ร่างรายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน

ทุนงานมูลฐาน (Fundamental Fund : FF)

ประจำปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ SCI6405032a

ชื่อชุดโครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ชื่อโครงการเดี่ยว การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย

คณะนักวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

สารบัญ

เรื่อง	**หน้า**
รายการตาราง	1
รายการภาพประกอบ	2
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์	6
บทตรวจเอกสาร	7
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป	32
ภาคผนวก	33

เอกสารฉบับนี้ได้รับการดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID:5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ 13

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการภาพประกอบ

ภาพที่ **หน้า**

รูปที่ 1 ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย *Fenneropenaeus merguiensis* **7**

รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย 9

รูปที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งตัวรับภายหลังการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยเป็นเวลา 16 วัน 17

รูปที่ 4 ความจำเพาะของยีนต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย 18

รูปที่ 5 *In situ* hybridization ของยีน *DMC1* และ *NASP* ใน testis ของกุ้งแชบ๊วย 19

รูปที่ 6 *In situ* hybridization ของยีน *Cyclin B* ใน testis ของกุ้งแชบ๊วย 20

รูปที่ 7 *In situ* hybridization ของยีน *NASP* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย 21

รูปที่ 8 *In situ* hybridization ของยีน *Nanos* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย 22

รูปที่ 9 *In situ* hybridization ของยีน *Cyclin B* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย 23

รูปที่ 10 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 1 เดือน ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซ้นต์ 25

รูปที่ 11 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 2 เดือน ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซ้นต์ 26

รูปที่ 12 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 4 เดือน ด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซ้นต์ 27

รูปที่ 13 ผลการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือน ด้วยเทคนิค RT-PCR 28

รูปที่ 14 ผลการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 เดือน ด้วยเทคนิค RT-PCR 29

รูปที่ 15 ผลการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 เดือน ด้วยเทคนิค RT-PCR 29

เอกสารฉบับนี้ถูกป้องกันลิขสิทธิ์ตามพระราชบัญญัติลิขสิทธิ์ พ.ศ. 2537 มาตรา 19 วรรค 6/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร (NRRR)
ผู้ที่ระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และ Japan Science and Technology Agency/Japan International Cooperation Agency, Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development ภายใต้โครงการ Utilization of Thailand Local Genetic Resources to Develop Novel Farmed Fish for Global Market (Thai Fish Project) ที่สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ Prof. Dr. Ikuo Hirono แห่งมหาวิทยาลัย Tokyo University of Marine Science and Technology สำหรับข้อมูล transcriptome ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากในงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ หัวหน้าโครงการชุด การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สำหรับการบริหารจัดการโครงการและคำแนะนำต่าง ๆ ในงานวิจัย

กราบขอบพระคุณสถานวิจัยจีโนมและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่คอยสนับสนุนเรื่องเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย ตลอดจนอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยจนกระทั่งงานสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

และที่สำคัญยิ่งของกราบขอบพระคุณ Prof. Dr. Goro Yoshizaki แห่งมหาวิทยาลัย Tokyo University of Marine Science and Technology และ Dr. Tomoyuki Okutsu แห่ง Japan International Research Center for Agricultural Sciences ประเทศญี่ปุ่นที่ถ่ายทอดเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ให้แก่คณะผู้วิจัย และยังคอยเป็นที่ปรึกษา ให้คำแนะนำตลอดการทำวิจัย รวมถึงช่วยให้คำปรึกษาและตรวจทานนิพนธ์ต้นฉบับอีกด้วย

คณะผู้วิจัย

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/08/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5928018
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อ

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่มีมูลค่าสูง มีความสำคัญทางเศรษฐกิจกับประเทศไทย แต่ยังคงประสบปัญหาในการเพาะพันธุ์ ดังนั้นกุ้งแชบ๊วยที่อยู่ในท้องตลาดส่วนใหญ่มาจากการจับจากธรรมชาติ ซึ่งส่งผลให้กุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นงานวิจัยฉบับนี้จึงมุ่งเน้นไปยังการพัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยโดยใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ซึ่งไม่เคยรายงานศึกษาเทคโนโลยีนี้ในกุ้งมาก่อน คณะผู้วิจัยได้ทำการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของกุ้งขาวสูงกว่ากุ้งกุลาดำ โดยกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 91.4 และ 80 ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้กุ้งขาวเป็นกุ้งตัวรับในการทำการทดลองต่อไป ทำการย้อม testis ของกุ้งแชบ๊วยด้วยสี PKH26 ซึ่งเป็นสารที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์สีแดงได้และทำการปลูกถ่าย testis นี้ไปยังกุ้งขาวตัวรับ เมื่อทำการปลูกถ่าย testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกุ้งขาวเป็นระยะเวลา 1 2 และ 4 เดือน ได้ทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งขาวตัวรับมาตรวจสอบผลการปลูกถ่ายด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซ้นต์และการใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะกับการแสดงออกของเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งผลการทดลองพบว่าชิ้น testis ที่ได้รับการปลูกถ่ายไปยังกุ้งขาวบางตัวยังคงเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 เดือน รวมถึงยังมีการแสดงออกของยีน *DMC1* ซึ่งใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจสอบเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อ testis ที่ปลูกถ่ายเข้าไปยังคงมีชีวิตอยู่แม้ผ่านการปลูกถ่ายไปแล้วเป็นระยะเวลา 4 เดือนก็ตาม ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเทคโนโลยีนี้มาพัฒนาต่อเพื่อให้สามารถใช้ในการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยได้ในอนาคต นอกจากนี้งานวิจัยฉบับนี้ยังได้ทำการหายีนที่จำเพาะกับการแสดงออกของระบบสืบพันธุ์ในกุ้งแชบ๊วยเพื่อใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจสอบเซลล์ในระบบสืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยอีกด้วย

Abstract

Banana prawn (*Fenneropenaeus merguiensis*) is a valuable prawn in the Thailand market. However, cultivation of this species is limited owing to difficulty in culture management and limited knowledge of reproduction. Therefore, this study aims to develop the cultivation of this prawn using testis grafting technique. Testes of banana prawn were grafted into white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Results showed that the survival rates after grafting of white shrimp and black tiger shrimp were 91.4% and 80%, respectively. Thus, we used the white shrimp as a recipient for further experiments. The testes of banana prawn were stained with PKH26 red fluorescent dye for tracking. After that, the stained testes were grafted in to muscle of white shrimps. The white shrimp recipients were collected after 1, 2 and 4 months after grafting. The recipients were observed under a chemiluminescence and fluorescent stereomicroscope. Some of grafted testes still showed the red fluorescent after 4 months post grafting. Moreover, the grafted testes expressed the DMC1 which is the germ cell marker gene during spermatogenesis. These results reveal that the grafted testes still alive after 4 months post grafting. Therefore, there is possibility to apply this technique in shrimp in the future. In addition, this study reported the genes which could be used as germ cell molecular marker for banana prawn as well.

เอกสารนี้ เป็นวิทยานิพนธ์ฉบับที่ 29/06/2021
โดย ธนิดา ศรีพันธ์ ID 6388038
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUNRU)

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทยเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำรายได้เข้าสู่ประเทศปีละหลายหมื่นล้านบาท ประกอบกับความนิยมบริโภคกุ้งที่มีมากเช่นกัน ส่งผลให้กุ้งทะเลมีราคาสูง ในจำนวนกุ้งทะเลหลายชนิด กุ้งแชบ๊วย *(Fenneropenaeus merguiensis)* เป็นกุ้งทะเลชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจจากเกษตรกรเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ โตเร็ว มีราคาสูง เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและต่างประเทศ แต่มักจะไม่นิยมเลี้ยง เนื่องจากประสบปัญหาต่าง ๆ เช่น กุ้งแชบ๊วยไม่ทนทานต่อสภาวะน้ำเสีย ต้องการการดูแลค่อนข้างมาก เป็นกุ้งทะเลที่สามารถจับได้ในธรรมชาติ จึงส่งผลให้ทรัพยากรกุ้งแชบ๊วยในทะเลมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว และที่สำคัญยังขาดแคลนพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่มีคุณภาพในการขยายพันธุ์ เนื่องจากกุ้งแชบ๊วยที่เพาะเลี้ยงในบ่อไม่สามารถชักนำให้กุ้งแม่พันธุ์สร้างไข่ได้ ซึ่งลูกพันธุ์ยังคงต้องอาศัยแม่พันธุ์ธรรมชาติมาทำการผลิต (ชัยรัตน์ และสุพจน์, 2545) ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคในการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจะเป็นการส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งทะเลของประเทศไทย นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยรักษาทรัพยากรทางธรรมชาติไว้ได้อีกด้วย

เทคโนโลยีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ในปลาเป็นอีกหนึ่งเทคโนโลยีที่ได้รับความสนใจในการศึกษาเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถร่นระยะเวลาในการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของปลาได้ ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากกับปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันมีรายงานการประสบความสำเร็จในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของปลา rainbow trout แบบ auto-grafting ซึ่งเซลล์ในชิ้น testis ที่ได้รับการปลูกถ่ายสามารถพัฒนาไปเป็นสเปิร์มที่สามารถผสมพันธุ์กับไข่จนกระทั่งได้ลูกปลาออกมาได้ (Nagler et. al., 2001; Hayashi et. al., 2007) ซึ่งสามารถลดระยะเวลาการผลิตสเปิร์มของปลา rainbow trout ได้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้เนื้อเยื่อ testis ของปลา rainbow trout ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลวก็สามารถนำมาใช้ในการปลูกถ่ายแบบ auto-grafting ได้เช่นกัน (Cloud 2003; Hayashi et. al., 2007) อย่างไรก็ตามการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ในปลาแบบ allogeneic-grafting ยังคงไม่ประสบความสำเร็จมากนักเนื่องจากมีอุปสรรคเรื่องระบบภูมิคุ้มกันของปลาตัวรับที่ปฏิเสธเนื้อเยื่อที่ได้ทำการปลูกถ่ายเข้าไป (Hayashi et. al., 2007) ซึ่งต้องอาศัยสารที่ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันในความเข้มข้นต่ำ ๆ เข้ามาร่วมด้วยเพื่อให้การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อประสบความสำเร็จ (Yoshinaga et. al., 2021)

เทคโนโลยีการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ในกุ้งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งเป็นระบบแบบเฉื่อย (innate immune) ซึ่งอาจจะเป็นผลดีในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายในการทดสอบว่ามีความเป็นไปได้มากน้อยเพียงใดในการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้ในกุ้ง โดยมุ่งเน้นไปที่กุ้งแชบ๊วยเนื่องจากเป็นกุ้งที่มีมูลค่าสูง มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่การเพาะพันธุ์ยังประสบปัญหาอยู่มาก หากเทคโนโลยีนี้สามารถนำมาใช้ในกุ้งได้จะเป็นการพัฒนาเทคนิคในการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยให้กับประเทศได้

เอกสารวิจัยนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญาของ
โดย ธนกต ศุภพิทักษ์ ID 3960538 เมื่อวันที่ 19/06/2024
ภาควิชาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (THAILAND)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย (testis grafting)

2. เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่จำเพาะต่อเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วย เพื่อใช้ตรวจสอบผลการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งแชบ๊วย

1.1 การศึกษาทางชาติพันธุ์วิทยา *(Fenneropenaeus merguiensis)*

การศึกษาทางชาติพันธุ์วิทยา มีการจัดอนุกรมวิธานของกุ้งสายพันธ์นี้ ดังนี้

Kingdom: Animalia animals

Phylum: Arthropoda

Class: Malacostraca

Order: Decapoda

Family: Penaeidae

Genus: Fenneropenaeus

Species: *Fenneropenaeus merguiensis*

1.2 ลักษณะทั่วไปของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วยมีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Fenneropenaeus merguiensis* ลักษณะลำตัวเรียวยาว ฐานของกรียกตัวสูงขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยม มีฟันหยักทางด้านบน 7-8 ซี่ และด้านล่าง 4-5 ซี่ สันและร่องข้างกรียาวไม่ถึงฟันกรีที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร ทั้งกุ้งเพศผู้และเพศเมียมี dactylus ยาวประมาณ 0.5-0.6 เท่าของ propodus แต่กุ้งตัวผู้จะมีกลุ่มขนบริเวณโคน dactylus หนวดที่ 2 มีสีน้ำตาลแดงไม่มีลาย ขาเดินและระยางค์ว่ายน้ำ มีสีเหลืองออกน้ำตาล แพนหางและรยางค์ว่ายน้ำมีสีแดง (มหาวิทยาลัยบูรพา, 2544)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 1 ลักษณะทางชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย *Fenneropenaeus merguiensis*

1.3 ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย

1.3.1 วงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย

การเจริญเติบโตและการพัฒนาของลูกกุ้งแชบ๊วยตั้งแต่แม่กุ้งวางไข่จนถึงระยะ first Postlarva ใช้ระยะเวลาประมาณ 10 วัน ประกอบด้วย 4 ระยะคือ Nauplius Protozoea Mysis และ Postlarzva จากภาพที่ 2 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย โดยกุ้งระยะ Postlarzva จะย้ายมาอาศัยบริเวณพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 1-2 เดือน จนถึงระยะวัยรุ่นอายุประมาณ 2-3 เดือน จะเคลื่อนย้ายออกสู่ชายฝั่งน้ำตื้นจนถึงวัยเจริญพันธุ์ (Subadult) อายุประมาณ 3-4 เดือน จึงย้ายออกสู่ทะเลเปิด และแพร่ขยายพันธุ์ต่อไป (มัทนา บุญยุบล, 2539)

1.3.2 การสืบพันธุ์และการวางไข่ของกุ้งแชบ๊วย

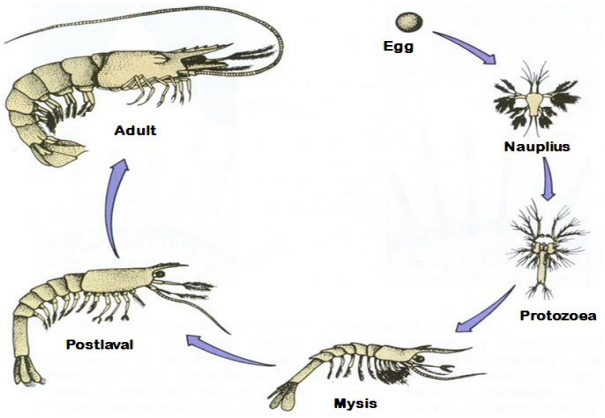
กุ้งเพศผู้มีอวัยวะเพศเรียกว่า petasma ดัดแปลงมาจากแขนงอันในของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 1 ส่วนอวัยวะเพศของกุ้งเพศเมียเรียกว่า thelycum พัฒนามาจาก sternalplate เมื่อกุ้งเพศผู้และเพศเมียพร้อมที่จะผสมพันธุ์กัน ซึ่งหลังจากที่ตัวเมียลอกคราบแล้วประมาณ 3-6 ชั่วโมง จากนั้นกุ้งตัวผู้และตัวเมียจะเกี้ยวพาราสีกัน โดยตัวผู้จะใช้ก้ามคู่ที่ 2 กอดรัดตัวเมียไว้ และพยายามทำความสะอาดบริเวณด้านท้องของตัวเมียและจับหงายขึ้น พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อซึ่งลักษณะของน้ำเชื้อที่ตัวผู้ปล่อยนี้จะมีลักษณะเป็นสารข้นเหนียว (gelatinous mass) ไปเก็บไว้ที่ถุงเก็บน้ำเชื้อด้าน thelycum ในตัวของเพศเมีย และรอการวางไข่ต่อไป โดยไข่จะปล่อยออกทางช่องท้องเปิดโคนขาคู่ที่ 3 ในขณะเดียวกันน้ำเชื้อที่จากถุงเก็บน้ำเชื้อตัวเมียก็จะไหลมาผสมกับไข่ในน้ำ ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะใช้ระยะเวลาประมาณ 12-14 ชั่วโมง จึงจะฟักออกมาเป็นตัว

จากการศึกษาของ มาโนช รุ่งราตรี และ วันชัย ไล้ทิม (2535) พบว่ากุ้งแชบ๊วยบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกมีการวางไข่ตลอดทั้งปี โดยมีการระยะการวางไข่สูงสุด 2 ช่วง คือ มิถุนายนถึงกันยายนและ ธันวาคมถึงมกราคม กุ้งแชบ๊วยที่อาศัยอยู่นอกชายฝั่งความลึกตั้งแต่ 16 เมตรขึ้นไป เป็นกุ้งที่สมบูรณ์เพศแล้ว ส่วนกุ้งที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งส่วนใหญ่เป็นกุ้งระยะวัยรุ่น

จากการศึกษาฤดูการวางไข่ของกุ้งแชบ๊วยในบริเวณทะเลสาบสงขลา โดยนิเวศน์ เรืองพานิช, คณิต ไชยาคำ และ ประวิทย์ อินทรโชติ (2517) พบว่า กุ้งแชบ๊วยมีไข่ตลอดปี ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคมมีไข่แก่มากที่สุด และกุ้งที่มีไข่แก่รองลงมาระหว่างเดือนกันยายนถึงตุลาคม ดั้งนั้นฤดูกาลวางไข่ของกุ้งแชบ๊วยคือเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม

