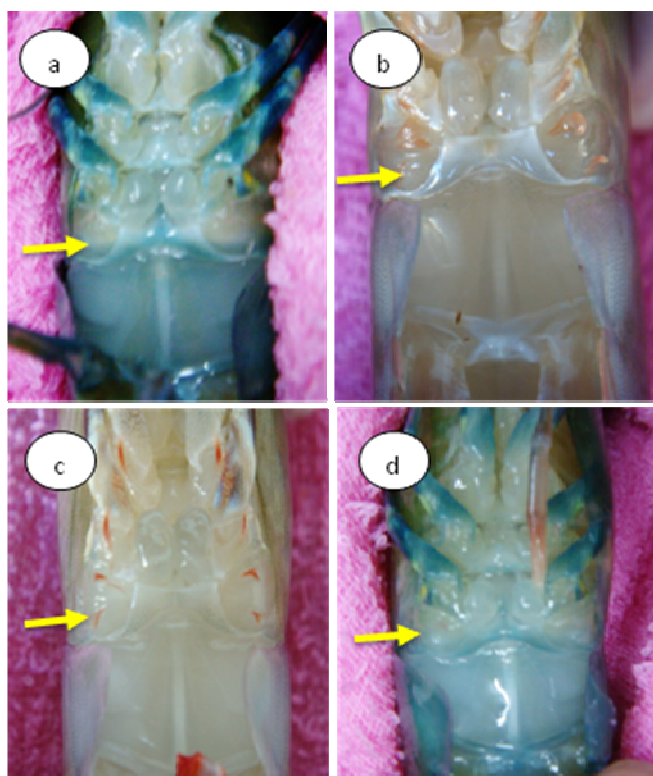
จากการแยก testis, vas deferens และ spermatophore ออกมาจากกุ้งแต่ละตัว ซึ่งน้ำหนักของ testis และ spermatophore และคำนวณหาค่าของ gonado - somatic index (GSI) และค่า spermatophore - somatic index (SSI) พบว่าค่า GSI ของระยะ A-B มีค่าสูงสุดคือ 209.9 และสูงกว่าค่าในระยะ C-D0, D1-D2 และ D3-D4 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทางสถิติ โดยมีค่า 171.1, 148.9, 172.4 ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับค่าในระยะ E เท่ากับ 192.6 (รูปที่ 9A) และไม่พบความแตกต่างของค่า GSI เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะ A-B และ E หรือระหว่างระยะ C-D0, D1-D2, D3-D4 และ ระยะ E โดยทั่วไป ค่า GSI มีความแปรปรวน (SD) ค่อนข้างสูง ค่าที่มีความแปรปรวนน้อยที่สุด อยู่ในระยะ D3-D4

น้ำหนักตัวของกุ้งในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบแสดงไว้ในตารางที่ 4 ซึ่งพบว่ากุ้งมีน้ำหนักน้อยที่สุดในระยะ A-B

ตารางที่ 4 น้ำหนักตัวกุ้งในแต่ละระยะของการลอกคราบ (N = 10)

E	A-B	C-D0	D1-D2	D3-D4
93.0 ± 4.0	90.1 ± 9.9	94.3 ± 13.0	96.1 ± 10.7	97.8 ± 6.1

สำหรับค่า SSI พบว่า ในระยะ E มีค่าน้อยที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะอื่นๆในวงจรการลอกคราบ ในขณะที่ค่า SSI ในระยะอื่นๆของการลอกคราบไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 9B) ค่า SSI ในระยะ C-D0 มีความแปรปรวน (SD) มากกว่าในระยะอื่นๆ และในระยะ D3-D4 มีความแปรปรวนน้อยที่สุด



รูปที่ 8 ลักษณะของ spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อกุ้ง โดย (a) คือ พ่อกุ้งในระยะ D4 ที่มีสีขาขุ่นของ spermatophore (b) สีขาขุ่นของ spermatophore เริ่มจางลงจนไม่เห็น spermatophore ใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ก่อนการลอกคราบ (c) ระยะลอกคราบไม่เห็นสีขาขุ่นของ spermatophore และ (d) เริ่มเห็นสีขาของ spermatophore หลังจากกุ้งลอกคราบ อย่างน้อย 3 ชั่วโมง

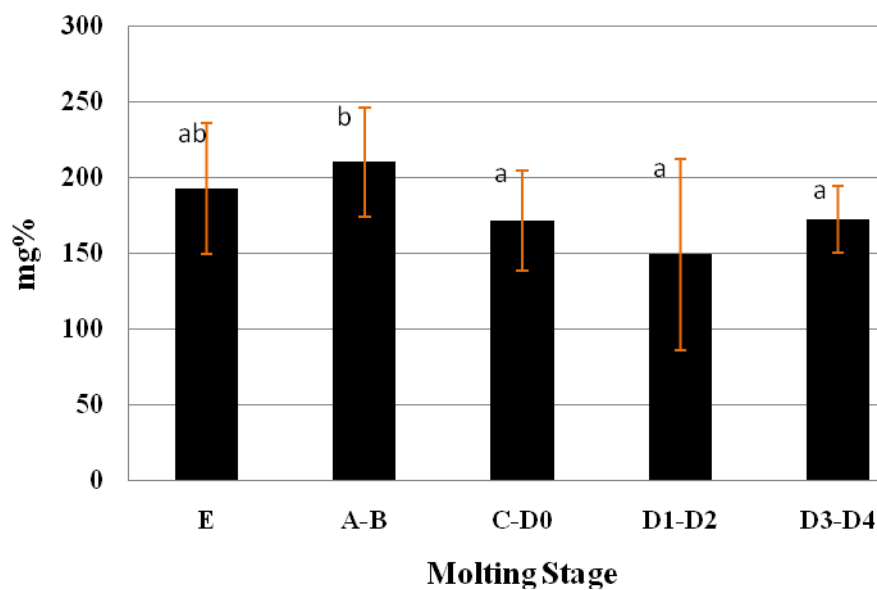
3.3. ปริมาณและคุณภาพของอสุจิมีชีวิตจาก spermatophore

Total sperms count ศึกษาจำนวนเซลล์อสุจิในแต่ละระยะของการลอกคราบไม่พบเซลล์อสุจิใน spermatophore ทั้งสองข้างของพ่องู้งในระยยะ E ส่วนในระยยะ A-B และ C มีจำนวนเซลล์อสุจิ 24 และ 21 ล้านเซลล์ต่อ spermatophore ในระยยะ D1-D2 พบจำนวนเซลล์อสุจิมากที่สุดประมาณ 40 ล้านเซลล์ ซึ่งมีจำนวนเซลล์อสุจิมากกว่าในระยยะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และในระยยะ D3-D4 มีจำนวนเซลล์อสุจิประมาณ 27 ล้านเซลล์ ซึ่งไม่แตกต่างกับระยยะ A-B และ C (รูปที่ 10A) และพบว่าไม่พบเซลล์อสุจิตึคสีน้ำเงินของ trypan blue

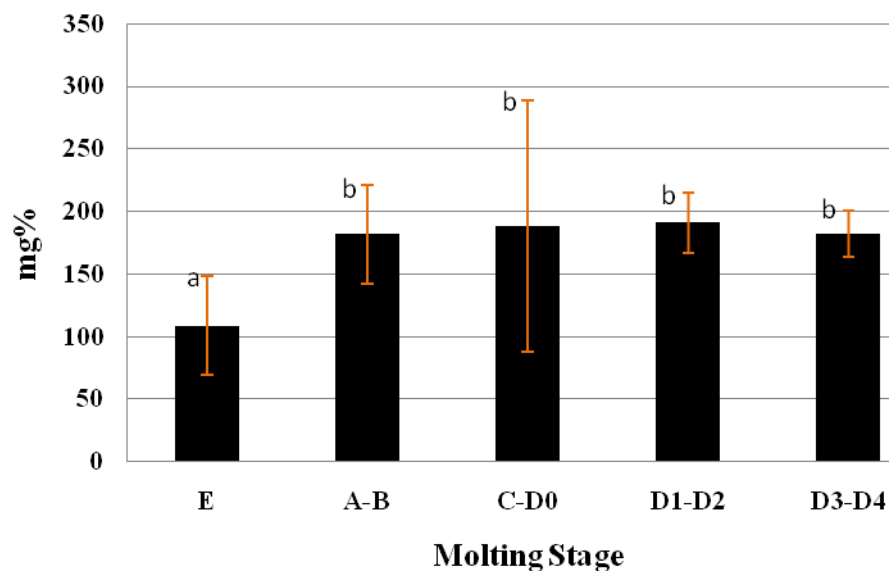
อัตราการย่อยละของความผิดปกติของเซลล์อสุจิ เนื่องจากไม่พบเซลล์อสุจิใน spermatophore ระยยะ E ดังนั้นอัตราการย่อยละของเซลล์อสุจิที่ผิดปกติจึงเท่ากับ 0 ในระยยะอื่นๆ ของการลอกคราบพบความผิดปกติประมาณ 15% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในเชิงสถิติ ในระยยะ A-B มีความแปรปรวนของค่าความผิดปกติของเซลล์อสุจิมากกว่าในระยยะอื่นๆ (รูปที่ 10B)

อัตราการย่อยละของการเกิด acrosome reaction อัตราการย่อยละของการเกิด acrosome reaction ในระยยะ A-B, D1-D2 และ D3-D4 มีค่าประมาณ 40-50% ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับระยยะ C-D0 ที่มีค่าต่ำสุด คือประมาณ 30% (รูปที่ 11)

A. Gonado-somatic Index

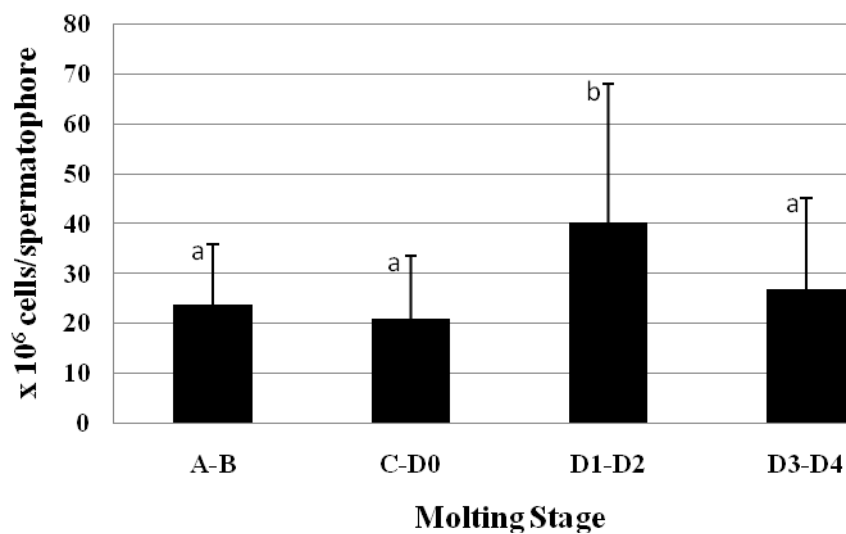


B. Spermatophore-somatic Index

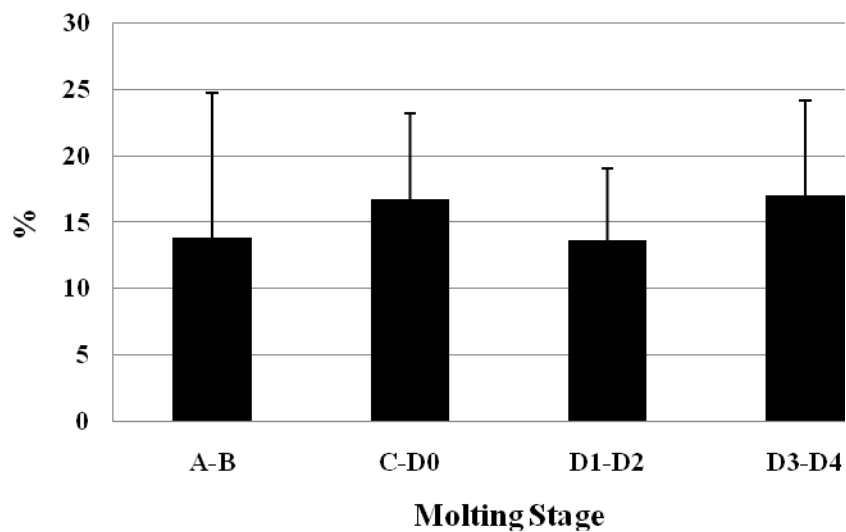


รูปที่ 9 ค่า gonado-somatic index (A) และ spermatophore-somatic index (B) ของกุ้งกุลาดำเพศผู้ ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ * ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