จากการศึกษาของสุชาติ สว่างอารีย์รักษ์ เพ็ญศรี บุญเรืองและ ค้อดีเยาะ พรชัย (2542) พบว่าการเคลื่อนย้ายของกุ้งขนาดใหญ่ระยะต่าง ๆ มีตลอดปี โดยปริมาณน้ำฝนจะเป็นปัจจัยสำคัญต่อขนาดการเคลื่อนย้ายของกุ้ง จากการศึกษากุ้งแชบ๊วยบริเวณคลองกระเปอร์พบว่ากุ้งแชบ๊วยในบริเวณนี้มีฤดูการวางไข่ 2 ช่วง คือ ช่วงมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม) และช่วงมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (เดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม)

เอกสารนี้เป็นทรัพย์สินทางปัญญา ลิขสิทธิ์ ๒๕๖๗/06/2024
โดย ธนดา ศรีเพชร 0598063838 (TNRB)
การนำไปใช้ต้องได้รับอนุญาตเท่านั้น



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย

ที่มา http://aqua.c1ub.net/forum/index.php?topic=49116.0

2. การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonad (gonad grafting) ในปลา

เนื่องจากยังไม่เคยมีการรายงานการศึกษาการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonad ในกุ้งมาก่อน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการค้นคว้าข้อมูลการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อในปลาแทน

การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonad ในปลามักมีจุดประสงค์หลักในการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลาสายพันธุ์ที่เพาะพันธุ์ยาก มีการเจริญเติบโตช้า มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และเนื่องจากว่ามีความสำคัญทางเศรษฐกิจแต่การเพาะพันธุ์ยังมีความยากลำบาก จึงส่งผลให้ปลาในธรรมชาติมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว อาทิเช่น ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), ปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) และปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) เป็นต้น โดยปลาเหล่านี้ใช้เวลาอย่างน้อยสองปีกว่าจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์จึงใช้ระยะเวลานาน ในปัจจุบันนักวิจัยจึงหันมาศึกษาเทคโนโลยีที่จะทำให้ปลาเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้รวดเร็วขึ้น หนึ่งในเทคโนโลยีเหล่านั้นคือการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonad (gonad grafting)

การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonad ในปลา เริ่มต้นเมื่อปี 2001 โดย Nagler et. al., 2001 ได้ทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ข้างซ้ายของปลา rainbow trout เข้าสู่ปลาตัวเดียวกัน (Auto-grafting) โดยปลูกถ่ายไปยังบริเวณช่องท้องใกล้กับทางเดินอาหารของปลา (body cavity) หลังจากนั้น 4 สัปดาห์ ได้มีการฉีดฮอร์โมนที่สกัดได้จากต่อมใต้สมองของปลา salmon เพื่อเป็นการกระตุ้นการพัฒนาของ testis และได้ทำการตรวจสอบผลของการปลูกถ่ายเมื่อระยะเวลาผ่านไป 9 สัปดาห์ ซึ่งพบว่าเซลล์ใน testis ที่ปลูกถ่ายเข้าไปสามารถพัฒนาจนถึงระยะสเปิร์ม และสเปิร์มที่ได้ก็สามารถทำหน้าที่ได้ โดยเมื่อนำสเปิร์มผสมพันธุ์กับไข่ของปลา rainbow trout พบว่าสามารถให้ลูกปลา rainbow trout ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า testis ของปลา rainbow trout ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) และนำมาปลูกถ่ายเข้าสู่ปลา rainbow trout แบบ auto-grafting บริเวณช่องท้องของปลา ก็สามารถพัฒนาจนเข้าสู่ระยะที่สามารถผลิตสเปิร์มได้ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสงวนลิขสิทธิ์ของเจ้าของเอกสาร ลิขสิทธิ์ ID-3980538 (TNRR) ห้องสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ไฟล์ 19/06/2024

สเปิร์ม และเมื่อนำสเปิร์มผสมเทียมกับไข่ก็สามารถให้กำเนิดลูกปลา rainbow trout ได้เช่นกัน (Cloud 2003)

ต่อมาได้มีรายงานการปลูกถ่าย testis ของปลา rainbow trout เข้าใต้ผิวหนังบริเวณช่วงหลังของปลา rainbow trout ตัวเดียวกัน (Auto-grafting) พบว่าเซลล์ testis ที่ถูกปลูกถ่ายสามารถพัฒนาไปเป็นสเปิร์มที่ทำหน้าที่ได้เช่นกัน และเมื่อทำการปลูกถ่าย testis ของปลา rainbow trout ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งเข้ายังใต้ผิวหนังของปลา rainbow trout ตัวเดียวกัน ก็พบว่า testis สามารถผลิตสเปิร์มที่ทำหน้าที่ได้ปกติเช่นเดียวกัน (Hayashi et al., 2018) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการปลูกถ่ายชิ้น testis ไปยังปลาคนละตัว (Allogeneic-grafting) พบว่าเซลล์ใน testis ไม่สามารถพัฒนาไปจนถึงระยะสเปิร์มได้ สันนิษฐานว่าอาจจะเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันของปลาตัวรับที่ปฏิเสธการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อจากปลาที่ไม่ใช่ตัวเดียวกัน

ในปี 2021 ได้มีรายงานการใช้สารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาช่วย เพื่อยับยั้งการปฏิเสธเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายจากระบบภูมิคุ้มกันของปลาตัวรับ โดยนักวิจัยได้ให้สาร tacrolimus ซึ่งเป็นสารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน โดยได้ให้สารในสองความเข้มข้นได้แก่ 0.5 mg/kg และ 1.5 mg/kg เข้าสู่ปลา rainbow trout ตัวรับ และได้ทำการปลูกถ่าย testis ของปลา rainbow trout ไปยังปลา rainbow trout อีกตัว (Allogeneic-grafting) พบว่าเซลล์ใน testis ที่ปลูกถ่ายเข้าปลาตัวรับที่ได้รับสาร tacrolimus ความเข้มข้นต่ำ มีการพัฒนาของเซลล์เหมือนกับ testis ที่ได้รับการปลูกถ่ายแบบ auto-grafting ในขณะที่เซลล์ใน testis ที่ปลูกถ่ายเข้าปลาตัวรับที่ได้รับสาร tacrolimus ความเข้มข้นสูงไม่ค่อยมีการพัฒนา ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการที่จะปลูกถ่ายเซลล์แบบ Allogeneic-grafting โดยใช้สารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันร่วมด้วย (Yoshinaga et. al., 2021)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

วิธีการทดลอง

1. กุ้ง

กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) ได้รับจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตรัง จ. ตรัง กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้รับจากฟาร์มกุ้งในจังหวัดสงขลา กุ้งทั้งหมดถูกเลี้ยงในบ่อขนาดใหญ่ มีการให้อ็อกซิเจน และให้อาหารสำเร็จรูปจำนวนสองครั้งต่อวัน มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 20 ของน้ำที่ใช้เลี้ยงทุกวัน กุ้งถูกพักไว้ในบ่ออย่างน้อยสี่วันก่อนนำมาทำการทดลอง การทำการทดลองในงานวิจัยฉบับนี้ได้ผ่านการขออนุญาตจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของสถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัสโครงการ 2564-01-034 (Ref. 51/2021)

2. การเตรียมเนื้อเยื่อ testis

กุ้งแชบ๊วยเพศผู้จะถูกน็อคด้วยความเย็น ทำการผ่าตัดนำเนื้อเยื่อ testis ออกมา ชั่งและบันทึกน้ำหนัก testis จากนั้นทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ testis ให้มีขนาดประมาณ 0.5 – 0.8 เซนติเมตร แล้วแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 ทำการสุ่มเก็บชิ้นเนื้อเยื่อบางส่วนแช่ไว้ในน้ำยา Trizol เพื่อทำการสกัด RNA ต่อไป ส่วนชิ้นเนื้อเยื่อที่เหลือจะถูกนำไปย้อมด้วยสี PKH26 (Sigma) ซึ่งเป็นสีที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์ได้ โดยจะดำเนินการตามคู่มือของบริษัท โดยชิ้นเนื้อเยื่อ testis ถูกบ่มกับสารละลาย Dilute C ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นนำหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรมาใส่สี PKH26 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ Dilute C ปริมาตร 245 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปใส่หลอดที่มี Dilute C และชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างอยู่ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อไปยังอาหาร L-15 เพื่อทำการปลูกถ่ายไปยังกุ้งตัวรับต่อไป

3. การปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกุ้งตัวรับ

นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสี PKH26 มาปลูกถ่ายไปยังกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ โดยให้กุ้งตัวรับสลบด้วยการแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นให้เข็มจิ้มไปที่กล้ามเนื้อบริเวณข้อที่สองของกุ้งตัวรับให้เกิดเป็นรูช่องว่าง จากนั้นใช้ forceps คีบชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยปลูกถ่ายเข้าไปยังบริเวณรูที่เตรียมไว้ นำกุ้งใส่ในตู้ที่มีน้ำและอ็อกซิเจนเพื่อทำให้กุ้งฟื้นจากการสลบ และนำกุ้งไปเลี้ยงต่อไป

4. การหายีนที่จำเพาะกับเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วย (germ cell marker) เพื่อใช้ในการตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อ testis จากการปลูกถ่าย

4.1 การทดสอบความจำเพาะของการแสดงออกของยีนต่ออวัยวะต่าง ๆ (Tissue distribution)

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสงวนลิขสิทธิ์ของวิทยานิพนธ์ต้นฉบับ ID5338G38 ลิขสิทธิ์ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THARR)

นำข้อมูลยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้งมาจากคลังยีนที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากทีมวิจัยของ Prof. Dr. Ikuo Hirono จากมหาวิทยาลัย Tokyo University of Marine Science and Technology ซึ่งเป็นคลังยีนที่ได้มาจากข้อมูลการทำ transcriptome ของ gonad กุ้งแชบ๊วย โดยได้ทำการคัดเลือกยีนมาจำนวน 7 ยีน ได้แก่ *Cyclin A*, *Cyclin B*, *Cyclin E*, *NASP*, *MARF1*, *DMC1* และ *Nanos* จากนั้นออกแบบไพรเมอร์สำหรับการทำ RT-PCR เพื่อตรวจสอบดูว่ายีนทั้ง 7 มีการแสดงออกที่จำเพาะต่อเนื้อเยื่อ gonad หรือไม่

4.1.1 การสกัด RNA

แยกอวัยวะต่าง ๆ จากกุ้งแชบ๊วย ใส่หลอดทดลอง เติม TRIzol reagent ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 100 มิลลิกรัม บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาโปรตีนและไขมันบางส่วนออกไป เก็บของเหลวใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 0.2 มิลลิลิตรต่อ TRIzol reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ผสมให้กันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ทำให้เกิดการแยกชั้นคลอโรฟอร์มกับ TRIzol reagent โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยการเติม isopropanol 0.5 มิลลิลิตรต่อ TRIzol reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอน RNA ที่มีลักษณะใสติดอยู่ที่ก้นหลอด ทิ้งส่วนใสด้านบน และล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อ TRIzol reagent ที่ใช้เริ่มต้น 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องไมโครเซนทริฟิวจ์ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ระเหยของเหลวออกด้วยเครื่องสุญญากาศ แล้วละลายตะกอน RNA ในน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพ RNA ที่ได้โดยใช้ 1.2% อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส เก็บสารละลาย RNA ที่ –80 องศาเซลเซียส พร้อมสำหรับนำไปสังเคราะห์ cDNA

4.1.2 การสังเคราะห์ cDNA

นำ RNA ที่สกัดได้จากอวัยวะต่าง ๆ มาเติม random primer จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยการทำ reverse transtription ปริมาตร 12.50 ไมโครลิตร ซึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วย 10 mM dNTP เอนไซม์ AMV Reverse Transcriptase และ AMV Reverse Transcriptase 5X Reaction Buffer ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนและเอนไซม์ RNase ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ cDNA ที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพด้วยยีน β-actin เก็บ cDNA ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

เอกสารฉบับนี้ควรนำไปเพื่อการใช้งานเท่านั้น 19/04/2024
โดย ธนดล ศรีพงษ์ ID 3980538
จากระบบฐานข้อมูลกลางงานวิจัยไทย (TNRR)

4.1.3 การทำ RT-PCR

นำตัวอย่าง cDNA มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยปริมาตรรวมทั้งหมดของปฏิกิริยาเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ซึ่งภายในปฏิกิริยา PCR ประกอบไปด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน 10.5 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5X Green Gotaq Flexi buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, Gotaq Flexi DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ยีนความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เส้น forward และ reverse อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร (ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 1) และ cDNA ต้นแบบ ความเข้มข้น 500 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR ของยีน *Actin* คือ initial-denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที อุณหภูมิและเวลาสำหรับ annealing แสดงในตารางที่ 1 และ extension 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ และ final extension 72 องศาเซลเซียส 7 นาที เป็นจำนวน 1 รอบ จากนั้นนำ RT-PCR มาวิเคราะห์ผลโดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% agarose gel ใน 0.5x TAE buffer ที่ผสมด้วย GelRed® Nucleic Acid Gel Stain แล้วนำไปถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลรุ่น Platinum HD2D-59LS-26MX ยี่ห้อ UVITEC

ตารางที่ 1 ไพร์เมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย

Gene name	Primer name	Primer sequence	Annealing temp. and time
DMC1	*FmDMC1*-F	5′-GACCCGAAGAAACCGATTGGCG- 3′	67°C, 30 s
	FmDMC1-R	5′-GCCTCCTGCCGTGATAGCGAAG- 3′	
Cyclin A	*FmCyclinA*-F	5′-GCTGCGAAATATGAGGAGAT- 3′	56°C, 45 s
	FmCyclinA-R	5′-TATGGCAGTTCAAACGCTA- 3′	
Cyclin B	*FmCyclinB*-F	5′-GATGTGGAGGAGGAAGC-3′	60°C, 30 s
	FmCyclinB-R	5′-AGGAAGTGCAAGGGAAGG-3′	
Cyclin E	*FmCyclinE*-F	5′-CTGTGGCTATGCTCACTCCA-3′	60°C, 30 s
	FmCyclinE-R	5′-CTGTGGCTATGCTCACTCCA-3′	
Nanos	*FmNanos*-F	5′-ATTGCCAGAAATCACCAG-3′	59°C, 30 s
	FmNanos-R	5′-ATTCTGCCGTGTCAACAT-3′	
NASP	*FmNASP*-F	5′-AAGGTTGAGGCTAAGGAG-3′	62°C, 45 s
	FmNASP-R	5′-CACAGGTTCAAGAGGCAG-3′	
MARF1	*FmMARF1*-F	5′-TGAGGCTTTTCCAGTTGCTT-3′	64°C, 45 s
	FmMARF1-F	5′-TAGGGGATAGGTGCAGTTGG-3′	
Actin	universal*Actin*-F	5′-GCTACAGCTTCACCACCACCG-3′	58°C, 30 s
	universal*Actin*-R	5′-GATGTCCACGTCRCACTTCAT-3′	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยผู้ขอใช้งานจะได้รับรหัสประจำตัวผู้ใช้งาน (User ID) ที่ระบุตัวตนได้ และจะได้รับรหัสผ่านเพื่อเข้าใช้งานระบบเท่านั้น ห้ามมิให้ผู้ใดนำไปใช้งานก่อนได้รับอนุญาต ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ ก่อนได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากเจ้าของผลงานวิจัย ผู้ใดฝ่าฝืนมีความผิดตามกฎหมาย
โดย ณัฐดล ศรีพัฒน์ ID 6305G38 วันที่ 19/06/2024
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUNRO)

4.2 *In situ* hybridization

4.2.1 การสังเคราะห์โพรบ RNA

วิธีการทำ *in situ* hybridization จะดำเนินการตามวิธีการของ Nagasawa et al. (2009) และ Okutsu et al. (2010) โดยยีนที่สนใจถูกโคลนเข้าพลาสมิด pGEM-T-easy หลังจากนั้นเส้นโพรบ antisense และ sense ถูกสังเคราะห์ด้วยชุด kit digoxigenin (DIG) RNA Labeling kit (SP6/T7) (Roche, Germany) ตามคู่มือของบริษัท

4.2.2 การเตรียมตัวอย่างกุ้ง

นำกุ้งเพศผู้และเมียมาน็อคบนน้ำแข็ง จากนั้นเก็บ testis และ ovary แช่ในน้ำยา fixative และเข้าสู่กระบวนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างโดยเอทานอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และแทนที่น้ำด้วยพาราฟิน โดยใช้เครื่องเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อ (Leica รุ่น TP1020) จากนั้นเนื้อเยื่อจะถูกฝังในบล็อกด้วยเครื่อง embedding (Leica รุ่น EG1150H) และถูกตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ มีความหนา 5 ไมครอน ด้วย microtome (Leica รุ่น 2125 RTS) และวางบนสไลด์แก้วก่อนจะนำไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

4.2.3 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อและตรวจสอบผล

นำสไลด์ที่มีตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเข้าสู่ขั้นตอนการเอาพาราฟินออก คือนำสไลด์ตัวอย่างแช่ลงในสารละลายไซลีน (Xylene) เป็นเวลา 10 นาที โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไปแช่สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 100 เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง แช่ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 เป็นเวลา 2 นาที แช่ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 เป็นเวลา 2 นาที และแช่ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 เป็นเวลา 2 นาที แล้วล้างด้วยสารละลาย PBST 2 นาที จากนั้นนำสไลด์ตัวอย่างสู่ขั้นตอน Re-fixing คือ นำสไลด์ตัวอย่าง fix ด้วย 4% PFA นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่า ด้วยความแรง 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างกับสารละลาย PBST 5 นาที จากนั้นนำสไลด์ตัวอย่างที่ยึดไว้กับตัวหนีบแขวนไว้ ใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลาย acetylating แล้วทำการหมุน ค่อย ๆ หยดสารละลาย acetic acid ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มสไลด์ตัวอย่างไว้ในสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำสไลด์ตัวอย่าง ล้างด้วยสารละลาย PBST 2 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการ pre-hybridization โดยนำสไลด์ตัวอย่างนำมาแช่ในสารละลายที่มี Formamide (WAKO) ผสมในสารละลาย 20XSCC (pH 4.5) และน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำมาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ขั้นตอนการทำ Hybridization เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีส่วนประกอบของ Formamide 20XSSC (pH 4.5) tRNA (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) (Heparin 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10% SDS DTT และ dextran นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นเติม DIG-labeled probe ความเข้มข้น 50 – 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีลายน้ำกำกับเอกสารเพื่อการใช้งานเท่านั้น ณัฐพล ธีระเพชร (NUTRA) 19/06/2024

ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำบัฟเฟอร์ดังกล่าวปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยดบนสไลด์ตัวอย่าง ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วใส่ใน hybridization chamber นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้ว เข้าสู่ขั้นตอนการล้างโพรบ นำสไลด์ตัวอย่างแช่ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 50% formamide และ 5XSSC ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำสไลด์ตัวอย่างที่ได้ แช่ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 50% formamide และ 2XSSC ที่อุณหภูมิ65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และนำสไลด์ดังกล่าวมาแช่ในสารละลายที่ประกอบไปด้วย 50% formamide และ 2XSSC ใน PBST ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิลดลงเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอน RNAase treatment โดยแช่สไลด์ตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ NTE ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ใน NTE buffer ที่มี RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ผสมอยู่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น นำสไลด์ตัวอย่างมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ NTE ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นล้าง RNase โดยใช้สารละลาย 0.5x SSC ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำสไลด์ตัวอย่างมาล้างด้วยสารละลาย TBST เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เข้าสู่ขั้นตอนการบ่มตัวอย่างกับ antibodyโดยเตรียม Anti-DIG antibody solution โดยใช้สารละลาย DIG antibody 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 1X Block solution 1 มิลลิลิตร นำมาผสมให้เข้ากันและนำมาหมุนเหวี่ยง 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาหยดบนสไลด์ตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดแล้วทำการล้าง antibody ส่วนเกินออกโดยนำสไลด์ตัวอย่างแช่ในสารละลาย TBST เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง และเข้าสู่ขั้นตอนการทำให้เกิดสีด้วยปฏิกิริยา BCIP/NBT โดยบ่มสไลด์ในสารละลาย NTMT ที่มี NBT/BCIPผสมอยู่ วางไว้อุณหภูมิห้อง ข้ามคืน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดตรวจสอบผลการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยสังเกตสีม่วงที่เกิดขึ้น

5. การตรวจสอบผลการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ gonads ของกุ้งแชบ๊วยในกุ้งตัวรับด้วยฟลูออเรสเซ้นต์

เมื่อทำการปลูกถ่าย testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกุ้งขาวได้เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 4 เดือน กุ้งขาวตัวรับจะถูกสุ่มขึ้นมาเพื่อตรวจสอบผลการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ โดยจะใช้เครื่องมือวิทยาศาสตร์ 2 ชนิดด้วยกัน ได้แก่เครื่อง chemiluminescence และกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอแบบที่สามารถตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซ้นต์ได้ โดยในขั้นตอนแรกกุ้งตัวรับถูกตรวจสอบด้วยเครื่อง chemiluminescence (VILBER รุ่น FUSION SOLO S) เพื่อหาตำแหน่งที่มีการเรืองแสง จากนั้นเนื้อเยื่อบริเวณนั้นจะถูกส่องต่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ (Nikon รุ่น SMZ18) เพื่อยืนยันการเรืองแสงของชิ้น

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเมือง IP:39.[illegible]
สามารถสืบค้นข้อมูลงานวิจัยได้ที่ (TNRR)

เนื้อเยื่อที่ปรากฏ และทำการตัดชิ้นเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวเพื่อนำมาตรวจสอบผลการปลูกถ่ายด้วยเทคนิค molecular marker ต่อไป

6. การตรวจสอบผลการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยในกุ้งตัวรับด้วย germ cell molecular marker

เนื่องจากการถ่ายฝากได้ทำการถ่ายฝากไปยังกล้ามเนื้อบริเวณลำตัวของกุ้งตัวรับ ซึ่งปกติแล้วจะไม่มีเนื้อเยื่อ testis อยู่ ดังนั้นในบริเวณนี้จึงจะไม่มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) แต่หากมีชิ้น testis ที่ปลูกถ่ายเข้าไปอยู่บริเวณนี้ และ germ cell ใน testis นั้นยังคงมีชีวิตจะต้องมีการแสดงออกของยีนจะ germ cell ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบการคงอยู่และการมีชีวิตของ testis ได้ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับ testis โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้ยีน *DMC1* ซึ่งได้ทำการทดลองมาก่อนหน้าว่ามีความจำเพาะกับ testis ของกุ้งแชบ๊วย

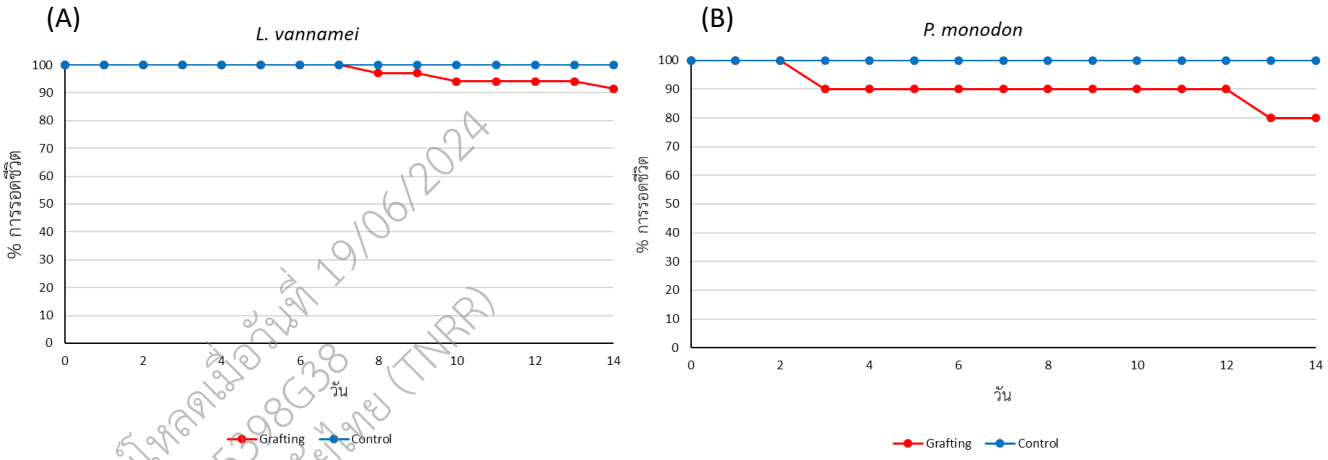
โดยชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายฝากจะถูกนำมาสกัด RNA ตามข้อ 4.1.1 จากนั้นจะเปลี่ยน RNA ให้เป็น cDNA โดยใช้เอนไซม์ AMV reverse-transcriptase และ random primer ตามข้อ 4.1.2 จากนั้นจะทำ RT-PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *DMC1* ตามข้อ 4.1.3 และตรวจสอบผลการทดลองด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ต่อไป

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกกุ้งตัวรับที่เหมาะสมสำหรับการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis (testis grafting) จากกุ้งแชบ๊วยเข้าสู่กุ้งตัวรับ โดยได้ทำการเปรียบเทียบกุ้งตัวรับสองชนิดได้แก่ กุ้งขาว (*L. vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) หลังจากทำการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ ได้ทำการติดตามอัตราการรอดชีวิตของกุ้งตัวรับทั้งสองชนิดเป็นเวลา 16 วัน พบว่ากุ้งขาวมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 91.4 ในขณะที่กุ้งกุลาดำมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 80 ดังแสดงในรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่ากุ้งขาวมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากุ้งกุลาดำ และเนื่องจากในปัจจุบันหาตัวอย่างกุ้งขาวเพื่อที่จะใช้ในการทดลองต่อ ๆ ไปได้ง่ายกว่ากุ้งกุลาดำ ดังนั้นการทดลองถัดไปในโครงการวิจัยย่อยนี้จะใช้กุ้งขาวเป็นตัวรับ



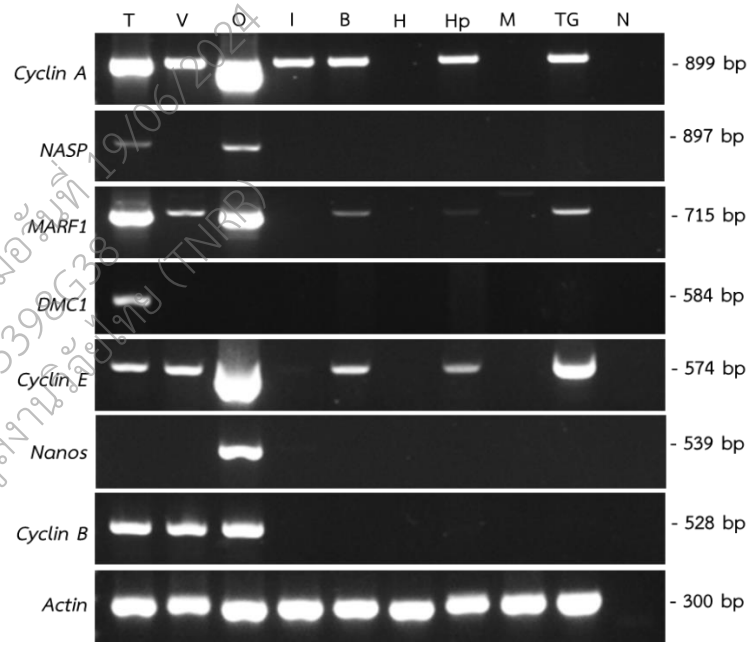
รูปที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งตัวรับภายหลังการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยเป็นเวลา 16 วัน (A) กุ้งขาวเป็นกุ้งตัวรับ (B) กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งตัวรับ เส้นสีฟ้าแสดงถึงกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ gonad เส้นสีแดงแสดงกลุ่มที่มีการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนกร ศรีพร ID5598G38
จากระบบเครือข่ายงานวิจัยแห่งชาติ (TNRR)

2. ศึกษายีน germ cell marker เพื่อใช้ตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อกุ้งแชบ๊วยที่ปลูกถ่าย

2.1 ศึกษาความจำเพาะของยีนต่อ gonad ของกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค tissue distribution

เพื่อทำการตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยที่ถ่ายฝากไปยังกุ้งขาว คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษายีนที่จะใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วย โดยคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ใช้ฐานข้อมูลยีนที่มีการแสดงออกใน gonad ของกุ้งแชบ๊วยจากการทำ transcriptome จากทีมวิจัยของ Prof. Dr. Ikuo Hirono จากมหาวิทยาลัย Tokyo University of Marine Science and Technology ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยีนจากคลังยีนจำนวนทั้งหมด 7 ยีนมาใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Cyclin A*, *Cyclin B*, *Cyclin E*, *NASP*, *MARF1*, *DMC1* และ *Nanos* โดยได้ทำการตรวจสอบความจำเพาะของการแสดงออกของยีนทั้ง 7 ที่มีต่อ gonad ด้วยเทคนิค tissue distribution ผลการทดลอง tissue distribution พบว่ามีเพียง 4 ยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะใน testis, ovary และ vas deferens ได้แก่ ยีน *NASP*, *DMC1*, *Nanos* และ *Cyclin B* ดังแสดงในรูปที่ 4 จากนั้นจึงนำยีนทั้ง 4 ยีนนี้ไปทดสอบความจำเพาะกับ germ cell ด้วยเทคนิค *in situ* hybridization ใน testis และ ovary ของกุ้งแชบ๊วยต่อไป

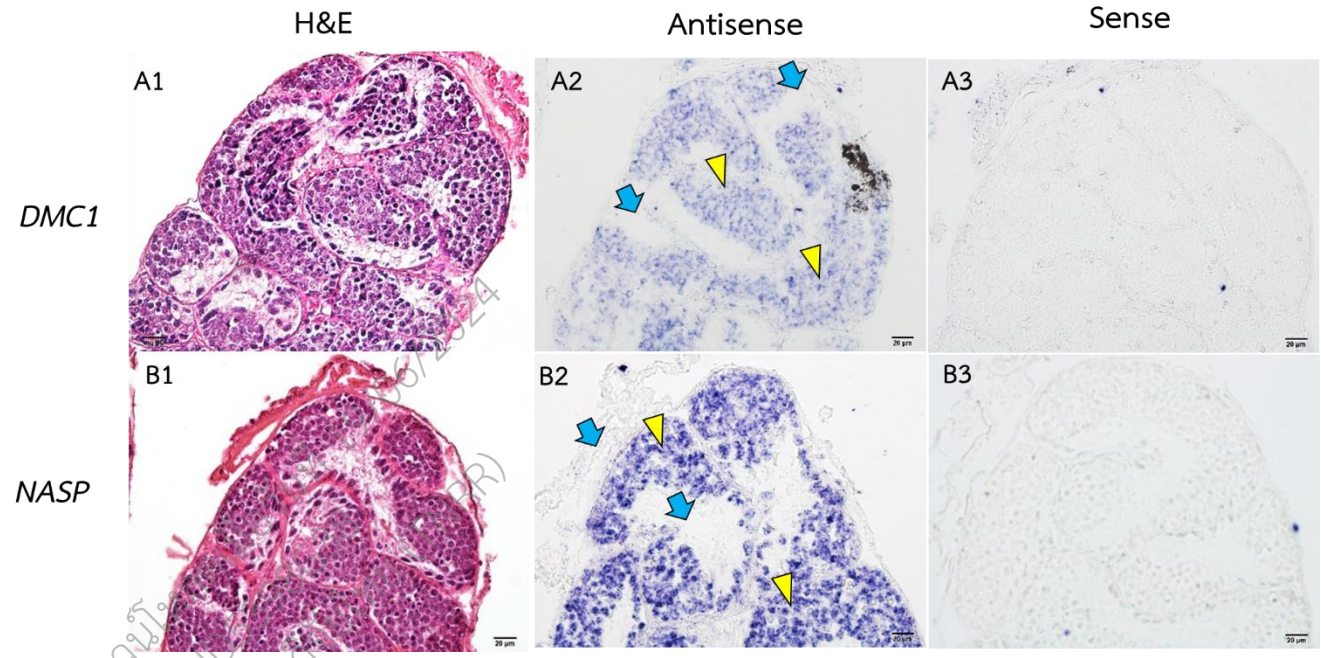


เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อ วันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5390G3
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 4 ความจำเพาะของยีนต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วย เนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ ของกุ้งแชบ๊วยถูกนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน β-actin เป็นยีนควบคุมภายใน N: กลุ่มควบคุมที่ไม่มีการใส่ DNA แม่แบบในปฏิกิริยา PCR, T: testis, V, vas deferens; O, ovary; I, intestine; B, brain; H, heart; Hp, hepatopancreas; M, muscle; TG, thoracic ganglion (N=5)

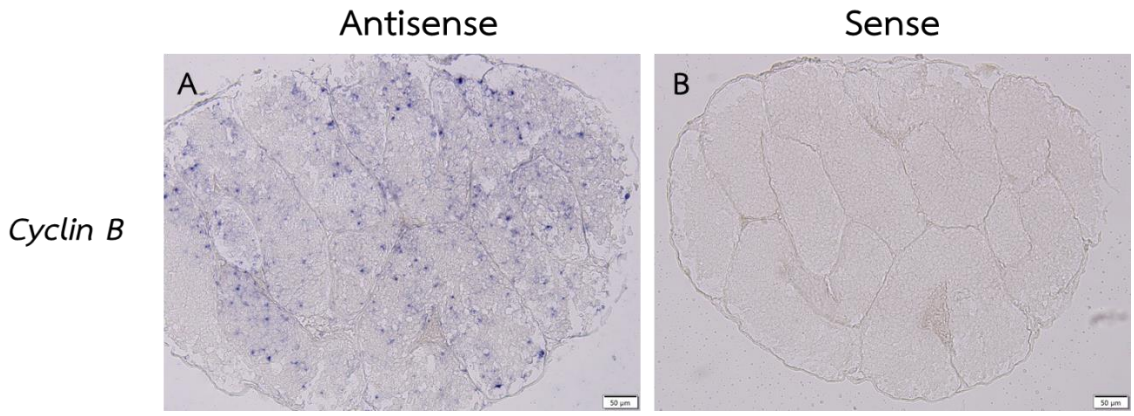
2.2 ทดสอบความจำเพาะของยีนต่อ germ cell ใน testis ของกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค *in situ* hybridization