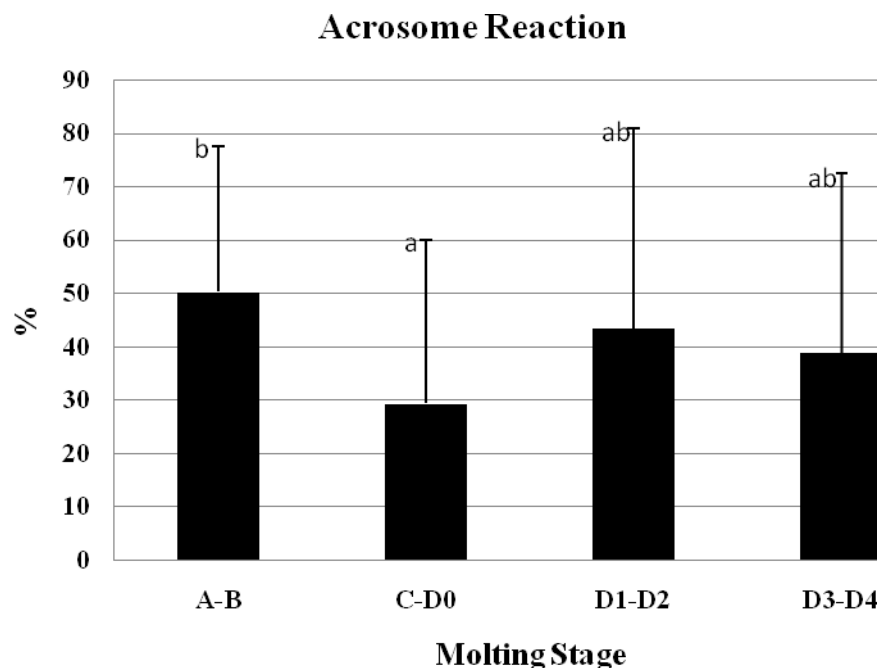
A. Total Sperm Count



B. Abnormal Sperm



รูปที่ 10 ค่า total sperm count (A) และอัตราร้อยละของ abnormal sperm (B) ของกิ้งกูด้าเพศผู้ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ * ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 11 ค่าอัตราการย่อยของเซลล์อสุจิที่เกิด acrosome reaction ในกิ้งกูดำเพศผู้ ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ * ตัวอักษรที่แตกต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.4. ลักษณะวิทยาของเซลล์ต่างๆ ใน testis, vas deferens และ spermatophore

การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าภายใน testis ประกอบด้วย seminiferous tubules ซึ่งบรรจุเซลล์อสุจิในระยะต่างๆ กัน ได้แก่ spermatogonia (8-10 μm), primary spermatocytes (6-8 μm), secondary spermatocytes (4-5 μm) spermatid (1-2 μm) และเซลล์อสุจิหรือ spermatozoa (1 μm) ภายใน lobe เดียวกันของ testis พบเซลล์อสุจิที่อยู่ใน developmental stage เดียวกันตลอดทั้ง lobe แต่ lobe ที่ต่างกัน มี developmental stages ต่างกัน กล่าวคือมี synchronization of development ใน lobe เดียวกัน (รูปที่ 12) ลักษณะนี้เหมือนกับที่รายงานไว้ (Vanichviriyakit, Ph.D. thesis, 2008)

เมื่อเปรียบเทียบวิทยา ของ testis ไม่พบความแตกต่างในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ ในทุกระยะมีกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิจาก spermatogonia จนถึง sperm ไม่พบความแตกต่างทาง histology ของ testis ในระยะ A-B แม้ว่าค่า GSI จะสูงสุดในระยะนั้นก็ตาม

ใน vas deferens อาจแยกออกอย่างคร่าวๆ เป็นส่วนต้น คือส่วนที่ติดกับ testis (รูปที่ 13) และส่วนปลาย คือส่วนที่ติดกับ terminal ampoule (รูปที่ 14) ส่วนต้นมีเซลล์ที่เป็นผนังของ vas deferens ที่เป็น stratified columnar epithelium ซ้อนกันอย่างน้อย 3-4 ชั้น ที่มี cytoplasm ติดสีค่อนข้างไปทาง basophilic ค่อนข้างเข้ม และ epithelial cells ชั้นบนๆ มีลักษณะของ degenerative nucleus ที่ถูกเบียดออกไป หลุดจากชั้น epithelium เข้าไปอยู่ใน lumen และ nucleus สลายตัวไป cytoplasm ของ epithelial cells นั้น กลายเป็น basophilic matrix ให้เซลล์อสุจิฝังตัวอยู่ ลักษณะดังกล่าว ดูเหมือนว่า epithelial cells นั้นมีลักษณะของ secretion เป็นแบบ holocrine secretion คือมีการหลุดของทั้งเซลล์ออกมาเลย ที่ส่วนปลายของ vas deferens พบว่า epithelial cells ที่เป็นผนังของ vas deferens นั้น มีขนาดของเซลล์สั้นลง และ cytoplasm มีสีค่อนข้างไปทาง acidophilic ทำให้สีของ matrix ใน lumen นั้น ค่อนข้างไปทางสี acidophilic ด้วย

เช่นเดียวกับการพบใน testis ไม่พบความแตกต่างของ vas deferens ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบเลย

ใน terminal ampoule (รูปที่ 15-20) พบว่าแบ่งออกเป็น 2 compartments หรือ 2 chambers โดยที่ chamber ใหญ่บุด้วย epithelial cells เป็น stratified cuboidal epithelium หนาประมาณ 2-3 ชั้น ส่วน chamber เล็ก บุด้วย epithelial cells เป็น stratified cuboidal epithelium หนาประมาณ 1-2 ชั้น ภายใน chamber ใหญ่ มีเซลล์อสุจิที่ฝังอยู่ใน matrix โดยที่สีของ matrix เปลี่ยนเป็นสี acidophilic มากขึ้น และยังมี eosinophilic band ขนาดกว้างประมาณ 25 μm ล้อมรอบ matrix ของเซลล์อสุจิด้วย ซึ่งทำให้ทราบว่า spermatophore หมายถึงส่วนของ matrix ที่มีเซลล์อสุจิอยู่ภายในและมี eosinophilic band เป็นผนังหุ้มซึ่งแยกจากชั้น epithelium ของ terminal ampoule (รูปที่ 20-21) ใน chamber เล็ก พบว่ามี matrix สี eosinophilic เช่นเดียวกันกับสีของ eosinophilic band ใน chamber ใหญ่ และพบรูเปิดของ chamber เล็กที่เข้าสู่ chamber ใหญ่ด้วย ลักษณะทาง histology ดังกล่าวดูเหมือนว่า chamber เล็กสร้าง eosinophilic matrix มาหุ้ม matrix ของเซลล์อสุจิ

เมื่อเปรียบเทียบขนาดของ terminal ampoule และสิ่งที่มีอยู่ใน lumen ของ terminal ampoule ในระยะต่างๆ กันของวงจรการลอกคราบ (รูปที่ 15) จะเห็นว่าระยะ E มีขนาดของ terminal ampoule ที่เล็กที่สุด และไม่พบ matrix และเซลล์อสุจิใน lumen เลย การเปลี่ยนแปลงนี้เริ่มพบในระยะ D3-D4 ซึ่งจะเห็นว่า พบช่องว่างใน lumen มากขึ้นและดูเหมือนว่า matrix และเซลล์อสุจิกำลังถูกทำลาย หรือหลุดออกไปจาก lumen ในขณะที่ในระยะ D1-D2 และระยะก่อนหน้านั้น ปริมาณของ matrix และเซลล์อสุจิจะพบมาก และเกาะกันแน่น คือไม่พบช่องว่างมากเท่ากับในระยะ D3-D4 (รูปที่ 16)

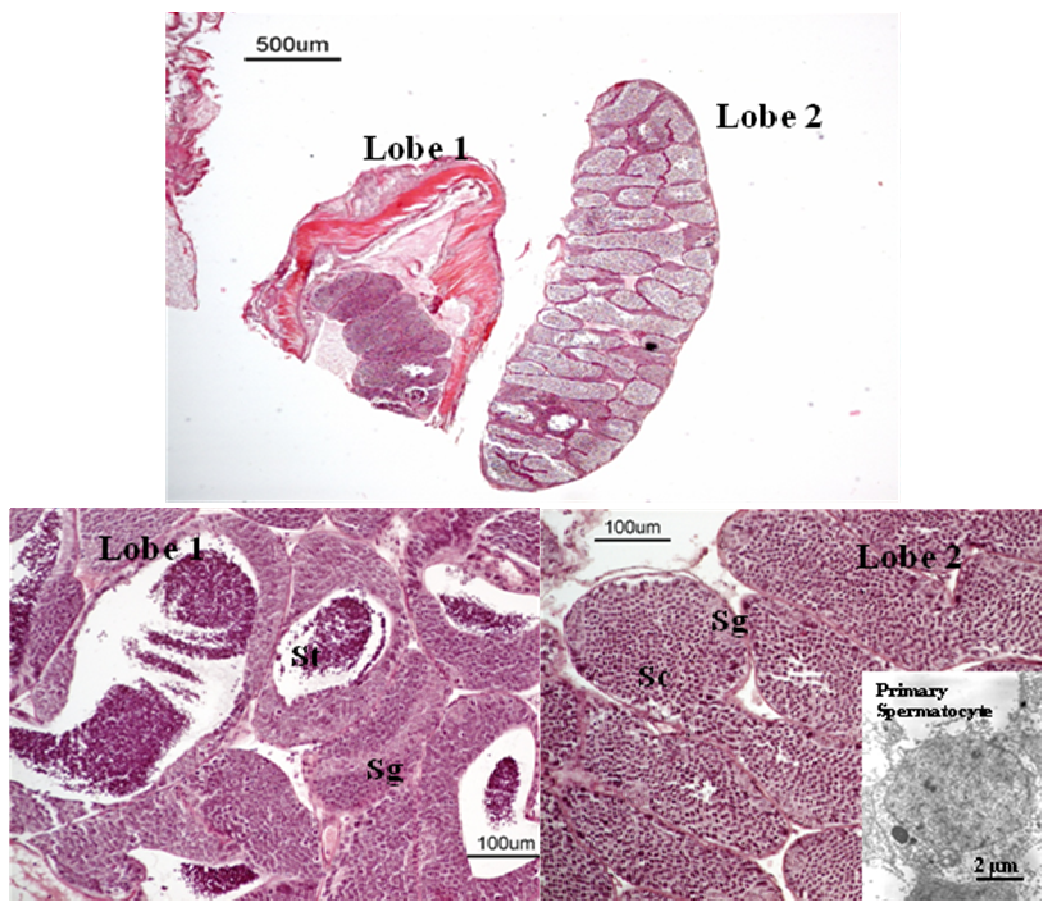
ที่ขอบนอกของ terminal ampoule บริเวณที่ติดกับ chamber เล็ก พบ acini ของ androgenic gland อยู่ (รูปที่ 20) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มี ขนาดประมาณ 4-5 μm มี heterochromatic nucleus และ clear cytoplasm อยู่รวมกันเป็นกลุ่มที่ข้างหนึ่งของ terminal ampoule ล้อมรอบด้วย loose connective tissue

เมื่อเปรียบเทียบ histology ของ terminal ampoule และเซลล์อสุจิที่อยู่ภายใน ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ พบว่าในระยะ E ขนาดของ terminal ampoule มีขนาดเล็กกว่าระยะอื่นๆ มี epithelial cells ของ chamber ใหญ่ ขดไปขดมมาอยู่ภายใน lumen และไม่พบเซลล์อสุจิใน lumen เลย (รูปที่ 17) ลักษณะของ nucleus ของ epithelial cells นี้เป็นแบบ lobulated nucleus และบ่อยครั้ง จะพบ lamellar body ขดอยู่ในระหว่าง lobules ของ nucleus (รูปที่ 18) ใน chamber เล็ก ไม่พบว่ามี matrix เช่นกัน ในระยะอื่นๆ จะพบเซลล์อสุจิอยู่ใน chamber ใหญ่ ซึ่งดูเหมือนจะมีหนาแน่นที่สุดในระยะ D1-D2 (รูปที่ 20)