ทดสอบความจำเพาะของยีน DMC1, NASP และ Cyclin B ต่อ germ cell ในเนื้อเยื่อ testis โดยเทคนิค *in situ* hybridization พบซึ่งพบสัญญาณของโพรบ antisense ของยีน *DMC1* และ *NASP* บริเวณ germ cell แต่ไม่ปรากฏสัญญาณบริเวณ somatic cell และไม่พบสัญญาณใด ๆ ในเนื้อเยื่อที่ถูกบ่มด้วยโพรบ sense ซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมเชิงลบ แสดงให้เห็นว่าว่ายีน *DMC1* และ *NASP* แสดงออกจำเพาะกับ germ cell ในเนื้อเยื่อ testis ดังแสดงในรูปที่ 5 ในขณะที่โพรบ antisense ของยีน *Cyclin B* ปรากฏสัญญาณที่ไม่จำเพาะกับ germ cell ดังแสดงในรูปที่ 6 ดังนั้นจึงเลือกใช้ยีน *DMC1* หรือ *NASP* ในการทดสอบการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยต่อไป



รูปที่ 5 *In situ* hybridization ของยีน *DMC1* และ *NASP* ใน testis ของกุ้งแชบ๊วย (A) testis ของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วยโพรบ antisense และ sense สำหรับยีน *DMC1* (B) testis ของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วยโพรบ antisense และ sense สำหรับยีน NASP ลูกศรสีฟ้าแสดงส่วนที่เป็น somatic cell สามเหลี่ยมสีเหลืองแสดงส่วนที่เป็น germ cell

เอกสารนี้ดาวน์โหลดโดย ธนาคาร ศรีเพชร ID [illegible] วันที่ [illegible] 2024 (CC BY-NC-SA-NR) ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

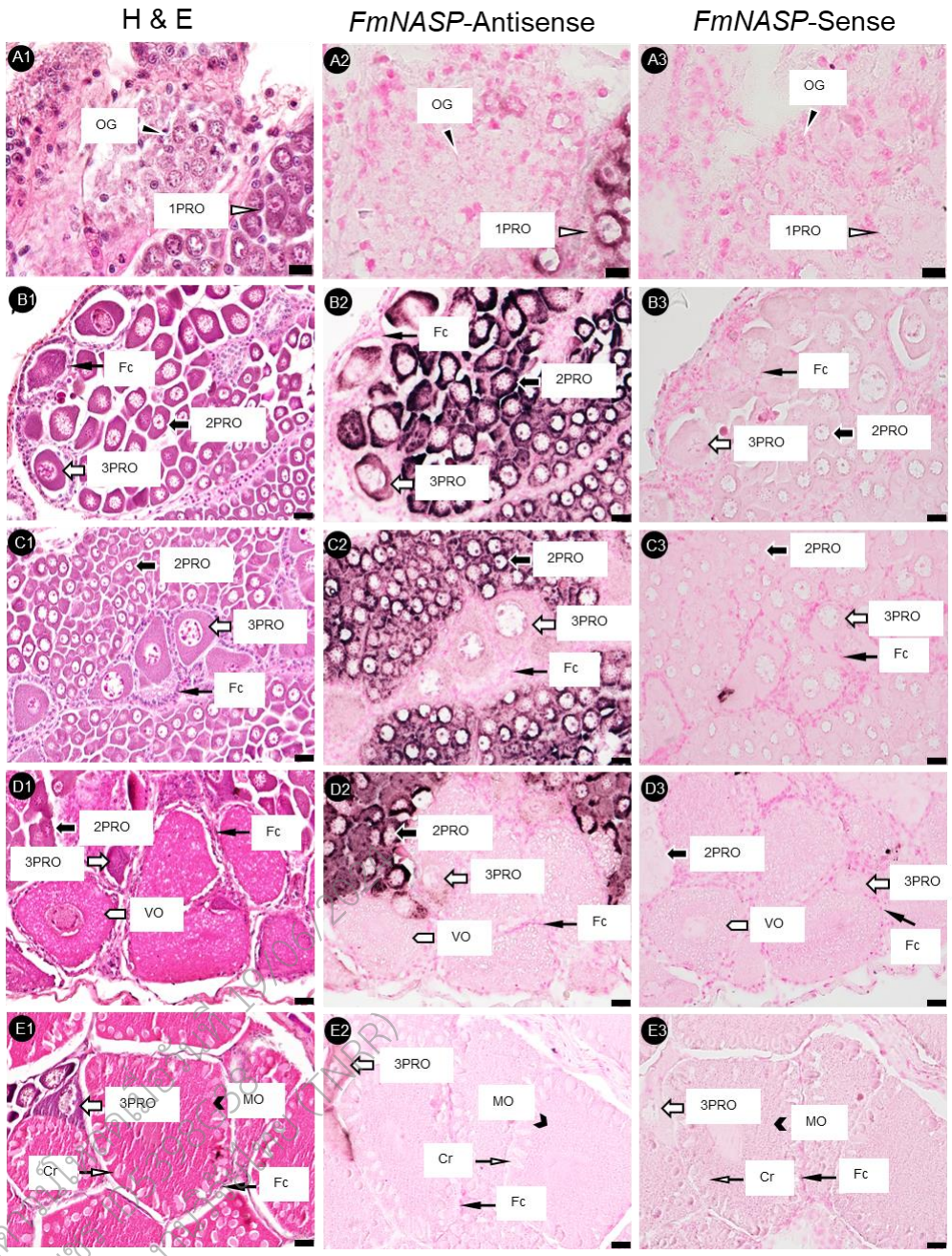


รูปที่ 6 *In situ* hybridization ของยีน *Cyclin B* ใน testis ของกุ้งแชบ๊วย (A) testis ของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วยโพรบ antisense (B) testis ของกุ้งแชบ๊วยที่บ่มด้วยโพรบ sense

2.3 ทดสอบความจำเพาะของยีนต่อ germ cell ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วยด้วยเทคนิค *in situ* hybridization

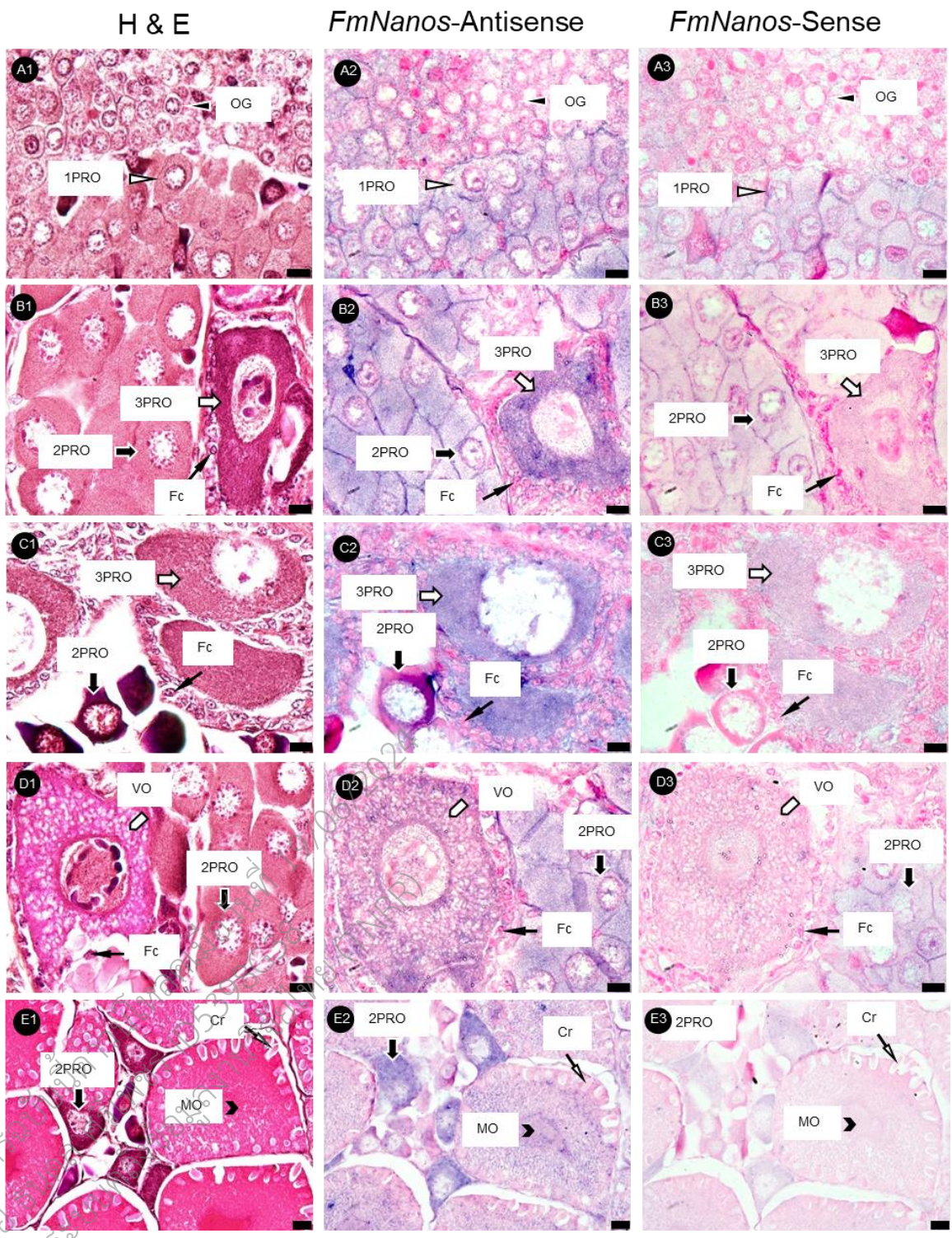
นอกจากจะทดสอบความจำเพาะของยีนต่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยแล้ว คณะผู้วิจัยยังได้ทำการทดสอบความจำเพาะของยีน *NASP*, *Nanos* และ *Cyclin B* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วยอีกด้วย ซึ่งพบว่าทั้งสามยีนมีการแสดงออกที่จำเพาะกับ germ cell ของกุ้งแชบ๊วย โดยยีน *NASP* มีการแสดงออกสูงที่สุดในเซลล์ระยะ mid-previtellogenesis (รูปที่ 7) และการแสดงออกลดลงในระยะ late-previtellogenesis และหายไปเมื่อเขาสู่ระยะ vitellogenesis ในขณะที่ยีน *Nanos* และ *Cyclin B* มีการแสดงออกทั้งในระยะ previtellogenesis และ vitellogenesis (รูปที่ 8 และ 9 ตามลำดับ)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G5
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

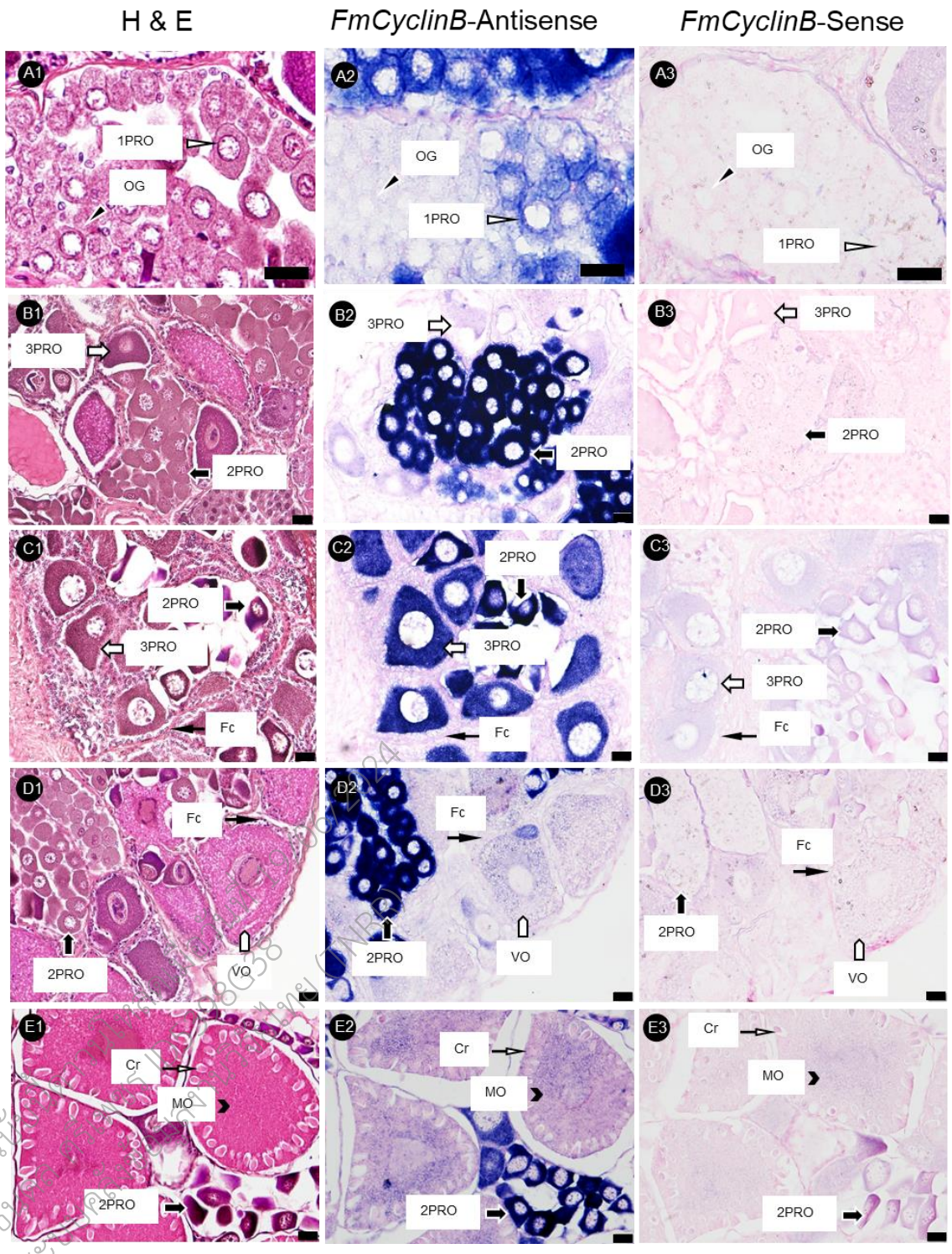


รูปที่ 7 *In situ* hybridization ของยีน *NASP* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย (A1-E1) เนื้อเยื่อรังไข่ที่ย้อมด้วยสี H&E (A2-E2) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ antisense ที่จำเพาะต่อยีน *NASP* (A3-E3) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ sense ที่จำเพาะต่อยีน *NASP* สเกลบาร์แสดง 20 μM OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร



รูปที่ 8 *In situ* hybridization ของยีน *Nanos* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย (A1-E1) เนื้อเยื่อรังไข่ที่ย้อมด้วยสี H&E (A2-E2) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ antisense ที่จำเพาะต่อยีน *Nanos* (A3-E3) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ sense ที่จำเพาะต่อยีน *Nanos* สเกลบาร์แสดง 20 μM OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod



รูปที่ 9 *In situ* hybridization ของยีน *Cyclin B* ใน ovary ของกุ้งแชบ๊วย (A1-E1) เนื้อเยื่อรังไข่ที่ย้อมด้วยสี H&E (A2-E2) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ antisense ที่จำเพาะต่อยีน *Cyclin B* (A3-E3) เนื้อเยื่อรังไข่ที่บ่มด้วยโพรบ sense ที่จำเพาะต่อยีน *Cyclin B* สเกลบาร์แสดง 20 μM OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod

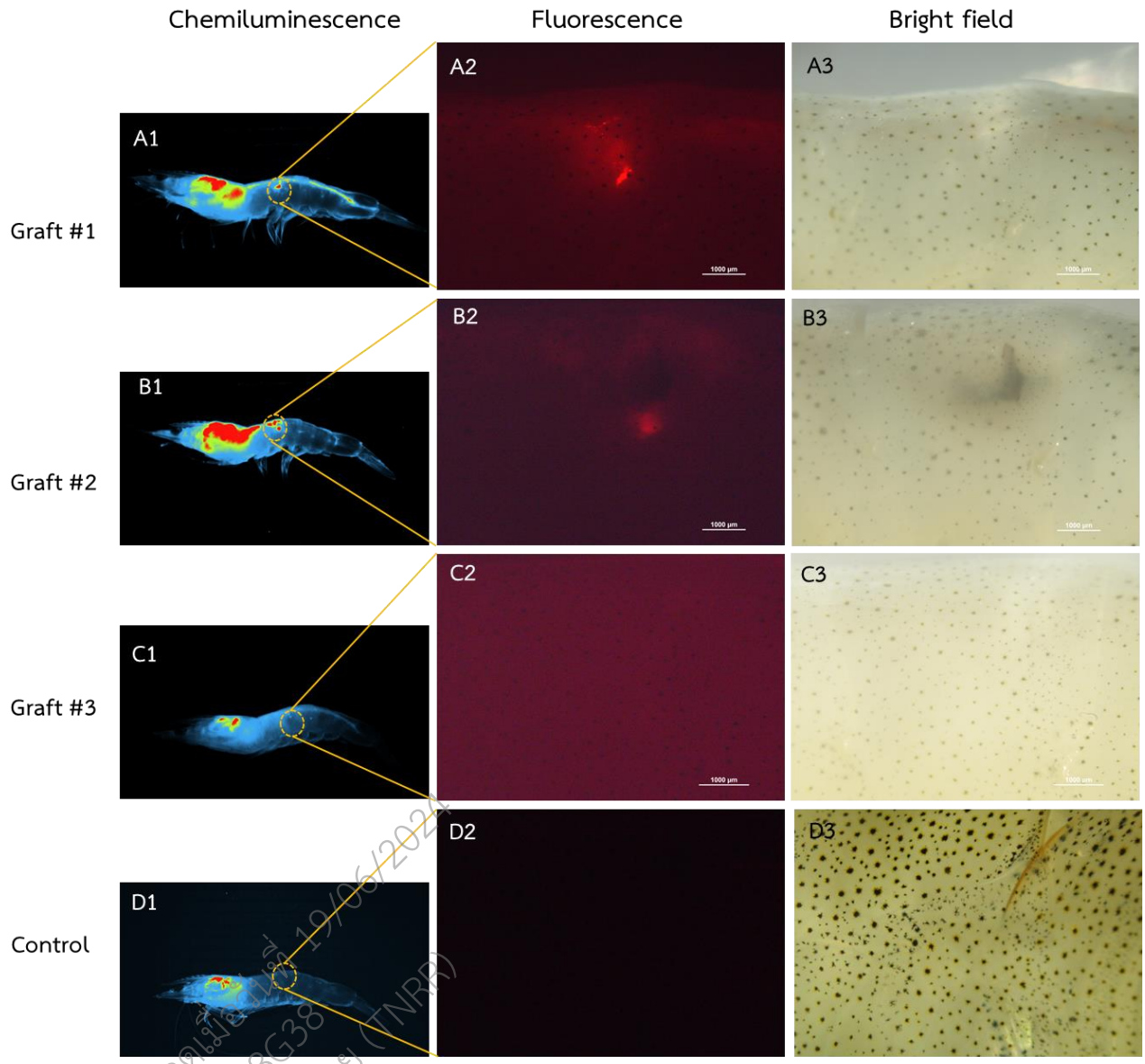
3. การตรวจสอบผลการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยด้วยแสงฟลูออเรสเซ้นต์

หลังจากแยกชิ้น testis ออกจากกุ้งแชบ๊วย ชิ้น testis ถูกตัดใช้มีขนาดชิ้นประมาณ 7-8 มิลลิเมตร และย้อมด้วยสารสี PKH 26 ซึ่งสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซ้นต์สีแดงได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงใช้กล้องที่สามารถตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซ้นต์ได้ในการติดตามการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis โดยในการทดลองครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้ใช้เครื่องมือสองชนิดในการตรวจสอบได้แก่กล้อง chemiluminescence และกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอที่สามารถตรวจสอบแสงฟลูออเรสเซ้นต์ได้

กุ้งขาวตัวรับจะถูกสุ่มนำมาตรวจสอบผลการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis เมื่อเวลาผ่านไป 1, 2 และ 4 เดือน จากการตรวจสอบพบว่าเมื่อปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis ไปได้เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบรูปแบบผลการทดลองในสามรูปแบบหลัก ๆ ได้แก่ พบแสงฟลูออเรสเซ้นต์บริเวณลำตัวของกุ้งขาวตัวรับทั้งจากเครื่อง chemiluminescence และกล้องจุลทรรศน์ชนิดมีฟลูออเรสเซ้นต์ ดังแสดงในรูปที่ 10, A1 และ A2 และเมื่อตรวจสอบเนื้อเยื่อบริเวณดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ bright filed พบว่าเนื้อเยื่อ testis มีลักษณะเป็นสีเดียวกันกับกล้ามเนื้อของกุ้งขาว (รูปที่ 10 A3) ซึ่งสันนิษฐานว่าชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยที่ปลูกถ่ายเข้าไปสามารถดำรงอยู่และมีชีวิตอยู่ในกล้ามเนื้อของกุ้งขาวได้ รูปแบบที่สองที่พบได้แก่ พบแสงฟลูออเรสเซ้นต์บริเวณเนื้อเยื่อที่มีการถ่ายฝาก ดังแสดงในรูปที่ 10, B1 และ B2 แต่เมื่อตรวจสอบด้วย bright filed พบว่าเนื้อเยื่อ testis มีลักษณะเป็นสีดำ (รูปที่ 10, B3) ซึ่งสันนิษฐานว่าเนื้อเยื่อ testis เริ่มเกิดการตาย และรูปแบบที่สามได้แก่ ไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซ้นต์ใดๆ และไม่พบชิ้นเนื้อเยื่อ testis เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ bright filed สันนิษฐานว่าเนื้อเยื่อ testis อาจจะเกิดการหลุดออกจากตัวกุ้งขาวหลังจากการปลูกถ่าย (รูปที่ 10, C1-3) รูปที่ 10, D1-3 แสดงกุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายฝาก testis ของกุ้งแชบ๊วย ซึ่งไม่พบสัญญาณฟลูออเรสเซ้นต์ในบริเวณที่มีการถ่ายฝาก รวมถึงไม่พบชิ้นเนื้อเยื่อ testis เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ bright filed

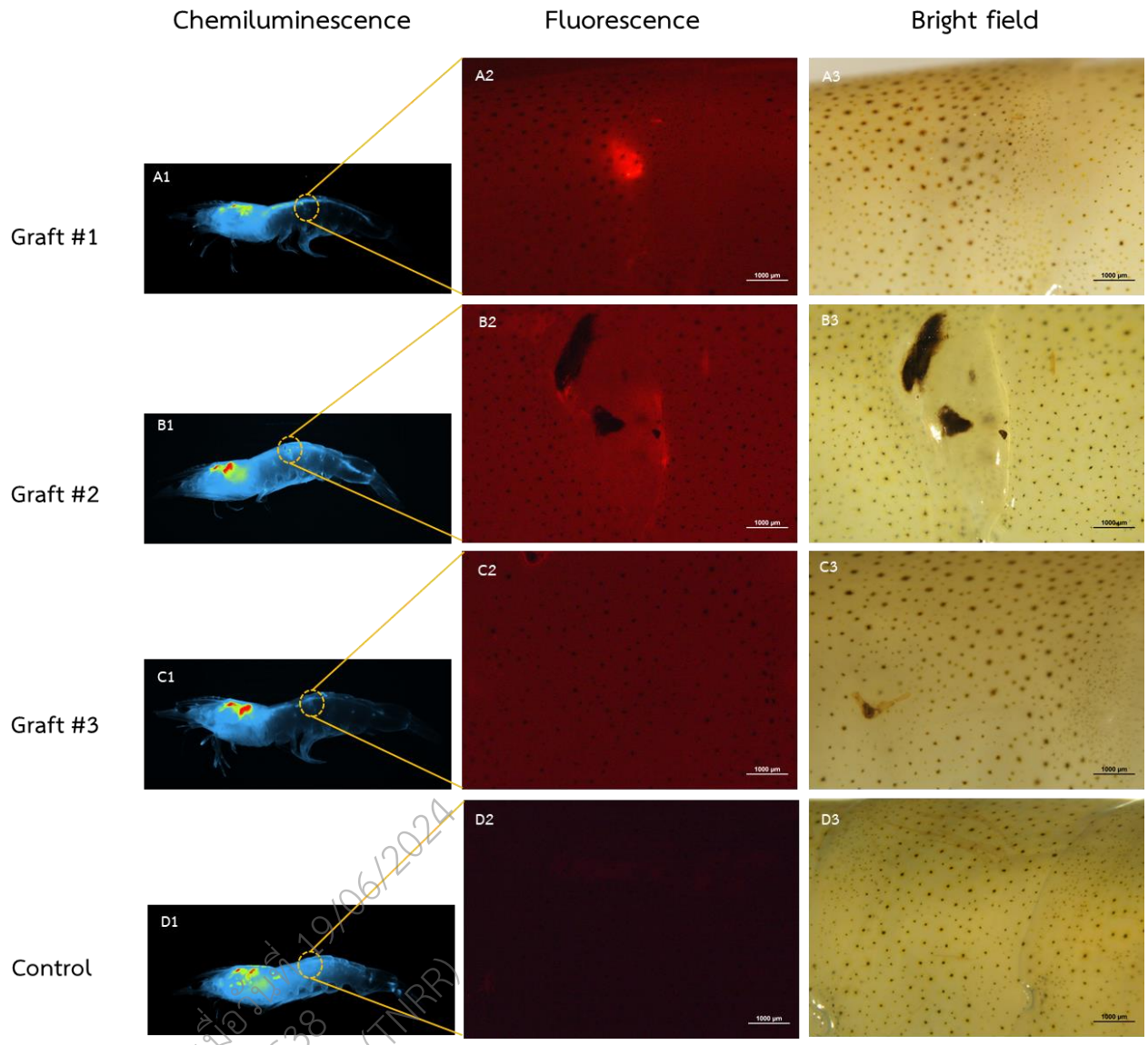
เมื่อทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งขาวที่ได้รับการปลูกถ่ายชิ้นเนื้อเยื่อ testis เมื่อเวลาผ่านไป 2 และ 4 เดือน พบว่ายังคงพบรูปแบบการแสดงออกของแสดงฟลูออเรสเซ้นต์ทั้งสามรูปแบบทั้งในกลุ่มตัวอย่าง 2 เดือนและ 4 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการละเมิดลิขสิทธิ์ ธนาคารกลางแห่งประเทศไทย ID 3980538 วันที่ 19/04/2024 จากระบบบริหารจัดการงานวิจัยไทย (TMR)



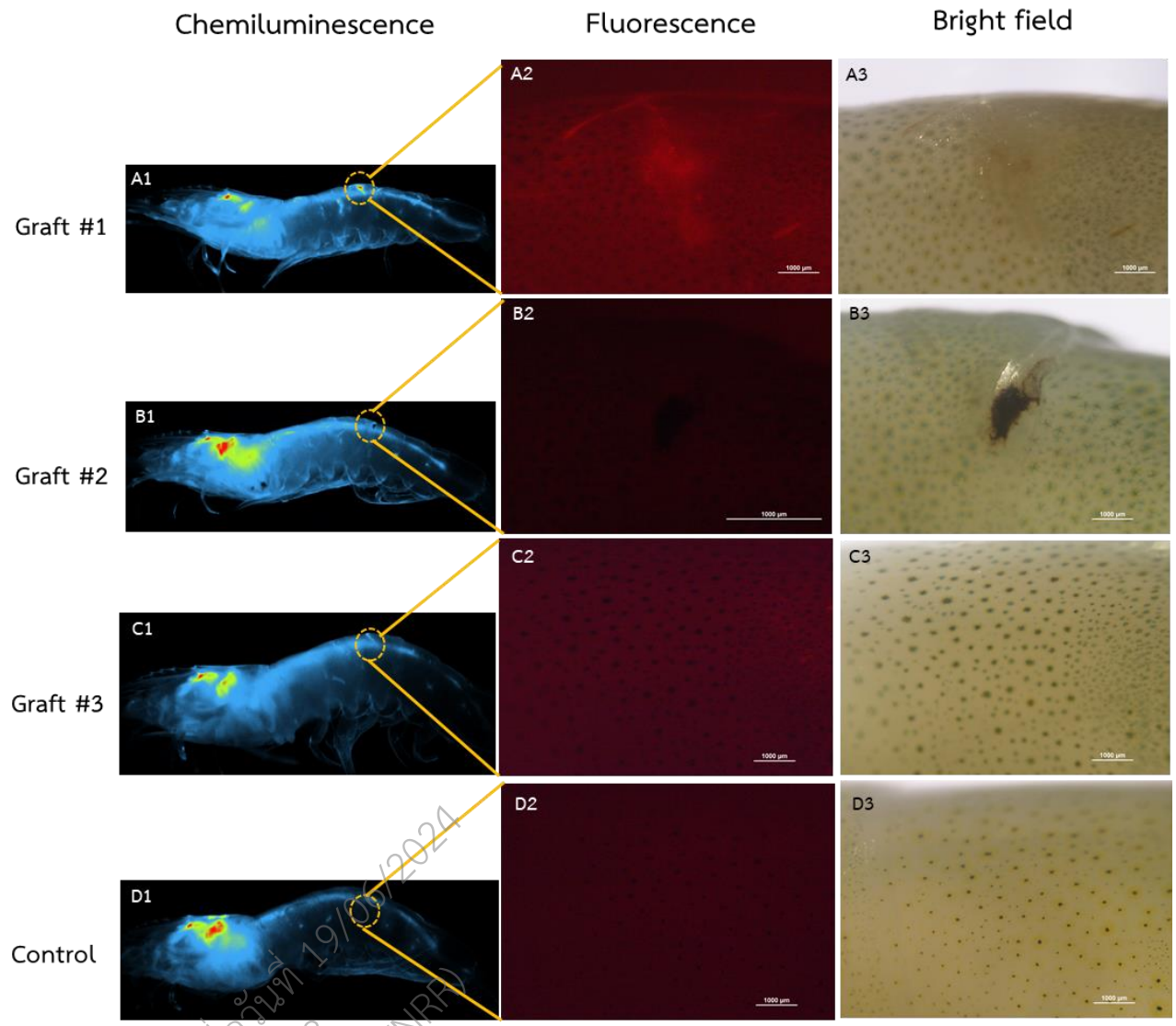
รูปที่ 10 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 1 เดือน (A) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 1 (B) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 2 (C) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 3 (D) กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis สเกลบาร์เท่ากับ 1 มิลลิเมตร (N=15)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การแสวงหากำไร การทำซ้ำ หรือการเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร
โดย ธนัตถ์ คงเพชร ID5398G38 เมื่อวันที่ 19/06/2024
จากระบบคลังปัญญาจุฬาฯ ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (TNRR)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ในระบบคลังความรู้ของกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช
โดย ธนดล ศรีเกตุ เมื่อวันที่ 19/06/2024 เวลา 10:53:98G38
จากระบบคลังความรู้ของกรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช (TNRR)

รูปที่ 11 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 2 เดือน (A) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 1 (B) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 2 (C) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 3 (D) กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis สเกลบาร์เท่ากับ 1 มิลลิเมตร (N=15)



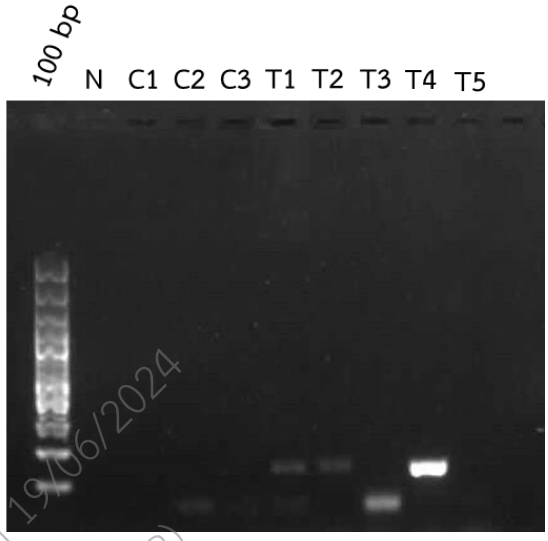
รูปที่ 12 ผลการปลูกถ่ายชิ้น testis ของกุ้งแชบ๊วยไปยังกล้ามเนื้อกุ้งขาว เป็นระยะเวลา 4 เดือน (A) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 1 (B) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 2 (C) กุ้งขาวตัวรับตัวที่ 3 (D) กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis สเกลบาร์เท่ากับ 1 มิลลิเมตร (N=15)

เอกสารฉบับนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของ ณัทล ศรีเพชร ID 3980538 ตั้งแต่วันที่ 19/06/2024 ระบบจัดเก็บข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

4. ตรวจสอบผลการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน germ cell marker

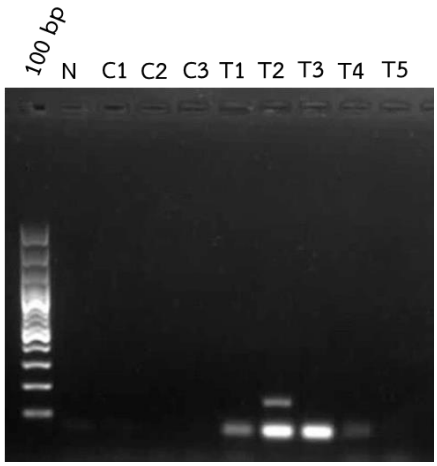
เมื่อนำชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยที่ได้รับการถ่ายฝากไปยังกุ้งขาวเป็นเวลา 1, 2 และ 4 เดือนมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DMC1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ spermatogenesis ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าเนื้อเยื่อกุ้งขาวบริเวณที่มีชิ้น testis แทรกอยู่มีการแสดงออกของยีน *DMC1* ทั้งตัวอย่างที่มีการปลูกถ่ายไปแล้วเป็นระยะเวลา 1, 2 และ 4 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ และไม่พบการแสดงออกของยีน *DMC1* ในกุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากชิ้น testis ดังนั้นสันนิษฐานว่าชิ้น testis