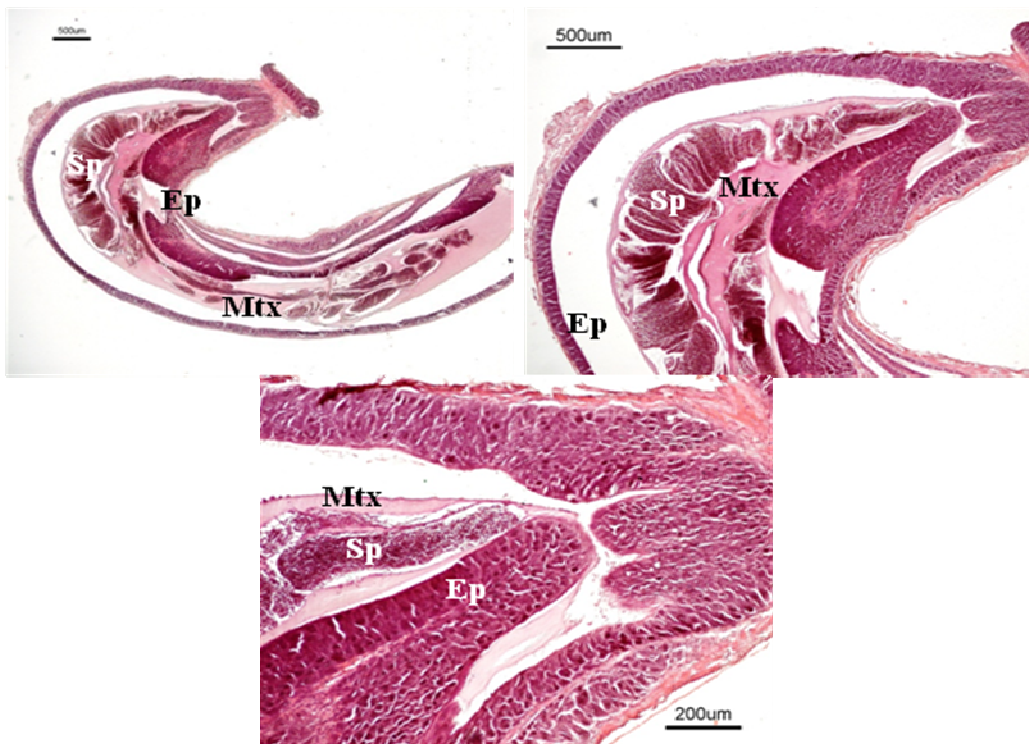
Eosinophilic band ที่มีอยู่รอบ sperm matrix มีขนาดใหญ่ที่สุดในระยะ D1-D2 และมีขนาดแคบลงจนสังเกตเห็นในระยะ E (เปรียบเทียบรูปที่ 17 กับ 21)

ข้อแตกต่างอีกประการหนึ่งของ terminal ampoule ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบคือ ปริมาณของ androgenic gland ซึ่งดูเหมือนว่าจะพบน้อยลงในระยะ D3-D4 และพบมากในระยะ E และ A-B (รูปที่ 20)

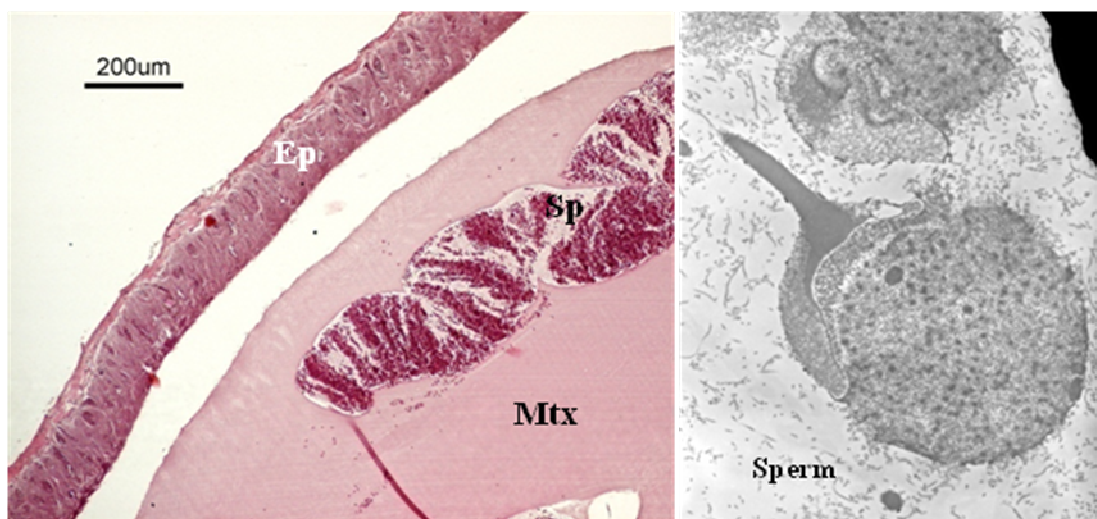
เมื่อศึกษา ultrastructure ของเซลล์ต่างๆ ใน testis ใน vas deferens และใน spermatophore ไม่พบความแตกต่างใดๆ ใน tissue นั้นๆ เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละระยะเวลาการลอกคราบ แม้แต่ในระยะ D3-D4 ของ spermatophore ซึ่งเป็นระยะก่อนที่จะไม่พบเซลล์อสุจิ ก็ยังไม่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ของเซลล์อสุจิ ที่อาจจะบ่งชี้ว่าเริ่มมีการถูกทำลายแต่อย่างใด และหากเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์อสุจิที่อยู่ใน testis ใน vas deferens และใน spermatophore ก็ไม่พบความแตกต่างเช่นกัน (รูปที่ 22)



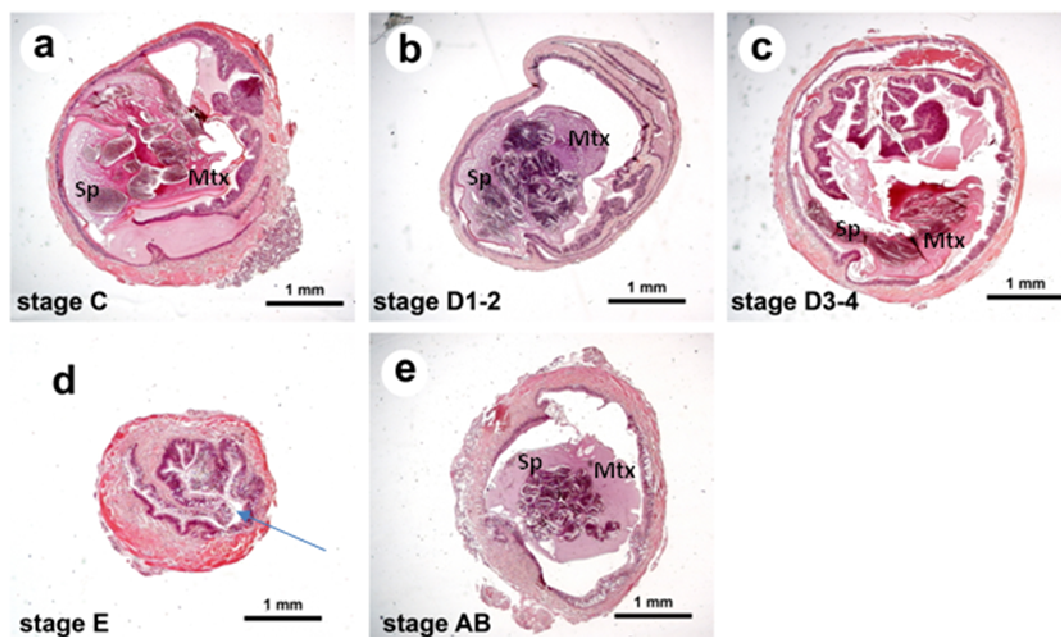
รูปที่ 12 ภาพ light microscope และ ultrastructure ของ testis ของพ่อกิ้ง ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายๆ กัน ในทุกระยะของวงจรการลอกคราบ คือประกอบด้วย lobe ที่มี developmental stage ของ spermatogenesis เดียวกัน ใน seminiferous tubules และ spermatogonia (Sg) และ/หรือ spermatocytes (Sc) และ/หรือ spermatid (St) และ/หรือ sperm ในอัตราส่วนที่ต่างๆ กัน ภาพบนมีกำลังขยาย 4x ภาพล่างซ้ายและขวามีกำลังขยาย 20x



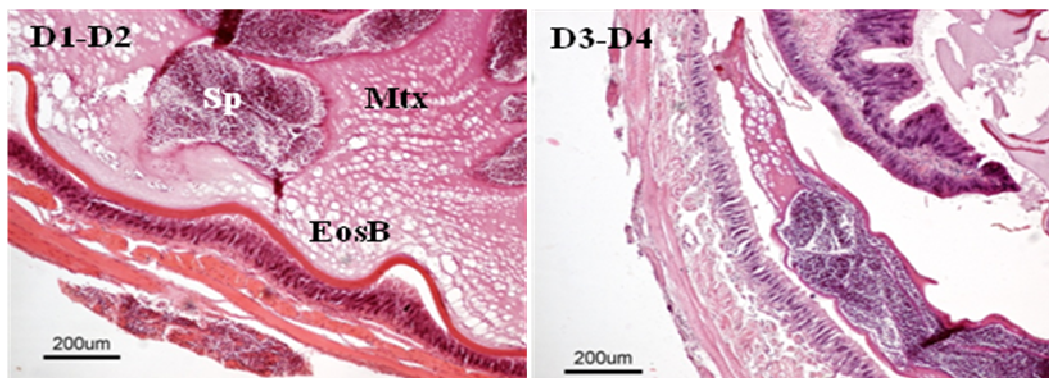
รูปที่ 13 ภาพ light microscope ของส่วนบนของ vas deferens ของพ่อกึ่ง ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายๆ กัน ในทุกระยะของวงจรการลอกคราบ คือประกอบด้วย epithelial wall (Ep) และ lumen ซึ่งมี sperm (Sp) ฝังตัวอยู่ใน matrix (Mtx) โดย ภาพบนซ้าย กำลังขยาย 2x ภาพบนขวากำลังขยาย 4x และภาพล่างกำลังขยาย 10x



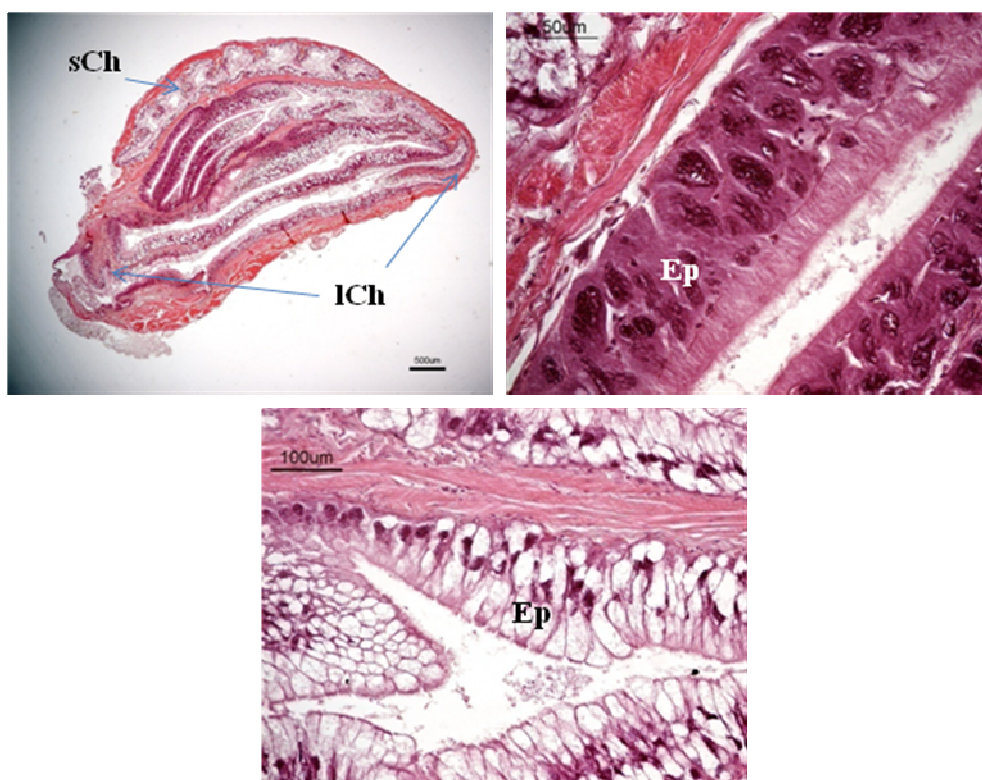
รูปที่ 14 (ซ้าย) ภาพ light microscope ของส่วนปลายของ vas deferens ของพ่อกิ้ง ซึ่งมี epithelial wall (Ep) แคบลง และ matrix (Mtx) มีสีค่อนข้าง acidophilic มากขึ้น (กำลังขยาย 10x) และทางด้านขวามือภาพ ultrastructure ของเซลล์อสุจิใน vas deferens ซึ่งมีรูปร่างสมบูรณ์ ประกอบด้วย main body, cap และ spike



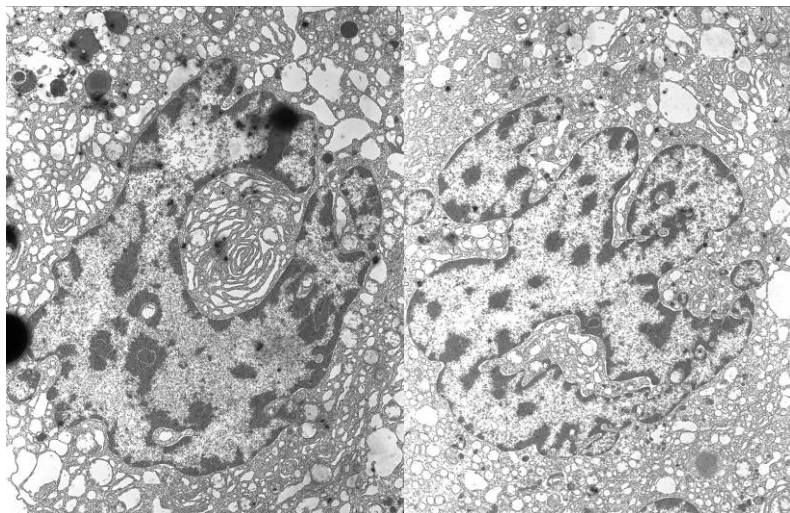
รูปที่ 15 ภาพ light microscope ของ cross sections ของ spermatophore ใน terminal ampoule ของพ่อกุ้งในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ ที่กำลังขยาย 2x พบว่าปริมาณของ matrix (Mtx) และเซลล์อสุจิ (Sp) ภายใน lumen มีความแตกต่างกัน มีการย่อยสลาย หรือหลุดออกของ matrix และเซลล์อสุจิ ในระยะ D3-D4 จนหายไปหมดสิ้นในระยะ E (ตำแหน่งที่ลูกสรชี หมายถึงบริเวณที่เคยพบเซลล์อสุจิและถูกล้อมรอบด้วย matrix แต่หายไปในระยะ E)



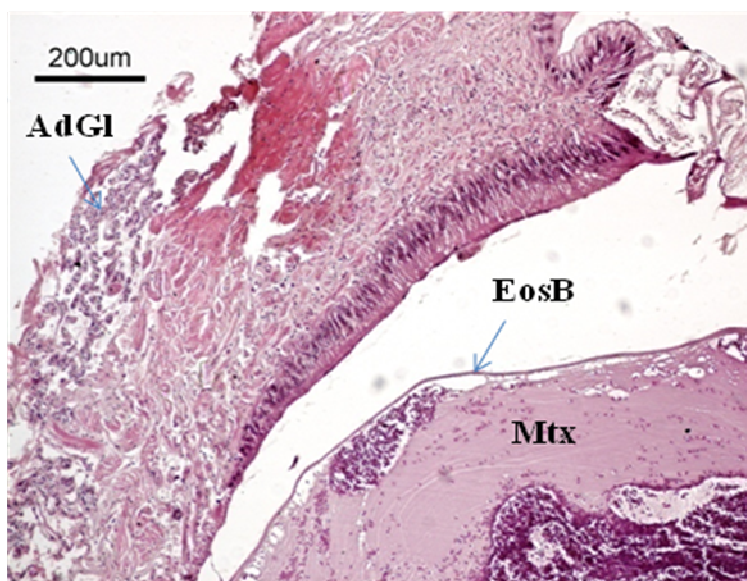
รูปที่ 16 ภาพ light microscope ของ spermatophore ของฟองู้งในระยะเวลา D1-D2 และระยะเวลา D3-D4 ของวงจรการลอกคราบที่กำลังขยาย 20x จะพบว่าระยะ D1-D2 มี eosinophilic band (EosB) ที่กว้างและชัดกว่า และมีช่องว่างใน matrix (Mtx) น้อยกว่าในระยะเวลา D3-D4



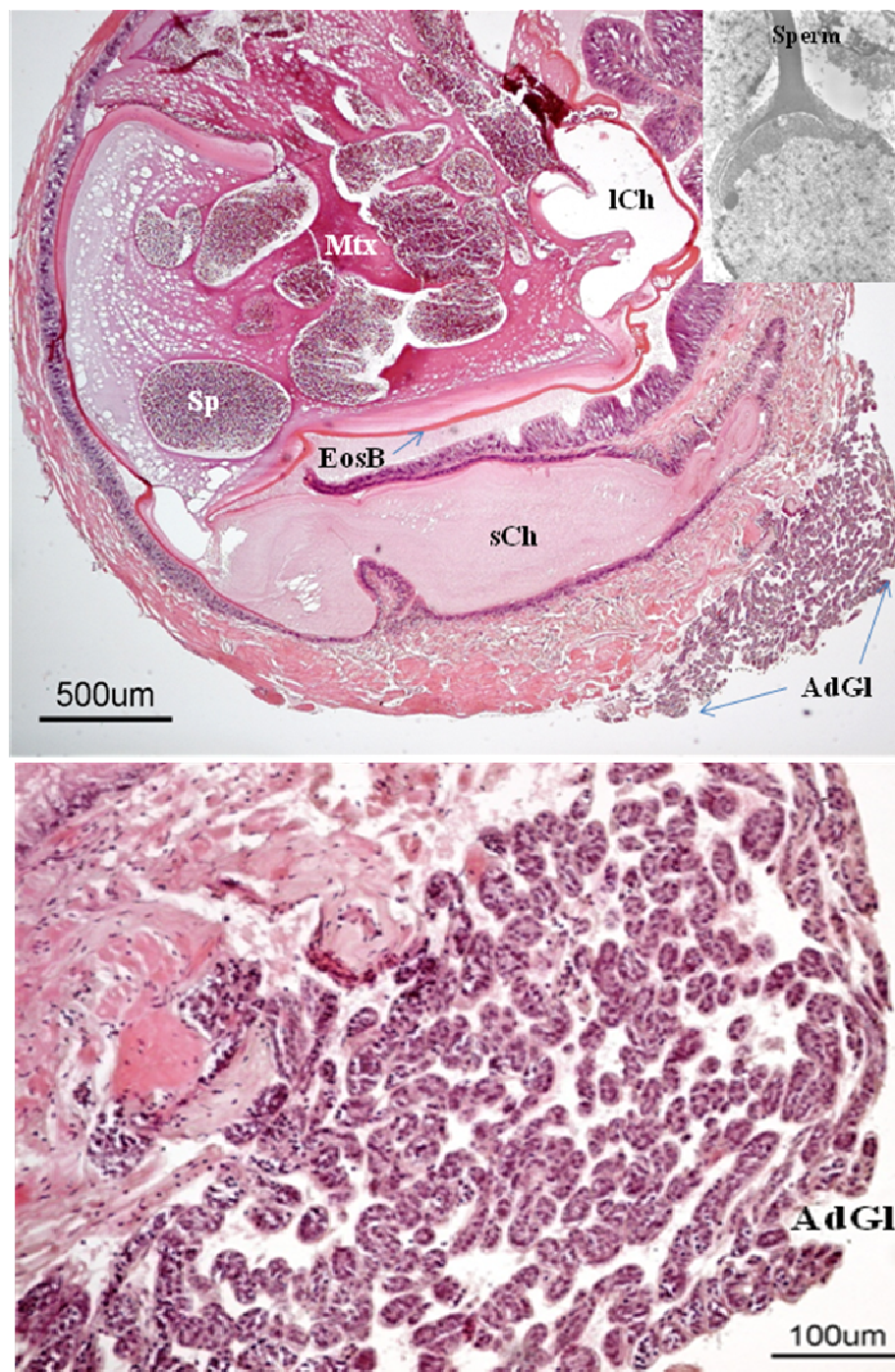
รูปที่ 17 ภาพ spermatophore ของฟองู้งในระยะเวลา E ของวงจรการลอกคราบ ซึ่งมี epithelial wall (Ep) ของ large chamber (lCh) ขดไปมา โดยไม่มี sperm และ matrix ใน lumen และ small chamber (sCh) ที่มี epithelial cells ที่มี vacuolated cytoplasm และไม่มี matrix ใน lumen เช่นกัน



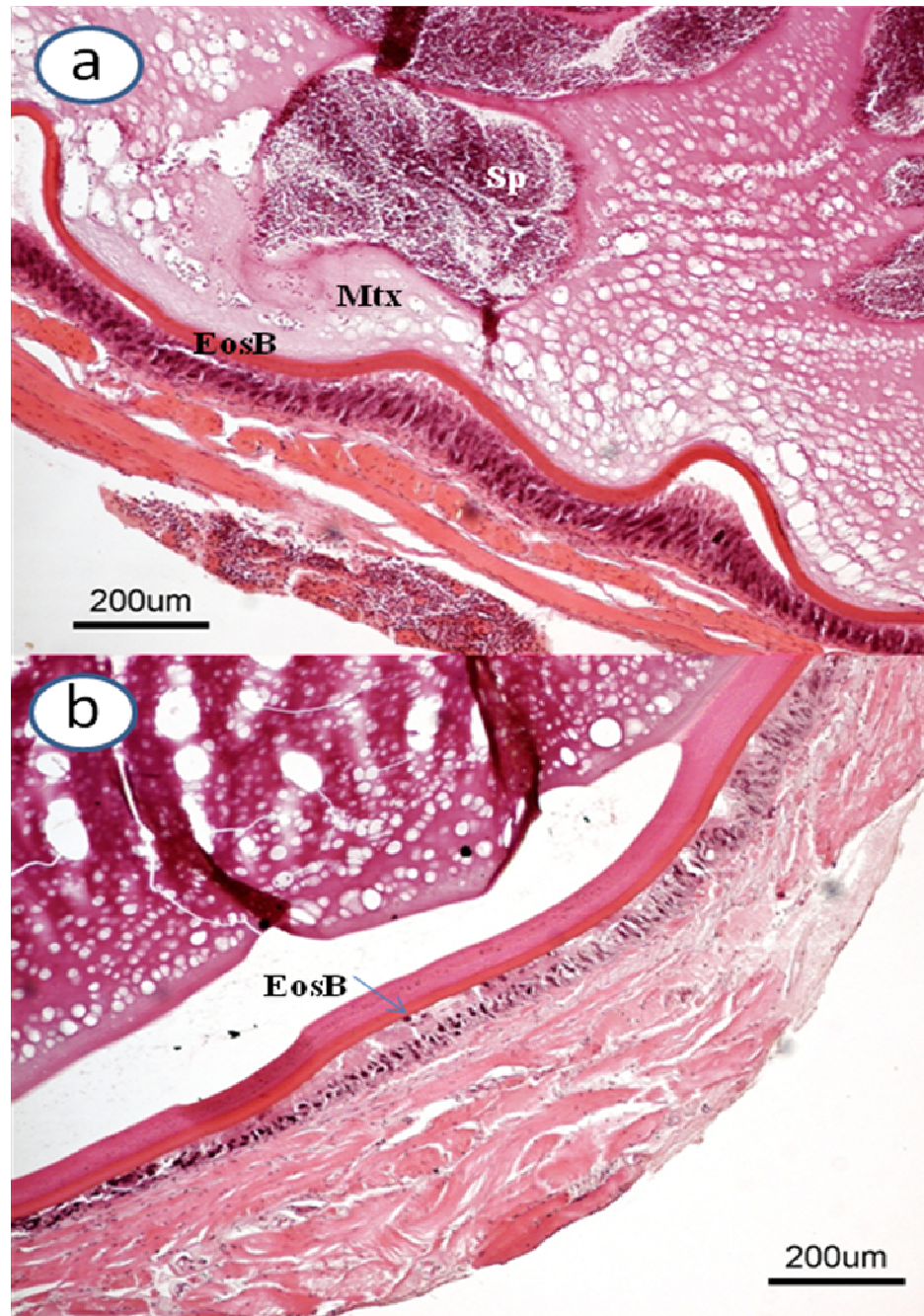
รูปที่ 18 ภาพ ultrastructure ของ nucleus ของ epithelial cell ของ spermatophore ของพ่อกิ้งในระย
E ของวงจรการลอกคราบ