ที่ปลูกถ่ายเข้าไปอาจจะยังมีเซลล์บางส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ทำให้ยังคงมี RNA แสดงออกมา โดยจำนวนกุ้งตัวรับที่มีการแสดงออกของยีน *DMC1* มีจำนวนมากสุดในระยะเวลา 1 เดือน แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจำนวนกุ้งที่มีการแสดงออกของยีนมีจำนวนลดลง สันนิษฐานว่าชิ้นเนื้อ testis บางส่วนมีการตายลงเมื่อระยะเวลาผ่านไป อย่างไรก็ตามยังคงมีบางตัวอย่างที่มีการแสดงออกของยีน *DMC1* ถึงแม้ว่าจะมีการปลูกถ่ายไปแล้วเป็นระยะเวลา 4 เดือน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิคการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ในกุ้งซึ่งไม่เคยมีรายงานมาก่อน ซึ่งงานวิจัยต่อไปในอนาคต อาจจะศึกษาวิธีการปลูกถ่ายที่เหมาะสม หรือการให้สารจำพวกยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน หรือกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อให้มีอัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่ายมากขึ้น

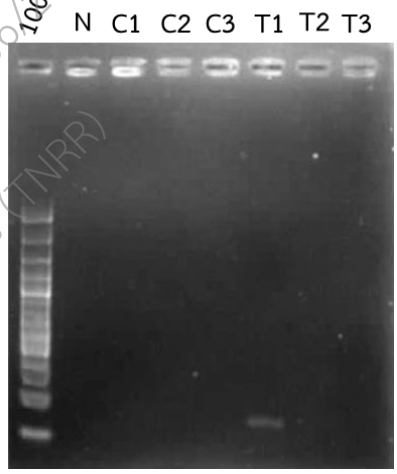


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับเจ้าหน้าที่ วันที่ 19/06/2024
โดย ธนาคาร กรีเพอร์ ID: 3960138
จากระบบฝากข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 13 ผลการตรวจสอบการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 เดือน ด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากการปลูกถ่าย โดยใช้ยีน *DMC1* เป็น germ cell marker กุ้งขาวตัวรับถูกนำมาสกัด RNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีน DMC1 ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นตรวจสอบด้วย 1.5% gel agarose electrophoresis N: กลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่มี DNA แม่แบบ C: กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย T: กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย



รูปที่ 14 ผลการตรวจสอบการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 2 เดือนหลังจากการปลูกถ่าย ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน *DMC1* เป็น germ cell marker กุ้งขาวตัวรับถูกนำมาสกัด RNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีน DMC1 ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นตรวจสอบด้วย 1.5% gel agarose electrophoresis N: กลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่มี DNA แม่แบบ C: กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย T: กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 15 ผลการตรวจสอบการถ่ายฝากชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเชบ๊วยเมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 เดือนหลังจากการปลูกถ่าย ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ยีน *DMC1* เป็น germ cell marker กุ้งขาวตัวรับถูกนำมาสกัด RNA และตรวจสอบการแสดงออกของยีน DMC1 ด้วยเทคนิค RT-PCR จากนั้นตรวจสอบด้วย 1.5% gel agarose electrophoresis N: กลุ่มควบคุมเชิงลบที่ไม่มี DNA แม่แบบ C: กุ้งขาวกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย T: กุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย

สรุปผลการทดลอง

1. การใช้กุ้งขาวเป็นกุ้งตัวรับในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วย พบว่ามีอัตราการรอดของกุ้งตัวรับที่สูงกว่าการใช้กุ้งกุลาดำ

2. ชิ้นเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งแชบ๊วยที่ถูกปลูกถ่ายไปยังกุ้งขาวบางส่วนยังมีชีวิตอยู่ได้แม้ว่าจะผ่านการปลูกถ่ายไปแล้วเป็นระยะเวลา 4 เดือน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาเทคนิคการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อนี้เพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์กุ้งแชบ๊วยต่อไป

3. ยีน DMC1 และ NASP สามารถใช้เป็น germ cell marker สำหรับ testis ในกุ้งแชบ๊วยได้ ในขณะที่ยีน NASP, Nanos และ Cyclin B สามารถใช้เป็น germ cell marker สำหรับ ovary ในกุ้งแชบ๊วยได้

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

เอกสารอ้างอิง

มัทนา บุญยุบล 2539. ชีววิทยาและวงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วยในอ่าวบ้านดอน จ. สุราษฎร์ธานี. รายงานวิชาการ ฉบับที่ 28 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยตอนบน กรมประมง 61 หน้า.

มาโนช รุ่งราตรี และ วันชัย ไล้ทิม 2535. ฤดูวางไข่และชีววิทยาบางประการของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 33 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กรมประมง 33 หน้า.

นิเวศน์ เรืองพานิช, คณิต ไชยาคำ และ ประวิทย์ อินทรโชติ. (2517). ฤดูกาลวางไข่ของกุ้งแชบ๊วย, *P. merqueinsis* de Man ในบริเวณทะเลจังหวัดสงขลา. รายงานผลการปฏิบัติงายวิชาการ ประจำปี 2516-2517. หน้า 198-204.

Cloud JG (2003) Cryopreservation and transplantation of sexually immature gonads of rainbow trout. Fish Physiology and Biochemistry 28:459-462

Hayashi M, Sakuma D, Yoshizaki G (2017) Production of functional sperm by subcutaneous auto-grafting of immature testes in rainbow trout. Molecular Reproduction & Development 85:155-162

Nagasawa K, Takeuchi Y, Miwa M, Higuchi K, Morita T, Mitsuboshi T, Miyaki K, Kadomura K, Yoshizaki G (2009) cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like Gene in pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fisheries Science 75:71-79

Nagler JJ, Cloud JG, Wheeler PA, Thorgaard GH (2001) Testis transplantation in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Biology of Reproduction 64:644-646

Okutsu T, Kang BJ, Miwa M, Yoshizaki G, Maeno Y, Wilder MN (2010) Molecular cloning and characterization of *Dmc1*, a gene involved in gametogenesis, from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fisheries Science 79:961-969

Yoshinaga TT, Junior JRK, Butzge AJ, Olio RL, Hernandez-Blazquez FJ, Carreira ACO, Gomes COMS, Bianchi PKFC, Tabata YA, Hattori RS (2021) Testicular subcutaneous allografting followed by immunosuppressive treatment promotes maintenance of spermatogonial cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology 112: 108-115

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THRR)
โดยธรรมศาสตร์ เมื่อวันที่ 19/06/2024
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THRR)

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

1. พัฒนาเทคนิคการปลูกถ่าย โดยอาจจะหาสภาวะที่เหมาะสมในการปลูกถ่าย เช่น บริเวณที่เหมาะสมในการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ อายุของกุ้งตัวรับ ขนาดชิ้น testis ที่ปลูกถ่าย เป็นต้น เพื่อให้มีอัตราการรอดชีวิตของชิ้น testis มากกว่านี้

2. อาจจะลองให้สารยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อให้เนื้อเยื่อเกิดการตายน้อยลง

3. ลองให้สารกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ ซึ่งอาจจะช่วยให้เนื้อเยื่อ testis มีอัตราการรอดมากขึ้น และอาจจะมีการพัฒนาของเซลล์ที่มากยิ่งขึ้น

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ภาคผนวก

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Gmail Monwadee Wonglapsuwan <monwadee.wo@gmail.com>

Marine Biotechnology - Receipt of Manuscript 'Molecular Markers of...'

Marine Biotechnology <rheycel.monsanto@springernature.com> Thu, Aug 11, 2022 at 1:26 PM
To: monwadee.wo@gmail.com

Ref: Submission ID 62cb5a7e-b634-4f8b-b0b2-b764164cacd6

Dear Dr Wonglapsuwan,

Thank you for submitting your manuscript to Marine Biotechnology.

Your manuscript is now at our initial Quality Check stage, where we look for adherence to the journal's submission guidelines, including any relevant editorial and publishing policies. If there are any points that need to be addressed prior to progressing we will send you a detailed email. Otherwise, your manuscript will proceed into peer review.

You can check on the status of your submission at any time by using the link below and logging in with the account you created for this submission:

https://researcher.nature.com/your-submissions?utm_source=submissions&utm_medium=email&utm_campaign=confirmation-email&journal_id=10126

Kind regards,

Editorial Assistant
Marine Biotechnology

Marine Biotechnology is a transformative journal. This means it offers a hybrid publication model. When the journal accepts research for publication, the article may be published using either immediate gold open access or the subscription publishing route. For further information please visit https://www.springernature.com/gp/open-research/transformative-journals

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR) ของ ธนดล ศรีเพชร ID5398G38 วันที่ 19/08/2024

Molecular Markers of Ovarian Germ Cells of Banana Prawn *(Fenneropenaeus merguiensis*)

Tatiyavadee Sengseng[a], Tomoyuki Okutsu[b], Anida Songnui[c], Jaruwan Boonchuay[a], Chanida Sakunrang[a], Monwadee Wonglapsuwan[a,d,*]

[a] Division of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla 90110, Thailand

[b] Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan

[c] Trang Coastal Fisheries Research and Development Center, Department of Fisheries, Trang 92150, Thailand

[d] Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla, 90110, Thailand

***Corresponding author: monwadee.wo@gmail.com**

Tatiyavadee Sengseng, e-mail: tatiyavadee_pu@hotmail.com

Tomoyuki Okutsu, e-mail: okutsu@affrc.go.jp

Anida Songnui, e-mail: anidas@fisheries.go.th

Jaruwan Boonchuay, e-mail: jaruwan.boonchuay@gmail.com

Chanida Sakunrang, e-mail: chanida.b97@gmail.com

Monwadee Wonglapsuwan, e-mail: monwadee.wo@gmail.com

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ผ่านโครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2567 ภายใต้แผนงานวิจัยเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน (TNRR) 19/06/2024

Statements and Declarations

Acknowledgements: We thank Dr. Ikuo Hirono from Tokyo University of Marine Science and Technology for providing the valuable transcriptome data and advice throughout this study. We thank the Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University for providing access to equipments.

Funding: This work was supported by grants from Thailand National Research Fund, Prince of Songkla University, grant No. SCI6405032a. Support was additionally received from the Japan Science and Technology Agency/Japan International Cooperation Agency, Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development, SATREPS (JPMJSA 1806), Project for Utilization of Thailand Local Genetic Resources to Develop Novel Farmed Fish for Global Market (Thai Fish Project).

Conflict of interest: The authors declare that they have no competing interests.

Author Contribution statement: T.S. prepared figure 1-9 and draft the manuscript., T.O. initiated the idea, funding acquisition and experimental design., A.S. sample collection., J.B. prepared figure 6-8., C.S. prepared figure 5., M.W. initiated the idea, funding acquisition, experimental design, prepared figure 6-8, writing, review and editing the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

เอกสารวิจัยนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้รับทุนจากกองทุนวิจัยและนวัตกรรม สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (TNRR) ตั้งแต่วันที่ 19/06/2024 ถึง 30/09/2025 รหัสโครงการ D539RG38

Abstract

Banana prawn (*Fenneropenaeus merguiensis*) is a valuable prawn in the Thailand market. However, cultivation of this species is limited owing to difficulty in culture management and limited knowledge of reproduction. Therefore, we studied the gene expression and molecular mechanisms involved in oogenesis for elucidating ovarian germ cell development in banana prawns. Tissue-specific distribution of certain genes identified from previous transcriptome data showed that *FmCyclinB, FmNanos*, and nuclear autoantigenic sperm protein (*FmNASP*) were only expressed in gonads. *In situ* hybridization (ISH) of these three genes showed different expression patterns throughout oogenesis. *FmCyclinB* was highly expressed in pre-vitellogenic oocytes. *FmNanos* was expressed at almost the same level during oogenesis, but showed the most expression in late pre-vitellogenic stages. Based on the highest expression of *FmCyclinB* and *FmNanos* in mid pre-vitellogenic and late pre-vitellogenic oocytes, respectively, we suggested that *FmNanos* may suppress *FmCyclinB* expression before initiation of vitellogenesis. Meanwhile, *FmNASP* expression was detected only in pre-vitellogenesis. Moreover, real-time PCR analysis of *FmNASP* expression was supported by *FmNASP* ISH analysis based on high expression of *FmNASP* in sub-adult ovaries, which contain most of pre-vitellogenic oocytes. In this study, we found three reliable ovarian markers for banana prawn and also found a dynamic change of molecular mechanism during the sub-stage of pre-vitellogenesis. We determined the expression levels of these genes involved in oogenesis. Our findings provide information for further studies on banana prawn reproduction which may assist in their cultivation in Thailand.

Keywords: Ovarian germ cell-specific genes, molecular marker, oogenesis, *in situ* hybridization, banana prawn, *Fenneropenaeus merguiensis*

เอกสารวิจัยนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยบูรพา
โดย ธนิพัฒ ศรีพงษ์ รหัส D53983G38 วันที่ 19/08/2021
ตรวจสอบโดยระบบตรวจสอบงานวิจัยไทย (THAIRR)

1. Introduction

The aquaculture sector and fisheries support the livelihood of people worldwide. Shrimps and prawns represent one of the most important commodity traded accounting for 16% of the total value of internationally traded fish products in 2019 (FAO 2020). However, aquaculture of the shrimp and prawn group mainly includes *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* cultivation alone. Most species in this group are captured in fishery. Banana prawn *(Fenneropenaeus merguiensis)* is one of the most economically important species in Thailand. However, banana prawn sold in markets are mainly sourced from the wild owing to limited success in farming based on high mortality of premature prawns and difficulty in culture management. Moreover, knowledge on banana prawn reproduction is still limited when compared to that of other shrimps or prawns, such as black tiger shrimp, pacific white shrimp, and giant freshwater prawn. Therefore, to improve the aquaculture of banana prawn, the development and mechanism of reproduction and ovarian maturation in banana prawn should be elucidated.

Recently, transcriptomic data analysis of banana prawn ovaries (Ikuo Hirono, unpublished data) revealed various genes that may be related to germ cell development in banana prawn, including cyclin A, cyclin B, cyclin E, Nanos, meiosis regulator and mRNA stability factor 1 (*MARF1*), and nuclear autoantigenic sperm protein (*NASP*). In black tiger shrimp, quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) studies have reported that cyclin A gene expression is higher in ovaries of brood stock than in juvenile prawns and cyclin B gene expression is higher in stage IV ovaries than in stage I ovaries (Visudtiphole et al. 2009). A pull-down assay analysis of cyclin E gene in black tiger shrimp showed interaction with cyclin-dependent kinase 2 which is a key mediator that controls G1/S transition (Zhao et al. 2016). The *NANOS* gene in humans is required for maintenance of undifferentiated

เอกสารวิจัยนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของ
ใคร ธนิษฐ ศรีพงษ์ D5398G38
ภาควิชาบัณฑิตวิทยาลัยไทย (TNRR)
ได้รับเมื่อ 19/06/2024

spermatogonia (Krausz et al. 2015) and knockdown of *Nanos1* gene decreases the number of primordium germ cells in gonads of *Xenopus* (Lai et al. 2011). The *MARF1* gene is required for female meiotic progression in humans (Nishimura et al. 2018) and regulates Nanos protein expression for oocyte maturation in fruit fly (Kawaguchi et al. 2020). The *NASP* gene expression is higher in the ovaries than that in the testes in black tiger shrimp (Preechaphol et al. 2007) and it is expressed in all stages of ovaries in white shrimp (Yan et al. 2016). However, there are no reports on the expression or mechanisms of these genes in banana prawn.

Gene expression and molecular mechanisms involved in oogenesis are essential for elucidating the process of ovarian germ cell development to improve banana prawn aquaculture. In this study, we aimed to identify germ cell marker genes by screening genes of interest via reverse transcription-PCR (RT-PCR). Genes which were expressed in gonads alone were further analyzed via sequencing and studied for expression pattern and localization in ovarian germ cells via *in situ* hybridization histochemistry (ISH). The expression level of each gene was validated by quantitative real-time PCR. This study provides data for understanding the mechanism of ovarian germ cell development to improve banana prawn breeding.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ทางการค้า โดย ธนดล ศรีพงษ์ ID5398G38 วันที่ 19/06/2024 จากระบบจัดเก็บข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Banana prawns were collected from Trang Coastal Fisheries Research and Development Center, Trang, Thailand. Prawns were cultured at aquaculture building in Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand, in re-circulating sea water (30 ppt salinity) at 28–30°C, pH 7.4–8.5. Prawns were fed with commercial feed twice per day (Thai Luxe Enterprises PCL, Thailand). All experiments were performed according to the

Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals, Prince of Songkla University (approval no. 27/2020).

2.2 Tissue-specific distribution of gene expression

Total RNA was extracted from the testis, ovary, vas deferens, intestine, brain, heart, hepatopancreas, muscle, and thoracic ganglion of male and female banana prawns (N = 5) using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's protocol. The first-strand cDNA was synthesized using random primers and AMV reverse transcriptase enzyme (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's protocol. The cDNA from each organ was amplified using various primers (Table 1) that were designed from banana prawn transcriptome sequence results (Ikou Hirono, unpublished data). A pair of universal actin gene primers were used as an internal control. The PCR reaction mix comprised 500 ng cDNA, 250 mM dNTPs, 1 pmol of each primer, 2.5 mM $MgCl_2$, 1× GoTaq® Flexi buffer, and 0.25 units GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). Amplification was performed with SimpliAm™ Thermal Cycler (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at annealing temperature and annealing time for each primer, with a final elongation step at 72°C for 7 min. The PCR products were loaded in a 1.5% agarose gel that was prepared using GelRed® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, Fremont, CA, USA). The electrophoresis voltage was 100 V using 0.5× TAE buffer for 30 min. The gel pictures were captured.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนพล ศรีพงษ์ 6539823 วันที่ 19/08/2021 จากระบบฐานข้อมูลงานวิจัยไทย (THAIRR)

2.3 Sequence analysis

The sequences of genes expressed in reproductive organs were analyzed for predicting functions. The amino acid sequence of each gene-coding protein was analyzed for determining phosphorylation sites and kinase motifs using NetPhos 3.1 sever (DTU Health

Tech, Lyngby, Denmark). Multiple sequence alignment was performed with sequences of other crustacean species using GenDoc program, and a phylogenetic tree was constructed using sequences of other organisms using MEGA version 7.0 via the Neighbor-Joining method based on the Poisson model.