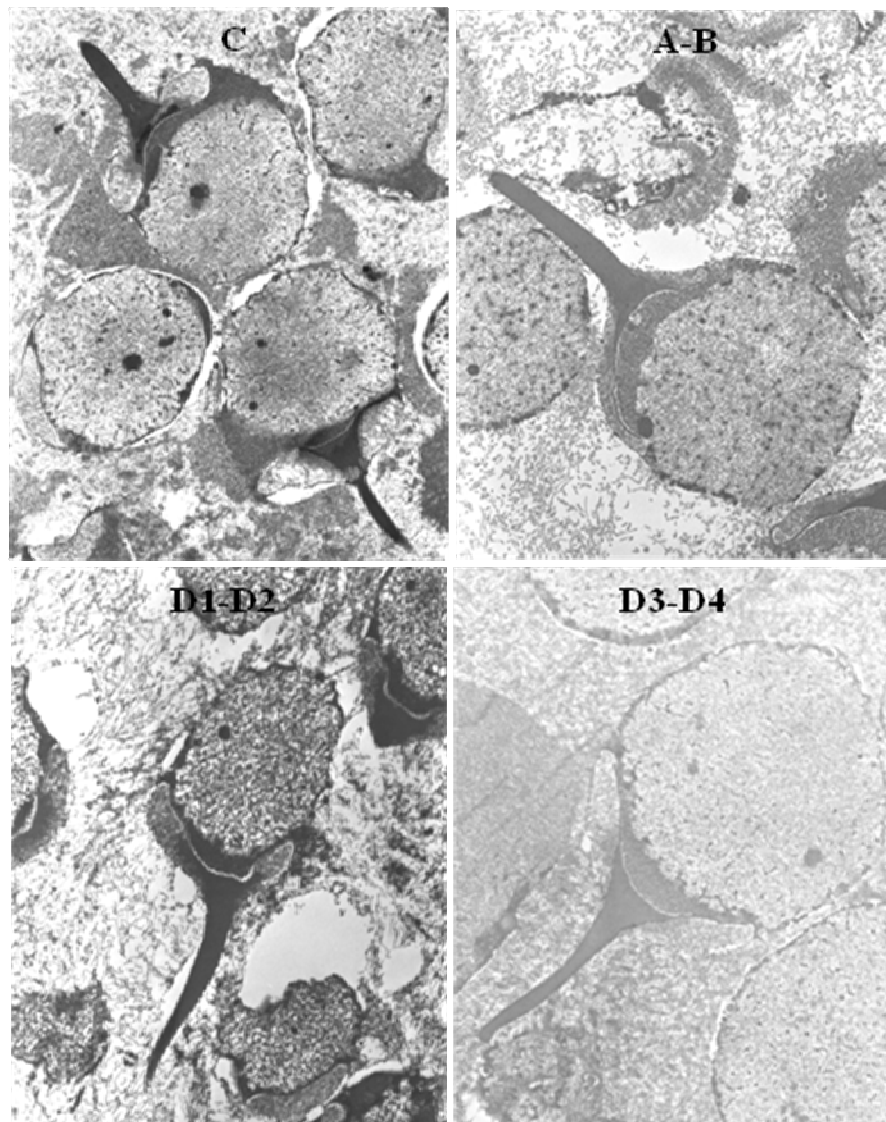
รูปที่ 19 ภาพ spermatophore ของพ่อกิ้งในระย A-B ของวงจรการลอกคราบ โดยมี sperm (Sp) และ matrix (Mtx) ซึ่งล้อมรอบด้วย eosinophilic band (EosB) และมีกลุ่ม acini ของ androgenic gland (AdGI) อยู่ที่ขอบ (กำลังขยาย 20x)



รูปที่ 20 ภาพ spermatophore ของพ่อกิ้งในระยะ C-D0 ของวงจรการลอกคราบ โดยมี large chamber (ICh) บรรจุ sperm (Sp) และ matrix (Mtx) ซึ่งล้อมรอบด้วย eosinophilic band (EosB) และ small chamber (sCh) และมีกลุ่ม acini ของ androgenic gland (AdGI) อยู่ที่ขอบ (กำลังขยาย 20x)



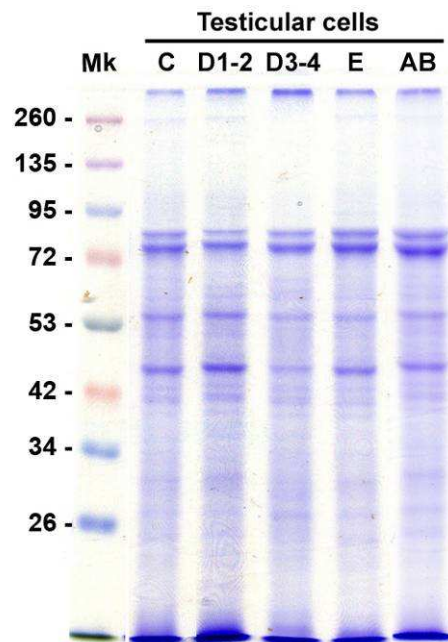
รูปที่ 21 ภาพ spermatophore ของพ่อกุ้งในระยะ D1-D2 (a) และของระยะ D3-D4 (b) ของวงจรการลอกคราบ แสดงให้เห็น sperm (Sp) และ matrix (Mtx) ซึ่งล้อมรอบด้วย eosinophilic band (EosB) อย่างชัดเจน (กำลังขยาย 20x)



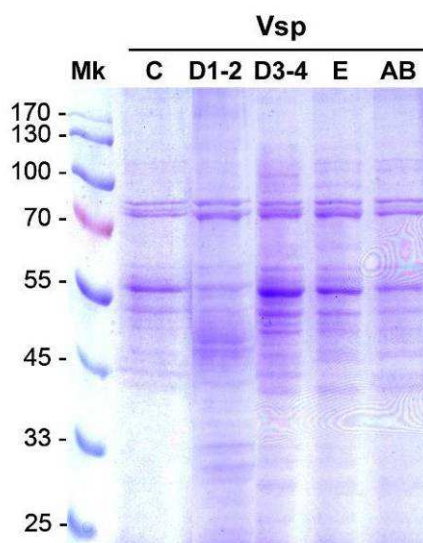
รูปที่ 22 ภาพ ultrastructure ของเซลล์สุจิของพ่อกิ้งในแต่ระยะของวงจรลอกคราบ

3.5. รูปแบบโปรตีน ของเซลล์สุจิจาก testis, vas deferens และ spermatophore

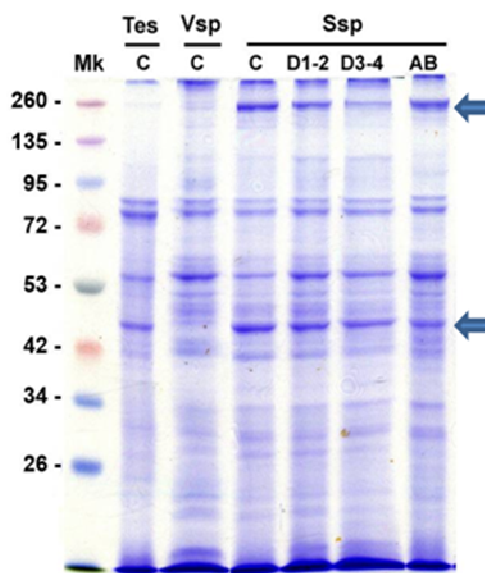
รูปแบบโปรตีนของเซลล์สุจิที่แยกได้จากเนื้อเยื่อเดียวกันของกึ่งในแต่ละระยะของการลอกคราบไม่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 23 -25) แต่มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของเนื้อเยื่อ กล่าวคือ พบ actin ที่เป็นโปรตีนขนาด 45 kDa ของอสุจิใน spermatophore แต่ไม่พบใน vas deferens (รูปที่ 26) เพราะผลจากการทำปฏิกิริยากับ actin-antibody ด้วยวิธี กับ actin-antibody (รูปที่ 27) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาด 260 kDa ของอสุจิที่พบใน spermatophore ซึ่งไม่มีในอสุจิที่แยกได้จาก testis และใน vas deferens



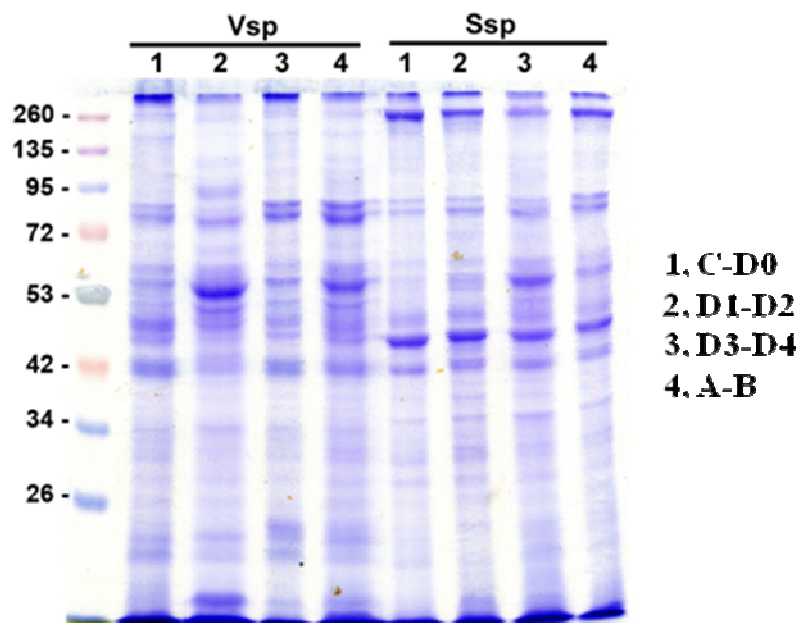
รูปที่ 23 รูปแบบโปรตีนของเซลล์สุจิใน testis ในแต่ละระยะของการลอกคราบ Mk = protein marker



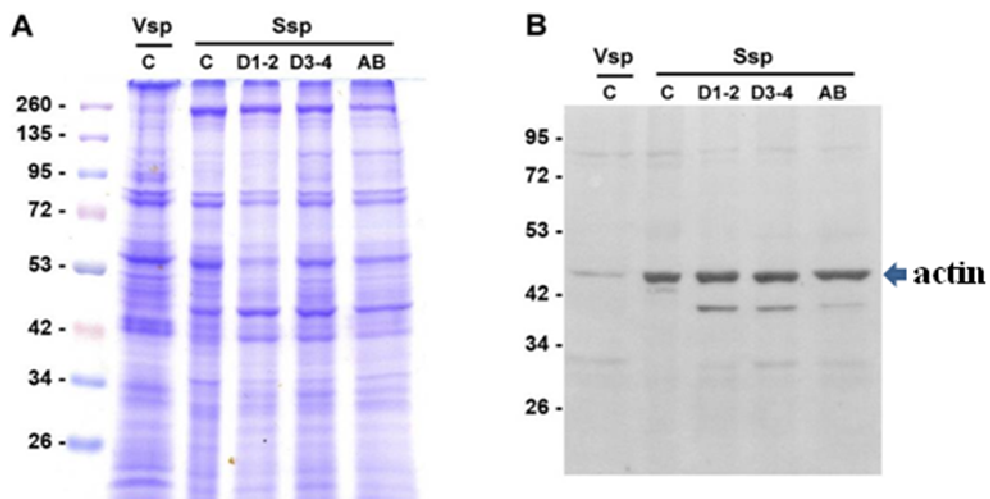
รูปที่ 24 รูปแบบโปรตีนของเซลล์สุจิใน vas deferens ในแต่ละระยะของการลอกคราบ Mk = protein marker; Vsp, vas deferens



รูปที่ 25 รูปแบบโปรตีนของเซลล์สุจิใน spermatophore ในแต่ละระยะของการลอกคราบ Protein band ที่ MW 260 และ 45 kDa (ลูกศร) เป็น protein band สำคัญที่ spermatophore มีความแตกต่างใน testis และ vas deferens Mk = protein marker; Ssp, spermatophore; Tes, testis; Vsp, vas deferens



รูปที่ 26 รูปแบบโปรตีนของเซลล์สุจิใน vas deferens (Vsp) และ spermatophore (Ssp) ในแต่ละระยะของการลอกคราบ Mk = protein marker; Ssp, spermatophore; Tes, testis; Vsp, vas deferens



รูปที่ 27 รูปแบบโปรตีน (A) และ Western blot analysis ด้วยการจับด้วย actin-antibody (B) ของเซลล์สุจิใน vas deferens และ spermatophore ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ Mk = protein marker; Ssp, spermatophore; Vsp, vas deferens

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาความแตกต่างในด้านระบบสืบพันธุ์ของ กุ้งกุลาดำ อายุโตเต็มวัยเพศผู้ ในระยะต่างๆ ของวงจรการลอกคราบ ซึ่งมีสมมุติฐานว่าอาจมีความแตกต่างในด้านประสิทธิภาพของการสืบพันธุ์ในระหว่างวงจรการลอกคราบ อวัยวะของกุ้งที่ทำการศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้คือ testis, vas deferens และ terminal ampoule ของ vas deferens ซึ่งบรรจุ spermatophore วิธีการศึกษาเป็นการดูด้วยตาเปล่า การชั่งน้ำหนัก การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการศึกษาทางชีวเคมี เพื่อศึกษาว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และ/หรือ ทางชีวเคมี ในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบหรือไม่

เริ่มจากการศึกษาด้วยตาเปล่า โดยการสังเกต spermatophore ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 พบว่าสเปิร์มของ spermatophore เริ่มหายไปในระยะก่อนการลอกคราบช่วงปลาย (ระยะ D4) ซึ่งเกิดขึ้นอย่างน้อย 6 ชั่วโมงก่อนการลอกคราบ และเริ่มเห็นสเปิร์มของ spermatophore อีกครั้งหลังจากกุ้งลอกคราบแล้วอย่างน้อย 3 ชั่วโมง (ระยะ A) และสเปิร์มของ spermatophore เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะพักการลอกคราบ (ระยะ C) และมีสีเข้มที่สุดในระยะก่อนการลอกคราบช่วงต้น (ระยะ D1-D2) ซึ่งผลการทดลองนี้มีความแตกต่างจากการศึกษาในกุ้งขาว *L. vannamei* ของ Parnes และคณะในปี ค.ศ. 2006 ซึ่งพบว่าสเปิร์มของ spermatophore บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 เริ่มหายไปในระยะก่อนการลอกคราบประมาณ 12 ชั่วโมง และเริ่มเห็นสเปิร์มของ spermatophore ใหม่อีกครั้งหลังจากกุ้งลอกคราบแล้วประมาณ 36 ชั่วโมง จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า ระยะที่สเปิร์มหายไปในช่วงลอกคราบสั้นกว่าในกุ้งขาว โดยลักษณะของสเปิร์มของ spermatophore มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเซลล์อสุจิ จากการศึกษาค่า total sperm count พบจำนวนของเซลล์อสุจิมากที่สุดในช่วงก่อนการลอกคราบช่วงต้น ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับระยะอื่นๆ และในระยะลอกคราบ (ระยะ E) ไม่พบเซลล์อสุจิในส่วน terminal ampoule เลย สอดคล้องกับผลการทดลองจากการศึกษาด้วยตาเปล่าคือบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อกุ้งกุลาดำที่ไม่เห็นสเปิร์มของ spermatophore ในระยะลอกคราบ และเมื่อนำ terminal ampoule ระยะนี้มาศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ก็ให้ผลยืนยันว่าไม่พบเซลล์อสุจิและ matrix ที่อยู่ภายใน โดยเซลล์อสุจิที่หายไปอาจเกิดจาก eosinophilic band ซึ่งคาดว่าจะเป็นผนังหุ้มบางๆ ของ spermatophore ที่อยู่ภายใน terminal ampoule ซึ่งหนาและเข้มในระยะ D1-

D2 จะเริ่มบางและจางไปในระยะ D3-D4 ซึ่งผนังหุ้มนั้นทำหน้าที่ป้องกัน หรือเป็น “เปลือกนึ่ม” ให้กับ spermatophore และเมื่อ “เปลือกนึ่ม” นี้สูญสลายไป ก็ทำให้ matrix และเซลล์อสุจิที่เกิดการตายหลุดลอยออกไปกับกระแส น้ำ โดยผ่านช่องทาง gonopore นอกจากนี้ในการทดลองระดับ ultrastructure พบสิ่งที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งคือเกิดการตายของ epithelial cell ภายใน terminal ampoule ซึ่งอยู่ติดกับ eosinophilic band ในลักษณะคล้ายการเกิด apoptosis กล่าวคือ เซลล์มีการหดตัว (cell shrinkage) เยื่อหุ้มนิวเคลียสขาดออกจากกัน ทำให้มีการแบ่งนิวเคลียสออกเป็นกลุ่มเล็กๆ และ DNA ภายในแยกออกเป็นกลุ่ม ๆ (karyorrhexis) และการกระจายตัวของโครมาตินที่แยกออกเป็นกลุ่มก้อนเกาะอยู่ตามผิวด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (pyknosis) โดยปกติแล้วการเกิด apoptosis หรือการตายของเซลล์ถูกควบคุมโดย cell signal ที่มีสาเหตุมาจากสิ่งต่างๆ เช่น ฮอร์โมน, growth factor, cytokines หรือ stress เช่น ความร้อน ภาวะขาดอาหาร การติดเชื้อไวรัส และภาวะขาดออกซิเจน การตายของ epithelial cell ใน terminal ampoule นี้ยังไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด ซึ่งก็มีความเป็นไปได้ที่มีผลมาจากฮอร์โมนที่เพิ่มมากขึ้นในกระแสเลือดช่วงที่มีการลอกคราบ อย่างเช่น ecdysone หรือ molting hormone และสิ่งกระตุ้นเหล่านี้อาจมีผลต่อเซลล์อสุจิและกระบวนการเสื่อมสลายของ spermatophore การเปลี่ยนแปลงของ spermatophore ที่เกี่ยวกับการลอกคราบนั้น มีรายงานไว้แล้วในกุ้งขาว *L. vannamei* (Parnes *et al.*, 2006) แต่ในรายงานนั้น ไม่ได้มีการแสดงไว้ว่า spermatophore หลุดออก หรือหายไปในช่วงการลอกคราบระยะใด และการเปลี่ยนแปลงของ spermatophore นั้นเป็นอย่างไรในแต่ละระยะของวงจรการลอกคราบ และได้ตั้งข้อสังเกตว่าการ “สลัด” หลุดออกของ spermatophore นั้น เป็นกลไกสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดการอักเสบของ terminal ampoule ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ควรหาสาเหตุที่ทำให้เกิดการหลุดลอกของ matrix ต่อไป

นอกจากนี้การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาของ spermatophore ทำให้พบ androgenic gland ที่อยู่ติดกับ terminal ampoule ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ spermatophore จากการศึกษาในอดีต androgenic gland ทำหน้าที่ในการสร้าง androgenic hormones ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กำหนดความเป็นเพศผู้ของ crustaceans บางชนิด (Nagamine *et al.*, 1980; Nagamine and Knight, 1987; Khalaila *et al.*, 2001)

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่าการสร้าง eosinophilic band น่าจะสร้างใน small chamber ของ terminal ampoule เพราะมีลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาที่คล้ายกับ content ใน lumen ของ small chamber ซึ่งเป็นไปได้ว่า epithelium ของ small chamber มีบทบาทสำคัญ การศึกษาส่วนประกอบของ content ใน small chamber และ eosinophilic band รวมทั้ง expressions

ด้าน mRNA และ proteins ของ small chamber จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจและควรทำการศึกษาต่อไปเช่นกัน

จากการศึกษา spermatogenesis ใน testis ทำให้ได้ข้อมูลยืนยันการศึกษาที่มีมาก่อนว่า testis มี spermatogenesis ตลอดเวลา และเป็นแบบ synchronization ใน lobe เดียวกัน และไม่มีระยะใดเลยที่มีการหยุดพักการสร้าง นอกจากนั้น ก็พบเซลล์อสุจิภายใน lumen ของ vas deferens ในทุกระยะของวงจรการลอกคราบเช่นกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของวงจรของเซลล์อสุจิในกึ่งฤดูค่านั้น อาจกล่าวได้ว่าขึ้นอยู่กับการทำงานของ terminal ampoule เป็นหลัก ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการรายงานเกี่ยวกับ spermatogenesis ในปู (*Metopograpsus messor*) ว่ามีความต่อเนื่องตลอดระยะวงจรการลอกคราบ เช่นเดียวกับในกึ่งฤดูค้ำที่รายงานนี้ แต่ในระยะ late premolt มีการแบ่งเซลล์อย่างมากของ spermatogonia และเกิดการยับยั้ง maturation ของเซลล์อสุจิในช่วงนั้น (Suganthi and Anikumar, 1999) ในการศึกษาในกึ่งฤดูค้ำครั้งนี้ ไม่พบการยับยั้ง maturation ของเซลล์อสุจิแต่อย่างใด แต่แตกต่างจากกึ่งฤดูค้ำกรรม *M. rosenbergii* ที่การเกิด spermatogenesis ใน testis นั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะวงจรการลอกคราบ (Okumura and Hara, 2004)

สำหรับการเกิด spermatogenesis จากการศึกษาพบว่า ค่า GSI มีค่าสูงสุดในระยะ A-B ของวงจรการลอกคราบแตกต่างเป็นนัยสำคัญทางสถิติกับระยะอื่นๆ อย่างไรก็ตามจากการที่พบว่า testis มี spermatogenesis ตลอดเวลา ไม่มีการหยุดพัก ดังนั้นค่า GSI ที่สูงอาจมาจากน้ำหนักของตัวกึ่งที่น้อยลง ซึ่งในระยะหลังลอกคราบ A-B นั้น น้ำหนักกึ่งน้อยกว่าในระยะอื่นๆ

การเกิด acrosome reaction ซึ่งแสดงถึงความพร้อมของเซลล์อสุจิใน spermatophore พบว่าไม่ต่างกันมากนักในแต่ละระยะของการลอกคราบ แม้จะพบว่ามีค่าสูงสุดในระยะ A-B และต่ำลงมาในระยะอื่นๆ ซึ่งระยะ C-D0 ต่ำกว่าระยะ A-B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นสิ่งที่ตรงข้ามกับสมมุติฐานที่ว่า เซลล์อสุจิที่เริ่มสะสมใหม่ๆ ในระยะ A-B นั้น น่าจะมีความพร้อมน้อยที่สุด แต่ข้อมูลนี้บ่งบอกว่าเซลล์อสุจิที่มีอยู่ใน spermatophore นั้น ไม่ว่าจะเกิดก่อนหรือหลัง ก็มีประสิทธิภาพของการผสมพันธุ์ใกล้เคียงกัน จะต่างกันที่ปริมาณ มากกว่าคุณภาพ โดยที่พบอสุจิปริมาณสูงสุดที่ระยะ D1-D2 คือประมาณ 40 ล้านตัวต่อ spermatophore ดังนั้น การรีด spermatophore มาใช้ทำการผสมเทียมในกึ่งฤดูค้ำ ควรทำในระยะ D1-D2 มากกว่าระยะอื่น ซึ่งอัตราการปฏิสนธิอาจจะไม่ต่างกับการนำ spermatophore จากระยะอื่นๆ มาใช้เท่าใด เพราะประสิทธิภาพของเซลล์อสุจินั้นใกล้เคียงกัน

สำหรับการศึกษาทางด้านชีวเคมี โดยการดู protein profile และ western blotting analysis พบว่า protein profile ใน testis , vas deferens และ spermatophore ในแต่ละระยะของวงจร

การลอกคราบไม่พบความแตกต่างแต่พบความแตกต่างระหว่างอวัยวะ คือ พบ 260 kDa protein ใน spermatophore แต่ใน testis และ vas deferens พบว่ามีปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถบอกได้ว่า 260 kDa protein นั้นคือโปรตีนอะไร แต่การที่มีเฉพาะใน spermatophore มีความเป็นไปได้ว่าเป็นโปรตีนที่สร้างจาก terminal ampoule และนอกจากนี้ได้พบ 45 kDa protein ซึ่งเป็นโปรตีน actin ใน testis และ spermatophore และพบปริมาณน้อยใน vas deferens ผลการศึกษานี้ใกล้เคียงกับการศึกษาในแมลง *Nephrotoma suturalis* ของ Strauch และคณะ (1980) ซึ่งพบโปรตีน actin ในเซลล์ spermatocyte และ spermatid แต่ไม่พบในเซลล์ spermatozoa สำหรับในกิ้งกูดามีการเกิด spermatogenesis ใน testis ซึ่งพบเซลล์อสุจิทุกระยะ ตั้งแต่ spermatocyte, spermatid และ spermatozoa แต่ใน vas deference มีเฉพาะเซลล์ spermatozoa เพียงอย่างเดียว สำหรับบทบาทของโปรตีน actin มีการพบว่าเซลล์อสุจิของกิ้งกูดทะเล *Sigyonia ingentis* มีองค์ประกอบของ globular actin ในบริเวณ subacrosomal region ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ได้ส่วนของ spike และต่อมา globular actin เกิดการ polymerization ให้เป็น acrosomal filament ในขณะที่เกิด acrosome reaction ยึดตัวออกไปจาก cell body ของเซลล์อสุจิไปแตะกับผิวของเซลล์ไข่ในขณะที่เกิดการปฏิสนธิ (Griffin *et al.*, 1988; Griffin and Clark., 1990 และ Clark., 1991) ในกิ้งกูดามีบทบาทของโปรตีน actin อาจคล้ายคลึงกันซึ่งการสะสมของ actin ได้มีขึ้นตั้งแต่ระหว่างการเกิด spermatogenesis ใน testis แต่อย่างไรก็ตามการที่ไม่พบหรือพบในปริมาณน้อยมากของ actin ใน vas deference ยังไม่มีคำอธิบายจากการศึกษาครั้งนี้ แต่ก็เป็นไปได้ว่า actin ที่อยู่ในเซลล์อสุจิที่ถูกส่งมาจาก testis อาจจะอยู่ในรูป inactive form หรือมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบที่ไม่สามารถจับกับ antibody ได้ แต่เมื่อเข้ามาอยู่ใน spermatophore ได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเป็นลักษณะของ active form ที่มีความพร้อมในการปฏิสนธิมากขึ้น เพราะตรวจพบโปรตีน actin อีกครั้งด้วยการ โดย western blotting analysis ในอสุจิที่อยู่ใน spermatophore อย่างไรก็ตามบทบาทและหน้าที่ของโปรตีน actin ในเซลล์อสุจิของกิ้งกูดายังไม่ชัดเจนจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