2.4 Cloning of partial *FmCyclinB, FmNanos*, and *FmNASP* genes

Total RNA was extracted from ovaries using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) and cDNA was synthesized using AMV transcriptase enzyme (Promega) as described in section 2.2. The partial *FmCyclinB, FmNanos*, and *FmNASP* genes were amplified using banana prawn ovary cDNA. The PCR product of each gene was purified using QIAquick® PCR & Gel Cleanup kit (Qiagen, Hilden, Germany). The purified cDNA fragments were cloned into pGEM®-T easy vector (Promega). Recombinant plasmids were sequenced using Sp6 and T7 primers.

2.5 In situ hybridization (ISH)

ISH was performed as described by Nagasawa et al. (2009) and Okutsu et al. (2010) with minor adjustment. Briefly, each recombinant plasmid was transcribed into antisense and sense RNA probes using digoxigenin (DIG) RNA Labeling kit (SP6/T7) (Roche, Basel, Switzerland). For ISH, the ovaries of banana prawns were fixed in *Bouin*'s fixative at 4°C for 7 h and then placed in 70% ethanol/RNase-free water for 24 h at 4°C. Dehydration was performed in a series of ethanol solutions followed by embedding samples into paraffin. Each paraffin tissue was cut into 5 µm serial sections. The paraffin sections were deparaffinized and hydrated in xylene-ethanol series and then treated with proteinase K (Invitrogen), acetylated, and hybridized with hybridization solution of 1 µg DIG-labeled antisense or sense RNA probe at 65°C for 18 h. The sections were then washed in 2×

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนพัต ศรีพงษ์ รหัส 6530080G38 วันที่ 19/06/2024 จากวิทยานิพนธ์ต้นฉบับฉบับเต็มที่ (TNRR)

SSC/50% formamide at 65°C for 30 min twice, in 1× SSC/50% formamide at 65°C for 20 min thrice, and in 0.5× SSC/1× Tris-buffered saline and Tween 20 (TBST)/25% formamide at 65°C for 10 min once. Nonspecific binding probes were digested using 10 µg/ml RNase A/NTE buffer (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, and 1 mM EDTA) at 37°C for 10 min, washed twice in NTE for 5 min, and then washed thrice in 0.5× SSC/1× TBST at 65°C for 20 min followed by three washes in 1× TBST at 25 °C for 5 min. Nonspecific binding was blocked in blocking Reagent (Roche)/1× TBST for 15 min at room temperature in a moist chamber. The sections were incubated with anti-DIG-AP Fab fragments (Roche) (diluted 1:500 in blocking/1× TBST) at room temperature for 90 min. The sections were then washed thrice in 1× TBST for 5 min followed by once in NTMT solution (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL pH 9.5, 50 mM $MgCl_2$, and 0.1% Tween 20). The sections were detected in detection buffer [0.0035% nitroblue tetrazolium (Promega) and 0.0018% 5-bromo-4-chloro-3-iodolyl phosphate (Promega) in NTMT] at room temperature in the dark. After the reaction occurred, the slides were counterstained with Nuclear Fast Red (Abcam, Cambridge, United Kingdom) for 5 min. The sections were observed under a light microscope (Olympus-IX 70, Olympus, Tokyo, Japan).

2.6 Real-time PCR

Total RNA was extracted from sub-adult and adult ovaries (N = 5) using TRIzol™ Reagent (Invitrogen) and cDNA was synthesized using AMV transcriptase enzyme (Promega) as described in section 2.2. Each 100 ng cDNA sample was amplified using primers listed in Table 2. Beta-actin gene (universal*Actin*-F and universal*Actin*-R) was used as a reference gene. The semi-quantitative RT-PCR reaction was performed using Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and subjected to real-time PCR analysis (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad, Hercules, CA,

เอกสารฉบับนี้ได้รับการป้องกันลิขสิทธิ์ โดย ธนกฤต ศรีพงษ์ รหัส 6505398G38 จากวิทยานิพนธ์ต้นฉบับในคลังงานวิจัยไทย (THESIS) วันที่ 19/06/2024

USA). Amplification was initiated at 94°C for 5 min, followed by 39 cycles at annealing temperature and annealing time for each primer. Dissociation curve analysis was subsequently performed at 95°C for 20 s, 55°C for 20 s, and 95°C for 20 s.

3. Results

3.1 Tissue-specific distribution of genes

The tissue specificity of candidate genes was examined via RT-PCR analysis using various somatic organs and reproductive organs, which contain germ cells and/or gametes (Fig. 1). *FmCyclinB* transcripts were detected in the testis, ovary, and vas deferens; *FmNanos* transcripts were detected in the ovary alone; and *FmNASP* transcripts were detected in the testis and ovary. In contrast, the transcripts of these genes were detected in none of the somatic tissues. These results indicated that *FmCyclinB, FmNanos,* and *FmNASP* were specific to gonads. However, *FmCyclinA, FmMARF1*, and *FmCyclinE* expression was not specific to gonads alone; therefore, we selected *FmCyclinB, FmNanos,* and *FmNASP* for further study.

3.2 Sequence analysis

The full-length cDNA of *FmCyclinB* (1,486 bp), *FmNanos* (2,700 bp), and *FmNASP* (2,420 bp) were obtained from ovarian transcriptomic data of banana prawns (Ikuo Hirono, unpublished data). The sequences were analyzed for phosphorylation site and sequence motif. The proteins contained various phosphorylation sites and kinase motifs (FmCyclinB (Fig. 2a), FmNanos (Fig. 3a), and FmNASP (Fig. 4a)). The number of phosphorylation residues and type of kinase motif are presented in Table 3. Kinase motifs such as PKA, PKC, CKII, ATM, DNAPK, and cdc2, which are kinase motifs required for DNA repair

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเปิดเผยภายใต้ลิขสิทธิ์ 19/06/2024
โดย ธนกฤต ศรีสุพร D5398G38
จากวิทยานิพนธ์ของหอสมุดงานวิจัยไทย (TNRR)

and cell cycle, were found in the three protein sequences. However, PKG, CKI, p38MAPK, and cdk5 kinase motifs were only found in FmNanos and FmNASP. FmCyclinB also contained the INSR kinase motif similar to FmNanos and EFGR kinase motif in FmNASP. Notably, the RSK and SRC kinase motifs were only found in FmCyclinB and FmNanos, respectively.

The amino acid sequences of banana prawn were aligned with those of other organisms and phylogenetic trees were constructed which showed that FmCyclinB (Fig. 2b), FmNanos (Fig. 3b), and FmNASP (Fig. 4b) were clustered in the shrimp group. FmCyclinB was closest to Cyclin B of *P. monodon* (accession no. ACH72072.1), FmNanos was closest to Nanos of *Penaeus chinensis* (accession no. XP_047487687.1), and FmNASP was closest to NASP of *P. vannamei* (accession no. ALR99738.1). Moreover, the amino acid sequence of banana prawn was analyzed for multiple sequence alignment with other shrimp species. FmCyclinB sequence alignment showed a highly conserved region with almost all shrimp species except *P. vannamei* (ACI46952.1; Fig. 2c). FmNanos sequence alignment showed a highly conserved region only in two Cys-Cys-His-Cys zinc-finger motifs at a carboxyl side as well (Fig. 3c), which are hallmarks for Nanos proteins (Hashimoto et al. 2010). FmNASP sequence alignment showed a highly conserved region with almost all species (Fig. 4c) except for *P. monodon* (accession no. ACM66845.1).

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนกฤต ศรีเพชร ID5398G58 วันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยแห่งชาติ (TNRR)

3.3 Characterization of banana prawn ovarian cells

The ovaries of banana prawn were observed and oocytes were characterized using a histological method. Oocytes were classified into six stages according to morphology of the nucleus, oocyte size, and granulosa cell layer (Yano 1988; Wang et al. 2020). Oogonia (OG) were 8–10 μm in diameter shown as a large nucleus located at the center surrounded by a thin layer of cytoplasm. The nucleus contained dispersed chromatin (Fig. 5a). The first

stage previtellogenic oocytes (1PROs) were 10–20 µm in size and oval shape; they showed a relatively thicker cytoplasm layer which has a basophilic property, and more nucleoli appeared at the periphery of nucleus. 1PRO was accompanied by follicle cells (Fig. 5b). The second stage previtellogenic oocytes (2PROs) were 20–90 µm in size and of polygonal cell shape; they contained a perinucleolus and were accompanied by follicle cells (Fig. 5c). The third stage previtellogenic oocytes (3PROs) were 80–160 µm is size and of large polygonal cell shape; the cytoplasm retained the basophilic property. Follicle cells differentiated into a granulosa layer and a theca layer around each cell of 3PROs (Fig. 5d). The vitellogenic oocytes (VOs) were 160–400 µm in size; the cytoplasm showed vitellogenesis with an eosinophilic property and surrounded by a granulosa layer (Fig. 5e). The mature oocytes (MOs) were 400 µm in size at the yolk stage (Fig. 5f).

3.4 Localization of mRNA-positive cells in ovaries of banana prawn via ISH analysis

Banana prawn ovary sections were hybridized with *FmCyclinB, FmNanos,* and *FmNASP* RNA-probes. ISH analysis showed that *FmCyclinB*-antisense probes were detected as positive strong signals in the cytoplasm of 1PROs, 2PROs, and 3PROs. 2PROs showed the most intensive *FmCyclinB*-antisense probe signal followed by those in 3PROs and 1PROs, while VOs and MOs, which were in the vitellogenic stage, showed a weak signal. Moreover, OG did not show a positive signal of *FmCyclinB*-antisense probe (Fig. 6).

Serial ovary sections hybridized with *FmNanos*-antisense probe showed the strongest positive signals in 3PROs, while 1PROs, 2PROs, VOs, and MOs showed slightly positive signals. However, no positive signal was observed in OG (Fig. 7). Analysis of *FmNASP*-antisense probe hybridized with ovarian sections revealed positive signals in PROs alone; the most intensive signal to less intensive signal was observed in the following order:

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้ง 19/08/2021 โดย ธนัฏ ศรีพงษ์ D53RG38 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยจุฬาฯ (TU-RR)

2PRO, 1PRO, and 3PRO. In contrast, a positive signal was not found in OG, VOs, and MOs (Fig. 8). The positive signal of each antisense RNA-probe was not observed in Fcs and somatic tissues around ovarian germ cells, and sense RNA-probe signals were not observed in any ovary sections.

3.5 mRNA expression determined via real-time PCR

The relative mRNA expression level of each gene was determined via real-time-PCR in ovarian tissues of sub-adult and adult banana prawns (Fig 9). The mRNA expression levels of *FmCyclinB* and *FmNanos* were slightly higher in sub-adult prawns than in adult prawns. These results were in agreement with ISH results suggesting that the mRNA transcripts of these two genes were maintained throughout oogenesis. *FmNASP* expression was the highest in sub-adult shrimps. This result supports the ISH results that *FmNASP* expression was only detected in pro-vitellogenic stages.

4. Discussion

In this study, we identified germ cell-specific genes from the ovarian transcriptome of banana prawns. Three genes were only expressed in the gonads, including *FmCyclinB, FmNanos*, and, *FmNASP*. We characterized *FmCyclinB, FmNanos*, and *FmNASP* via sequence and mRNA expression analyses. ISH analyses revealed that the three genes showed different expression patterns in ovaries. *FmCyclinB* and *FmNanos* were expressed throughout oogenesis, whereas *FmNASP* was highly expressed during pre-vitellogenesis alone.

FmCyclinB was highly expressed in PROs during oogenesis. *FmCyclinB* was initially expressed in 1PROs and the expression level gradually decreased in 3PROs. By the 2PRO stage, the strongest accumulated signal was observed, and *FmCyclinB* still showed a faint signal in VOs. *FmCyclinB* expression at the late stages of oocyte development may play a role

เอกสารวิจัยนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของ ... ใช้ได้ถึงวันที่ 19/06/2024 ... (TNRR)

similar to that of Cyclin B in *Drosophila* and *Xenopus* that has been reported as a maternal molecule required in germline development (Nakahata et al. 2001; Kadyrova et al. 2007). Our findings were similar to Cyclin B1 gene expression detected in *Mallotus japonicus* via ISH (Qiu and Yamano 2005). In *M. japonicus*, Cyclin B1 gene expression is observed in OG and PROs, and it accumulates at the late stage of pre-PROs. However, no expression is detected in VOs that contradicts our finding. Moreover, our sub-type characterization of pre-vitellogenesis revealed relatively more dynamic expression of *FmCyclinB*.

FmNanos expression was detected throughout oogenesis similar to *FmCyclinB*; however, *FmNanos* was expressed at almost the same level. The results were similar to Nanos protein expression in all stages of *Bombyx mori* oocytes, which was analyzed via immunohistochemistry (Zhao et al. 2008). Previously, *Nanos* RNA has been detected in early stages of embryos in *Drosophila* (Lehmann and Nusslein-Volhard 1991), *Apis mellifera* (Dearden 2006), and *B. mori* (Zhao et al. 2008). Based on these reports, we speculated that *FmNanos* expression accumulated in MOs to play a role as maternal effector molecules, which are required for germ cell gene expression and localization in embryo development.

FmCyclinB and *FmNanos* were expressed during oogenesis. The highest expression level of *FmCyclinB* was detected in 2PROs while that of *FmNanos* was detected in 3PROs. From these results, we suggested that the increase in *FmNanos* expression level in 3PROs may suppress *FmCyclinB* expression before VO development, which was supported by previous findings. Both Cyclin B and Nanos genes have been reported as maternal molecules in *Drosophila* and *Xenopus;* Nanos protein functions together with Pumilio protein as a translation regulator required to suppress maternal Cyclin B mRNA expression and delay cell cycle during oocyte maturation (Parisi and Lin 2000; Nakahata et al. 2001; Kadyrova et al. 2007)).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น 19/06/2024 โดย ธนิกุล ศรีพงษ์ D5398G38 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (TNRR)

FmNASP expression was only found in PROs with the highest signal in 1PRO and 2PRO which rapidly decreased in 3PROs. These results were supported by real-time PCR results that showed high expression of *FmNASP* in sub-adult ovaries, which contained most of the PROs. However, these results contradict those of N. Karoonuthaisiri et al. (2009), who reported that *NASP* expression level in *P. monodon* is significantly increased in MOs and expression level in adults is greater than that in sub-adults based on microarray and real-time PCR. The results from real-time PCR did not clearly explain which stage of ovarian germ cell contained *NASP* expression because each stage of shrimp ovary contains various types of ovarian germ cells. Especially, genes expressed in PROs could be found in every stage of ovarian development. Thus, our results from ISH explained the more precise trends in expression. Moreover, multiple sequence alignment of NASP amino acid sequences showed that amino acids at 320–380 of *FmNASP* differed from that in the *P. monodon* sequence. Moreover, amino acids at 460–500 and 640–680 showed a gap in NASP sequence of *P. monodon*. Both the different sequence and gap predicted the serine and tyrosine phosphorylation residues and ATM, PKC, CKI, CKII, cdc2, and DNAPK motifs. From these differences, we suggested that the *NASP* genes of banana prawn and *P. monodon* may play different roles during oogenesis.

เอกสารฉบับนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โดย ธนกล ศรีพงษ์ ID5398G38 วันที่ 19/06/2021
สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น (TU-RR)

5. Conclusion

We found three gonad-specific gene markers that are specific to banana prawn. Based on ISH, we evaluated the expression and localization of these genes in banana prawn ovarian germ cells. Our finding will assist studies on molecular mechanisms of ovarian cell gene regulation during oogenesis and female reproduction in banana prawn.

6. References

Dearden PK (2006) Germ cell development in the honeybee (*Apis mellifera*); *vasa* and *nanos* expression. BMC Developmental Biology 6:1-14

FAO (2020) *Penaeus merguiensis* de Man 1888. Fisheries and Aquaculture. http://www.fao.org/fishery/species/2583/en.