สิ่งที่สรุปได้จากงานวิจัยนี้คือ การสร้างเซลล์อสุจิของกิ้งกูดาคำเพศผู้มีอยู่อย่างต่อเนื่อง เช่นเดียวกับสัตว์เพศผู้ทั่วไป ยกเว้นระยะลอกคราบ เพราะในระยะนั้น ไม่มีการสะสมเซลล์อสุจิอยู่ในถุง spermatophore เลย เพราะเซลล์อสุจิถูกทำลาย หรือหลุดหายไปกับกระแสน้ำก่อนการลอกคราบ ข้อมูลจากการวิจัยนี้ให้ประโยชน์ในด้านการเลือก spermatophore ที่จะนำไปผสมเทียม โดยระยะที่ดีที่สุดคือระยะ D1-D2 ซึ่งเป็นช่วงเวลาประมาณ 10 วัน หลังการลอกคราบ อย่างไรก็ตามสามารถนำ spermatophore ไปใช้ได้ทุกระยะเช่นกัน ยกเว้นระยะ E

เอกสารอ้างอิง

- โครงการปู. ม.ป.ป. เรื่องปูทะเล. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
http://www.crab-trf.com/sea_crab.php (สืบค้นเมื่อ 21 มีนาคม 2553)
- นวลจันทร์ จันท์สว่าง. 2537. ผลของฮอร์โมน 17 แอลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรน และเทสโทสเตอโรน-โพรพิโนเอต ต่อขบวนการสร้างสเปิร์มของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 140 น.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ และเฉลิมชัย สุวรรณรักษ์. 2540. ลักษณะความแตกต่างของเพศ สัดส่วนเพศ และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงแบบพัฒนา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2540. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 35 น.
- บุญเสริม วิทย์ชำนานุกุล. 2549. ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (ข้อมูลไม่ได้เผยแพร่)
- ไพโรจน์ พวงลดดา. 2538. ระยะเวลาการลอกคราบของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 113 น.
- เรณู ยาจิโร และพิชญ์ นานันต์. 2540. สรีระวิทยาการสืบพันธุ์, ระยะห่างของการลอกคราบและการผสมเทียมพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ, *Penaeus monodon* จากทะเลอันดามัน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2540. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 16 น.
- วนิดา ไตรพานิชย์กุล, วีระชัย สิงหนิยม, วีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุมล จิ่งอุดมเจริญ. 2540. การศึกษากระบวนการสร้างเซลล์อสุจิในกุ้งกุลาดำ. วิทยาสารเกษตรศาสตร์สาขาวิทยาศาสตร์ 31: 192 – 198.
- วัฒนา วีระชาติยานุกุล, ททัษรัตน์ เครือไวยสุวรรณ และ รพีพรรณ วานิชวิริยะกิจ. 2549. การปรับเปลี่ยนของผิวเซลล์อสุจิโดยโปรตีนในถุงเก็บอสุจิ (thelycum) ของกุ้ง *Penaeus monodon* เป็นขบวนการที่จำเป็นก่อนการปฏิสนธิ. รายงานการวิจัยสนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 21 น.
- Alfaro, J., Munoz, N., Vargas, M. and Komen, J. 2003. Induction of sperm activation in open and closed thelycum penaeoid shrimps. *Aquaculture* 216: 371-381.
- Benzie, J. A. H. 1998. Penaeid genetics and biotechnology. *Aquaculture* 164: 23-47.
- Bray, W. A. and Lawrence, A. L. 1998. Successful reproductive of *Penaeus monodon* following hypersaline culture. *Aquaculture* 159: 275-282.

- Bray, W. A. and Lawrence, A. L. 1992. Reproductive of *Penaeus* species in captivity. In: Fast AW, Lester LJ(Eds), Marine shrimp Culture: Principles and Practices. Elsevier, Amsterdam, The Netherland. 93-170.
- Ceballos-Vazquez, B.P., Rosas, C. and Ricotta, I. S. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 228: 141-151.
- Clark, W. H. Jr., Chen, T. I., Pillai, M. C., Uhlinger, K., Shoffner-Mcgee, J. and Griffin, F. J. 1991. The biology of gamete activation in *Sicyonia ingentis* (Penaeoidea); present knowledge and future directions. Bull. Inst. Zool. 16: 553-571.
- Clark, W. H. Jr., Yudin, A. I., Griffin, F. J. and Shigekawa, K. 1984. The control of gamete activation and fertilization in the marine Penaeidae, *Sicyonia ingentis*. In: Advances in Invertebrate Reproduction. W. Engels, W. H. Clark Jr., A. Fischer, P. J. W. Olive, and D. F. Went, eds. Elsevier, Amsterdam 3: 459-472.
- Clark, W. H. Jr., Kleve, M. G. and Yudin, A. I. 1981. An acrosome reaction in natantian shrimp. J Exp. Zool. 218: 279-291.
- Clark, W. H. Jr., Lynn, J. W., Yudin, A. I. and Persyn, H. O. 1980. Morphology of the cortical reaction in the eggs of *Penaeus aztecus*. Biol. Bull. 158: 175-186.
- Clark, W. H. Jr. Talbot, P., Neal, R. A., Mock, C. R. and Salser, B. R. 1973. In vitro fertilization with non-motile spermatozoa of the brown shrimp, *Penaeus aztecus*. Marine Biology 22: 353-354.
- Colwin, A. L. and Colwin, L. H. 1963. Role of the gamete membrane in fertilization in *Saccoglossus kowalevskii* (Enteropneustra). I. The acrosome reaction and its changes in early stages of fertilization. J Cell Biol. 19: 477-500.
- De Kleijn, D.P.V., Coenen, T., Laverdure, A.M., Tensen, C.P. and Van Herp, F. 1992. Localization of messenger RNAs encoding crustacean hyperglycemic hormone and gonad inhibiting hormone in the X-organ sinus gland complex of the lobster *Homarus americanus*. Neuroscience 51, 121-128.
- Gomes, L. A. O. and Honculada-Primavera, J. 1993. Reproductive quality of male *Penaeus monodon*. Aquaculture 112: 157-164.
- Gomez, R. 1965. Acceleration of development of gonads by implantation of brain in the crab, *Paratelphusa hydrodromous*. Naturwissenschaften. 52: 216.

- Griffin, F. J. and Clark, W. H. Jr. 1990. Induction of acrosomal filament formation in the sperm of *Sicyonia ingentis*. *J Exp Zool.* 254: 296-304.
- Griffin, F. J. Shigekawa, K. and Kleve, M. G. 1988. Formation and structure of the acrosomal filament in the sperm of *Sicyonia ingentis*. *J Exp Zool.* 246: 94-102.
- Hall, R. M., Young, N. and Kenway, M. n.d. Manual for the determination of egg fertility in *Penaeus monodon*. Australian Institute of Marine Science.
<http://data.aims.gov.au/extpubs/attachmentDownload?docID=2174> (accessed June 6, 2005).
- Harrison, K. E. 1990. The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. *J. Shellfish Res.* 9: 1-28.
- Kalavathy, Y., Mamatha, P. and Reddy, P. S. 1999. Methyl farnesoate stimulates testicular growth in the fresh water crab *Oziotelphusa senex senex* fabricius. *Naturwissenschaften* 86: 394-395.
- Khalaila, I., Katz, T., Abdu, U., Yehezkel, G., Sagi, A. 2001. Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *Gen Comp Endocrinol* 121: 242-249.
- Kleve, M. G., Yudin, A. I. and Clark, W. H. 1980. Fine structure of the unistellate sperm of the shrimp, *Sicyonia ingentis* (Natatia). *Tissue & Cell.* 12: 29-45.
- Langreth, S. G. 1969. Spermiogenesis in *Cancer* crabs. *J. Cell Biol.* 43: 573-603.
- Laufer, H., Takac, P., AHL, J. S. B. and Laufer, M. R. 1997. Methyl farnesoate and the effect of eyestalk ablation on the morphogenesis of the juvenile female spider crab, *Libinia emarginata*. *Invet. Reprod. Dev.* 31: 63-68.
- Laufer, H., Sagi, A., AHL, J. S. B. and Homala, E. 1992. Methyl farnesoate appears to be a crustacean reproductive hormone. *Invert. Reprod. Dev.* 22 : 17-20.
- Laufer, H., Landau, M., Homala, E. and Borst, D. W. 1987b. Methyl farnesoate: its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. *Insect Biochem.* 17: 1129-1131.

- Laufer, H., Borst, D. W., Baker, F. C., Carrasco, M., Sinkus, M., Reuter, C. C., Tsai, L. W. and Schooley, D. A. 1987. Identification of a juvenile hormone-like compound in crustacean. *Science* 235: 202-205.
- Leung-Trujillo, J.R. and Lawrence, A.L. 1987. Observation on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory condition. *Aquaculture* 65: 363-370.
- Lu, C. S. 1976. Studies of the testicular tissue and spermatogenesis in the brown shrimp *Penaeus aztecus* (decapod) Ph.D. Dissertation in biology. Univ. Houston, Texas. 170 p.
- Lui, L. and Laufer, H. 1996. Isolation and characterization of sinus gland neuropeptides with both mandibular organ inhibiting and hyperglycemic effects from the spider crab, *Libinia emarginata*. *Arch Insect Biochem Physiol.* 32: 375-385.
- Lynn, J. W. and Clark, W. H. Jr. 1987. The fine structure of the mature sperm of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol. Bull.* 164: 459-470.
- Medina, A., Mourente, G., Lopez de la Rosa, I., Santos, A. and Rodriguez, A. 1994. Spermatozoal ultrastructure of *Penaeus kerathurus* and *Penaeus japonicus* (Crustacea, Dendrobranchiata). *Zoomorphology* 114: 161-167.
- Meunpol, O., Meejing, P. and Piyatiratitivorakul. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. *Aquaculture* 36: 1216-1225.
- Nagamine, C., Knight, A.W., Maggenti, A., Paxman, G. 1980. Effects of androgenic gland ablation on male primary and secondary sexual characteristics in the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapod, Palaemonidae) with first evidence of induced feminization in a nonhermaphroditic decapods. *Gen Comp Endocrinol* 41: 423-441.
- Nagamine, C., Knight, A.W. 1987. Masculinization of female crayfish, *Porcambarus clarkii* (Girard). *Int J Vertebr Reprod Dev* 11: 77-86.
- Nagaraju, G. P. C., Suraj, N. J. and Reddy, P. S. 2004. Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 76: 1171-1178.
- Okumura, T. 2004. Review: Perspectives on Hormonal Manipulation of shrimp Reproduction. *JARQ* 38: 49-54.

- Okumura, T. and Hara, M. 2004. Androgenic gland cell structure and spermatogenesis during the molt cycle and correlation to morphotypic differentiation in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Zool Sci* 21: 621-628.
- Okumura, T., Han, C. H., Suzuki, Y., Aida, K., and Hanyu, I. 1992. Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponense*. *Biol. Sci.* 9: 37-45.
- Oliver, J. H. Jr. and Dotson, E.M. 1993. Hormonal control of molting and reproduction in ticks. *American Zoologist* 33(3): 384-396.
- Otsu, T. 1963. Biochemical control of sexual cycle in the freshwater crab, *Potamon dehaani*. *Embryologia*. 8: 1-20.
- Parnes, S., Raviv, S., Shechter, A., Sagi, A. 2006. Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores timed by the molt cycle, in the marine shrimp. *J Exp Biol* 209: 4974-4983.
- Parnes, S., Mills, E., Segall, C., Raviv, S., Davis, C. and Sagi, A. 2004. Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. *Aquaculture* 236: 593-606.
- Pascual, C., Valera, E., Re-Regis, C., Gaxiola, G., Sanchez, A., Ramos, L., Soto, L.A. and Rosas, C. 1998. Effect of water temperature on reproductive tract condition of *Penaeus setiferus* adult males. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 477-484.
- Perez-Velazquez, M., Lawrence, A. L., Gatlin, D. M., Gonzalez-Felix, M. L. and Bray, W. 2002. Replacement of fresh dietary components by a dry feed for successful maturation of male *Litopenaeus vannamei* (Boone) broodstock. *Aquaculture* 33: 1091-1095.
- Perez-Velazquez, M., Bray, W. M., Lawrence, A. L., Gatlin, D. M. and Gonzalez-Felix, M. L. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture* 198: 209-218.
- Pongtippatee, P., Vanichviriyakit, R., Chavadej, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P. and Withyachumnarnkul, B. 2007. Acrosome reaction in the sperm of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda, Crustacea). *Aquaculture* 38: 1635-1644.

- Pongtippatee-Taweepreda, P. 2003. Natural fertilization of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Ph.D. Dissertation in Anatomy. Faculty of Graduate Studies, Mahidol University. 321 p.
- Pratoomchat, B., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1993. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. J. World Aquacult. Soc. 24: 179-189.
- Promwikorn, W., Kirirat, P., Intasaro, P. and Withyachumnarnkul, B. 2007. Changes in integument histology and protein expression related to the molting cycle of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol, Part B 148: 20–31.
- Promwikorn, W., Kirirat, P. and Thaweethamseewee, P. 2004. Index of molt staging in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J. Sci. Technol. 26: 765-772.
- Reddy, P. S. and Ramamurthi, R. 1998. Methyl farnesoate stimulates ovarian maturation in the freshwater crab, *Oziotelphusa senex senex* Fabricius. Current Sci. 74: 68-70.
- Soroka, Y., Milner, Y., Laufer, H. and Sagi, A. 1993. Protein synthesis in the ovary of *Macrobrachium rosenbergii* during the reproductive cycle: effects of methyl farnesoate (MF). American Zool. 13: 123A.
- Strauch, A. R., Luna, E. J. and Lafountain, J. R. 1980. Biochemical Analysis of Actin in Crane-fly Gonial Cells : Evidence for Actin in Spermatocytes and Spermatids-but Not Sperm. . J. Cell Biol. 86: 315-325.
- Sudha, K. and Anilkumar, G. 1996. Seasonal growth and reproduction in a highly fecund crab, *Metopograpsus messor* (Forsk.) (Grapsidae). Hydrobiologia 319: 15-21.
- Suganthi, A. S. and Anilkumar, G. 1999. Moulting-related fluctuation in ecdysteroid titre spermatogenesis in the crab, *Metopograpsus messor* (Brachyura: Decapoda). Zoological Studies. 38(3): 314-321.
- Talbot, P., Howard, D., Leung-Trujillo, J. R., Lee, T. W., Li, W. Y., Ro, H. and Lawrence, A. L. 1989. Characterization of male reproductive tract degenerative syndrome in captive penaeid shrimp (*Penaeus setiferus*). Aquaculture. 78: 365-377.
- Tamone, S. P., Prestwich, G. D. and Chang, E. S. 1997. Identification and characterization of methyl farnesoate binding proteins from the crab, *Cancer magister*. Gen. Comp. Endocrinol. 105: 168-175.

- Treerattrakool, S., Panyim, S., Ming Chan, S., Withyachumnarnkul, B. and Udomkit, A. 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *J. Biochem. Mol. Biol.* 39: 371-276.
- Tsukimura, B. and Borst, D. W. 1992. Regulation of methyl farnesoate in the hemolymph and mandibular organ of the lobster, *Homarus americanus*. *Gen. comp. Endocrinol.* 86: 297-303.
- Tsukimura, B., Martin, M., Frinsko, M. and Borst, D. W. 1989. Measurement of methyl farnesoate (MF) levels in crustacean hemolymph. *American Zool.* 29: 49A.
- Vanichviriyakit, R. 2007. Development of Male Germ Cells, Sperm Modifications, and Sperm Capacitation in Black Tiger Shrimp, *Penaeus monodon*. Ph.D. Dissertation in Anatomy. Faculty of Graduate Studies, Mahidol University. 212 p.
- Wainwright, G., Webster, S. G., Wilkinson, M. C., Chung, J. S. and Rees, H. H. 1996. Structure and significance of mandibular organ-inhibiting hormone in the crab, *Cancer pagurus*. *J. Biol. Chem.* 271: 12749-12754.
- Wessenberg, T. J. and Hill, B. J. 1984. Molting behavior of the tiger prawn *Penaeus esculentus* Haswell. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.* 35: 567-571.
- Yudin, A. I., Diener R. A., Clark, W. H. and Chang, E. S. 1980. Mandibular gland of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol. Bull., Woods Hole.* 159: 760-772.
- Zhang, W. Y., Zhu, X. X. and Oliver, J. H. Jr. 1995. Ecdysteroids and spermatogenesis in the 4th instar nymph of the tick *Ornithodoros parkeri*. *J. Invert. Rep. Dev.* 27: 1-9.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การศึกษา Total sperm count อัตราร้อยละของ abnormal sperm และ acrosome reaction

1.1 การเตรียม Ca^{2+} free seawater

ตารางที่ 1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Ca^{2+} free seawater

สารเคมี	ปริมาณที่ใช้ (กรัม)
NaCl	21.63
KCl	1.12
H_3BO_3	0.53
NaOH	0.19
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.93

ซึ่งสารเคมีดังตารางที่ 1 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH 7.4 ด้วย HCl

1.2 การเตรียม Eggs water

ทำได้โดยแยกแม่พันธุ์กุ้งที่พร้อมวางไข่ เมื่อถึงเวลาแม่กุ้งไข่ นำแม่กุ้งขึ้นมาไข่ในน้ำทะเลปริมาตร 500 mL อุณหภูมิ 4 °C ที่เตรียมไว้ใน beaker รอให้แม่พันธุ์กุ้งไข่จนหมด รอให้ไข่กุ้งตกตะกอน เก็บส่วน supernatant นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 g นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บส่วน supernatant เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธีการของ Bradford นำค่าโปรตีนที่วัดได้มาเจือจางหรือปรับปริมาณโปรตีนใน eggs water มีค่าโปรตีน 16 ug/mL เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีนใน eggs water ที่มีปริมาณน้อยที่สุดที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์อสุจิเกิด acrosome reaction เกือบร้อยเปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตามวิธีของ Bancroft (1967) และ Humason (1972)

สารเคมี

1. Davidson's fixative (Bell & Lightner, 1988) 1000 mL

95% ethyl alcohol	330	mL
100% formalin (formaldehyde 37–39%)	220	mL
glacial acetic acid	115	mL
tap water	335	mL
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

2. สีย้อม haematoxylin เตรียมโดยใช้

haematoxylin crystal	4	g
sodium iodate	0.8	g
potassium aluminium sulfate	100	g
citric acid	4	g
chloral hydrate	200	g
น้ำกลั่น	2,000	mL

ละลาย potassium aluminium sulfate ลงในน้ำกลั่น haematoxylin crystal ผสมจนละลายหมดจึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรด citric acid และ chloral hydrate ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อม eosin เตรียมโดยใช้

eosin Y.Cl 45380	1	g
70% ethanol	1,000	mL
conc. Acetic acid	5	mL
ผสมเข้าด้วยกัน		

การเตรียมตัวอย่าง

นำ testis, vas deferens และ spermatophore มาดองใน Davidson's fixative ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็น ethanol 50% เปรอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอน dehydration และ embedding

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding (Humason, 1979)

1. ตบแต่ง (trim) ตัวอย่างที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed
2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50% ethanol	1
2	70% ethanol	1
3	70% ethanol	1
4	95% ethanol	1
5	95% ethanol	1
6	absolute ethanol	1
7	isopropyl alcohol	1
8	isopropyl alcohol	1
9	xylene	1
10	xylene	1
11	paraplast	1
12	paraplast	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน dehydration ไป embed ด้วย paraplast โดยใส่ใน mold และประกบด้วย embedding ring จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section
4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาด slide และ cover glass จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3- 5 μL นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45- 50 $^{\circ}\text{C}$
5. ใช้แผ่น slide ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 คืน

6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านขบวนการย้อมสี haematoxylin & eosin (H&E) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	2
2	xylene	2
3	xylene	2
4	isopropyl alcohol	1
5	isopropyl alcohol	1
6	95% ethanol	1
7	70% ethanol	1
8	50% ethanol	1
9	น้ำกลั่น	1
10	haematoxylin	20
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	50% ethanol	2
14	eosin	4
15	70% ethanol	2
16	95% ethanol	2
17	absolute ethanol	2
18	isopropyl alcohol	2
19	isopropyl alcohol	2
20	xylene	2
21	xylene	2
22	xylene	2

7. mount slide ด้วยน้ำยา permount ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การศึกษา protein profile ด้วยวิธี SDS PAGE

สารเคมี

1. 4X Resolving gel buffer (1.5 M Tris-Cl, pH 8.8, 200 ml)

Tris (FW 121.1) 1.5 M	36.3 g
ddH ₂ O	150 ml
HCl to pH 8.8	
ddH ₂ O to	200 ml

Store up to 3 month at 4 °C.

2. 4X Stacking gel buffer Final concentration Amount (0.5 M Tris-Cl, pH 6.8, 50 ml)

Tris (FW 121.1) 0.5 M	3.0 g
ddH ₂ O	40 ml
HCl to pH 6.8	
ddH ₂ O to	50 ml

Store up to 3 month at 4 °C

3. 10% SDS

SDS (FW 288.38) 10%	10 g
ddH ₂ O to	100 ml

Store up to 6 month at room temperature.

4. 10% Ammonium persulphate (initiator)

Ammonium persulphate (FW 228.2) 10%	0.1 g
ddH ₂ O to	1.0 ml

Prepare just prior to use; do not store.

5. 2X Treatment buffer (2X LB) (0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glycerol, 0.2 M

DTT, 0.02% bromophenol blue, pH 6.8, 10 ml)

4X stacking gel buffer 0.125 M	2.5 ml
10% SDS 4%	4.0 ml
Glycerol 20%	2.0 ml
Bromophenol blue 0.02%	2.0 mg
Dithiothreitol (DTT; FW 154.2) 0.2 M	0.31 g

ddH₂O to 10.0 ml

Store in 0.5 ml aliquots at -20 °C for up to 6 month

6. 10X Tank buffer (0.025 M Tris, 0.192 M glycine, 0.1% SDS, pH 8.3, 1 L)

Tris (FW 121.1) 0.025 M 30.28 g

Glycine (FW 75.07) 0.192 M 144.13 g

SDS 0.1% 10 g

ddH₂O to 1 L

Store at room temperature for up to 1 month.

Final gel concentration

	5%	7.5%	10%	12.5%	15%
Acrylamide solution	1.67 ml	2.5 ml	3.3 ml	4.2 ml	5.0 ml
4' Resolving gel buffer	2.50 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
ddH₂O	5.7 ml	4.9 ml	4.0 ml	3.2 ml	2.4 ml
Ammonium persulphate*	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED*	3.3 µl	3.3 µl	3.3 µl	3.3 µl	3.3 µl

*Added after deaeration (step 8).

Stacking gel solutions (for two gels)

Gel thickness:	0.75 mm	(10ml)	1.5 mm
Acrylamide solution	0.44 ml	1.33 ml	0.88 ml
4' Stacking gel buffer	0.83 ml	2.5 ml	1.66 ml
10% SDS	33 µl	0.1 ml	66 µl
ddH₂O	2.03 ml	6.0 ml	4.06 ml
Ammonium persulphate*	16.7 µl	50 µl	33.4 µl
TEMED*	1.7 µl	5 µl	3.3 µl

*Added after deaeratio

การเตรียมสีย้อมเจลโปรตีน

1. Coomassie Blue staining solution

(0.1% Coomassie Brilliant Blue R250, 40% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, 2 L)

Coomassie Brilliant Blue R250 0.1%	2 g
Methanol 40%	800 ml

Stir until dissolved. Filter. Then add:

Acetic acid 10 %	200 ml
ddH ₂ O to	2 L

Store at room temperature for up to 6 month

2. Destain solution I (40% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, 1 L)

Methanol 40%	400 ml
Acetic acid 10%	100 ml
ddH ₂ O to	1 L

Store at room temperature.

3. Destain solution II (5% (v/v) methanol, 10% (v/v) acetic acid, 2 L)

Methanol 5%	100 ml
Acetic acid 10%	200 ml
ddH ₂ O to	2 L

Store at room temperature.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวจุฑาทิพย์ พร้อมมูล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4910620081

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วาริชศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2545

ทุนการศึกษา

ทุนอุดหนุนการวิจัยของบัณฑิตวิทยาลัย จำนวน 23,000 บาท

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 1

สถานที่ทำงาน ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง 333 ม. 5 ต. พุมเรียง อ. ไชยา

จ. สุราษฎร์ธานี 84110