Hashimoto H, Hara K, Hishiki A, Kawaguchi S, Shichijo N, Nakamura K, Unzai S, Tamaru Y, Shimizu T, Sato M (2010) Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. EMBO reports 11:848-853

Kadyrova LY, Habara Y, Lee TH, Wharton RP (2007) Translational control of maternal *cyclin B* mRNA by nanos in the *Drosophila* germline. Development 134:1519-1527

Karoonuthaisiri N, Sittikankeaw K, Preechaphol R, Kalachikov S, Wongsurawat T, Uawisetwathana U, Russo JJ, Ju J, Klinbunga S, Kirtikara K (2009) *Repro*Array^{GTS}: a cDNA microarray for identification of reproduction-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon* and characterization of a novel *Nuclear Autoantigenic Sperm Protein* (*NASP*) gene. Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics 4:90-99

Kawaguchi S,Ueki M, Kai T (2020) *Drosophila* MARF1 ensures proper oocyte maturation by regulating nanos expression. PLoS ONE 15:e0231114

Krausz C, Escamilla AR, Chianese C (2015) Genetics of male infertility: from research to clinic. Reproduction 150:R159-174

Lai F, Zhou Y, Luo X, Fox J, King ML (2011) *Nanos*1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline. Mechanisms of Development 128:153-163

Lehmann R, Nusslein-Volhard C (1991) The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. Development 112:679-691

Nagasawa K, Takeuchi Y, Miwa M, Higuchi K, Morita T, Mitsuboshi T, Miyaki K, Kadomura K, Yoshizaki G (2009) cDNA cloning and expression analysis of a *vasa*-like

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ในระบบคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) ได้รับการเผยแพร่ในระบบคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR) 19/06/2024

Gene in pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Fisheries Science 75:71-79

Nakahata S, Katsu Y, Mita K, Inoue K, Nagahama Y, Yamashita M (2001) Biochemical identification of *Xenopus* pumilio as a sequence-specific *cyclin B1* mRNA-binding protein that physically interacts with a nanos homolog, Xcat-2, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. Journal of Biological Chemistry 276:20945-20953

Nishimura T, Fakim H, Brandmann T, Youn JY, Gingras AC, Jinek M, Fabian MR (2018) Human MARF1 is an endoribonuclease that interacts with the DCP1:2 decapping complex and degrades target mRNAs. Nucleic Acids Research 46:12008-12021

Okutsu T, Kang BJ, Miwa M, Yoshizaki G, Maeno Y, Wilder MN (2010) Molecular cloning and characterization of *Dmc1*, a gene involved in gametogenesis, from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fisheries Science 79:961-969

Parisi M, Lin H (2000) Translational repression: a duet of *nanos* and *pumilio*. Current Biology 10:81-83

Preechaphol R, Leelatanawit R, Sittikankeaw K, Klinbunga S, Khamnamtong B, Puanglarp N, Menasveta P. (2007) Expressed sequence tag analysis for identification and characterization of sex-related genes in the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology 40:501-510

Qiu GF, Yamano K (2005) Three forms of *cyclin B* transcripts in the ovary of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*: their molecular characterizations and expression profiles during oogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 141:186-195

Wang L, Guo Q, Levy T, Chen T, Wu X (2020) Ovarian development pattern and vitellogenesis of ridgetail white prawn, Exopalaemon carinicauda. Cell and tissue research 382:367-379

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตจากผู้เขียน ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปสร้างงานอื่นใด ก่อนได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร ธนาคาร ศรีพงษ์ D5390G38 19/06/2024 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (TNRR)

Visudtiphole V, Klinbunga S, Kirtikara K (2009) Molecular characterization and expression profiles of *cyclin A* and *cyclin B* during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology 152:535-543

Yan J, Liu H, Fang Y, Cai S (2016) Molecular cloning and expression analysis of the gene encoding *Nuclear Autoantigenic Sperm Protein* from white prawn (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Fishery Sciences of China 5:1073-1079

Yano I (1988) Oocyte development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. Marine Biology 99:547-553

Zhao C, Fu MJ, Qiu LH (2016) Molecular cloning and functional characterization of *cyclin e* and CDK2 from *Penaeus monodon*. Genetics and Molecular Research 15:gmr.15038716

Zhao G, Chen K, Yao Q, Wang W, Wang Y, Mu R, Chen H, Yang H, Zhou H (2008) The *nanos* gene of *Bombyx mori* and its expression patterns in developmental embryos and larvae tissues. Gene Expression Patterns 8: 254-260

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/08/2021
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Table

Table 1 Primers used for amplifying genes in organs

Gene name	Primer name	Primer sequence	Annealing temp. and time
Cyclin A	*FmCyclinA*-F	5′-GCTGCGAAATATGAGGAGAT- 3′	56°C, 45 s
	FmCyclinA-R	5′-TATGGCAGTTCAAACGCTA- 3′	
Cyclin B	*FmCyclinB*-F	5′-GATGTGGAGGAGGAAGC-3′	60°C, 30 s
	FmCyclinB-R	5′-AGGAAGTGCAAGGGAAGG-3′	
Cyclin E	*FmCyclinE*-F	5′-CTGTGGCTATGCTCACTCCA-3′	60°C, 30 s
	FmCyclinE-R	5′-CTGTGGCTATGCTCACTCCA-3′	
Nanos	*FmNanos*-F	5′-ATTGCCAGAAATCACCAG-3′	59°C, 30 s
	FmNanos-R	5′-ATTCTGCCGTGTCAACAT-3′	
NASP	*FmNASP*-F	5′-AAGGTTGAGGCTAAGGAG-3′	62°C, 45 s
	FmNASP-R	5′-CACAGGTTCAAGAGGCAG-3′	
MARF1	*FmMARF1*-F	5′-TGAGGCTTTTCCAGTTGCTT-3′	64°C, 45 s
	FmMARF1-F	5′-TAGGGGATAGGTGCAGTTGG-3′	
Actin	universal*Actin*-F	5′-GCTACAGCTTCACCACCACCG-3′	58°C, 30 s
	universal*Actin*-R	5′-GATGTCCACGTCRCACTTCAT-3′	

NASP, nuclear autoantigenic sperm protein; MARF1, meiosis regulator and mRNA stability factor 1.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Table 2 Primers for real-time polymerase chain reaction

Gene name	Primer name	Primer sequence	Annealing temp. and time
Cyclin B	q*FmCyclinB*-F	5′-GGAAGTGGTAGAGCATGTGGAGCA- 3′	67°C, 30 s
	q*FmCyclinB*-R	5′-TTGAAGCAGGGTGAAGCGGAGG-3′	
Nanos	q*FmNanos*-F	5′-GGCAGTCCTCAGGATACATTTCAGC- 3′	67°C, 45 s
	q*FmNanos*-R	5′-GCACAGAGGGCAGACATACATTC-3′	
NASP	q*FmNASP*-F	5′-TGCCGAGACCAGTGCCAGCC-3′	67°C, 30 s
	q*FmNASP*-R	5′-CTCCGTTCTCCATGCGTGCCA-3′	
Actin	universal*Actin*-F	5′-GCTACAGCTTCACCACCACCG-3′	54°C, 30 s
	universal*Actin*-R	5′-GATGTCCACGTCRCACTTCAT-3′	

NASP, nuclear autoantigenic sperm protein.

Table 3 Sequence analysis

Gene	Nucleotide (bp)	Amino acid (residue)	Phosphorylation residue	Kinase motif
FmCyclinB	2,420	401	S = 23, T = 7, Y = 7	PKA, PKC, CKII, ATM, DNAPK, RSK, INSR, EGFR, cdc2
FmNanos	1,486	426	S = 36, T = 14, Y = 3	PKA, PKC, PKG, CKI, CKII, ATM, DNAPK, SRC, INSR, p38MAPK, cdc2, cdk5
FmNASP	2,700	686	S = 44, T = 32, Y = 6	PKA, PKC, PKG, CKI, CKII, ATM, DNAPK, EGFR, p38MAPK, cdc2, cdk5

FmNASP, banana prawn-derived nuclear autoantigenic sperm protein.

เอกสารฉบับนี้ ได้รับการนำเข้าสู่ระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR) โดย ธนัตถ์ ศรีเพชร ID5398038 เมื่อวันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Figure captions

Fig. 1. Tissue-specific distribution of candidate genes. Total RNA was isolated from T, V, O, I, B, H, Hp, M, and TG. cDNA was synthesized using *FmCyclin A* (899 bp), *FmNASP* (897 bp), *FmMARF1* (715 bp), *FmCyclin E* (574 bp), *FmNanos* (539 bp), and *FmCyclin B* (528 bp). β-Actin gene (300 bp) was amplified as an internal control. A negative control without cDNA template is shown in lane N. T, testis; V, vas deferens; O, ovary; I, intestine; B, brain; H, heart; Hp, hepatopancreas; M, muscle; TG, thoracic ganglion; *FmNASP*, banana prawn-derived nuclear autoantigenic sperm protein; MARF1, meiosis regulator and mRNA stability factor 1

Fig. 2 Sequence analysis of cyclin B. (a) Phosphorylation sites and kinase motifs of cyclin B. Letters in circles are phosphorylated amino acids, and sequences in boxes are kinase motif sequences. **(b) Phylogenetic tree analysis of banana prawn cyclin B gene with that of other species.** Phylogenetic was tree constructed using MEGA with Neighbor-Joining method based on the Poisson model. **(c) Multiple sequence alignment of banana prawn cyclin B amino acid with that of known crustacean cyclin B amino acid sequences.** The amino acid sequences were aligned using BioEdit and represented using GenDoc. Gaps that were introduced to maximize sequence homology are indicated by dashes. Shaded boxes indicate the conserved sequence. The GenBank accession numbers of the cyclin B amino acids are as follow: F.merguien (*Fenneropenaeus merguiensis*), P.monodon (*Penaeus monodon,* XP_037794731.1), M.japonicu (*Marsupenaeus japonicus,* XP_042892405.1), M.ensis (*Metapenaeus ensis,* ADI86225.1), M.affins (*Metapenaeus affinis*, ADI86226), P.clarkii (*Procambarus clarkii,* XP_045624571.1), M.nipponen (*Macrobachium nipponense*, ADB44902.1), M.rosenber (*Macrobacium rosenbergii*, ADP95148.1), P.modestus (*Palaemon modestus*, QDE09442.1), and P.vannamei (*Penaeus vannamei*, ACI46952.1)

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่
โดย ธนดล ศรีเพ็ชร ID5309638
วันที่ 19/06/2024
สงวนลิขสิทธิ์ (CARE)

Fig. 3 Sequence analysis of Nanos. (a) Phosphorylation sites and kinase motifs of Nanos. Letters in circles are phosphorylated amino acids and sequences in boxes are kinase motif sequences. **(b) Phylogenetic tree analysis of banana prawn Nanos with that of other different species.** The tree was constructed using MEGA with Neighbor-Joining method based on the Poisson model. **(b) Multiple sequence alignment of Nanos amino acid sequence with known crustacean Nanos amino acid sequences.** The amino acid sequences were aligned

using BioEdit and represented using GenDoc. Gaps that were introduced to maximize sequence homology are indicated using dashes. Conserved sequences are indicated in shaded boxes. Red and yellow boxes show specific two conserved Cys-Cys-His-Cys zinc finger motifs of Nanos. The GenBank accession numbers of the Nanos amino acids are as follows: F.merguien (*Fenneropenaeus merguiensis*), P.chinensi (*Penaeus chinensis,* XP_047487687.1), P.trituber (*Portunus trituberculatus,* XP_045137084.1), A.nasatum (*Armadillidium nasatum,* KAB7497688.1), and H.american (*Homarus americanus,* XP_042219141.1)

Fig. 4 Sequence analysis of *NASP*. (a) Phosphorylation sites and kinase motifs of *NASP*. Letters in circles are phosphorylated amino acids and sequences in boxes are kinase motif sequences. **(b) Phylogenetic tree analysis of banana prawn *NASP* with that of other species.** The tree was constructed using MEGA with Neighbor-Joining method based on the Poisson model. **(c) Multiple sequence alignment analysis of banana prawn *NASP* amino acid sequence with known crustacean *NASP* amino acid sequences.** The amino acid sequences were aligned using BioEdit and represented using GenDoc. Gaps that were introduced to maximize sequence homology are indicated by dashes and conserved regions are shown in shaded boxes. The GenBank accession numbers of the *NASP* amino acid sequences are as follow: F.merguien (*Fenneropenaeus merguiensis*), P.vannamei (*Penaeus vannamei,* ALR99738.1), P.monodon (*Penaeus monodon,* ACM66845.1). NASP, nuclear autoantigenic sperm protein

Fig. 5 Histological analysis of banana prawn ovaries. (a) OG (black arrowhead), (b) 1PRO (white arrowhead), (c) 2PRO (black arrow), (d) 3PRO (white arrow), (e) VO, (f) MO (black chevron), Fc (blackhead arrow line), Cr (whitehead arrow line). Staining with hematoxylin and eosin. Scale bars represent 10 μM in (a,b) and 20 μM in (c–f). 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod

Fig. 6 Histological characterization and cyclin B mRNA expression in ovaries of banana prawn using *in situ* hybridization. Sequential sections of the ovary were divided to stained with (a1-e1) H&E for representative cell characteristics and hybridized with (a3–e3) cyclin B antisense RNA probe while (a2–e2) sense RNA probes were used as a control. OG (black

arrowhead), 1PRO (white arrowhead), 2PRO (black arrow), 3PRO (white arrow), VO (black pentagon), MO (black chevron), Fc (blackhead arrow line), and Cr (whitehead arrow line). Scale bars represent 20 µM. OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod; H&E, hematoxylin and eosin

Fig. 7. Histological characterization and Nanos mRNA expression in ovaries of banana prawn using *in situ* hybridization. Continuous ovary sections were separated to stained with (a1–e1) H&E used as a reference cell for comparison with sections hybridized with (a3–e3) Nanos antisense and (a2–e2) sense RNA probe. OG (black arrowhead), 1PRO (white arrowhead), 2PRO (black arrow), 3PRO (white arrow), VO (black pentagon), MO (black chevron), Fc (blackhead arrow line), Cr (whitehead arrow line). Scale bars represent 10 µM in (a–d) and 20 µM in (e). OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod; H&E, hematoxylin and eosin

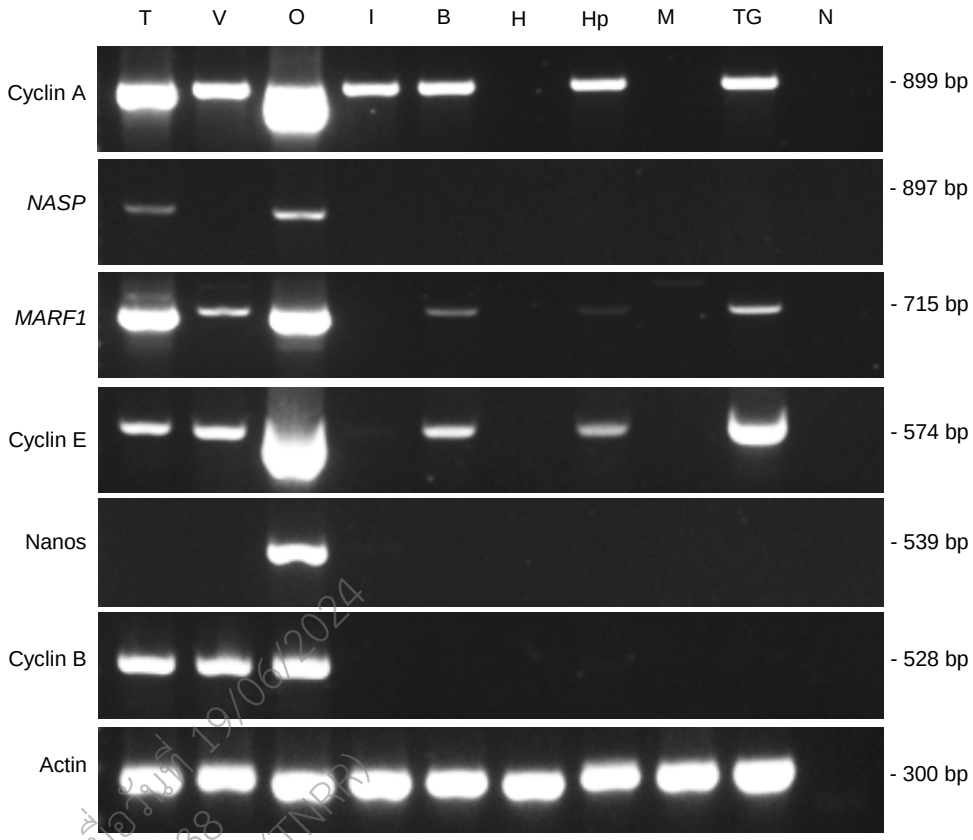
Fig. 8. Histological characterization and *NASP* mRNA expression in banana prawn ovaries using *in situ* hybridization. Serial ovary sections were sorted for staining with (a1–e1) H&E as reference ovarian cells and hybridized with (a3–e3) *NASP* antisense and (a2–e2) sense RNA probes. OG (black arrowhead), 1PRO (white arrowhead), 2PRO (black arrow), 3PRO (white arrow), VO (black pentagon), MO (black chevron), Fc (blackhead arrow line), Cr (whitehead arrow line). Scale bars represent 20 µM. NASP, nuclear autoantigenic sperm protein; OG, oogonia; 1PRO, stage 1 previtellogenic oocyte; 2PRO, stage 2 previtellogenic oocyte; 3PRO, stage 3 previtellogenic oocyte; VO, vitellogenic oocyte; MO, mature oocyte; Fc, follicle cell; Cr, cortical rod; H&E, hematoxylin and eosin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ ใช้ ธนดา ลิ้มพาณิชย์ กรุณาอ้างอิงบรรณานุกรมของวิทยานิพนธ์ (TNR) 9/06/2024

Fig. 9. Relative expression levels of ovarian germ cell-specific genes in sub-adult and adult ovaries using real-time polymerase chain reaction. Sections stained with hematoxylin and eosin used for characterizing (a) sub-adult and (b) adult ovaries. Scale bar: 20 µM. (Relative mRNA expression levels of (c) Cyclin B, (d) Nanos, and (e) *NASP* respectively between sub-adult and adult ovaries. Asterisk indicates significant differences in relative mRNA expression level ($p \leq 0.05$). NASP, nuclear autoantigenic sperm protein

Figure

Fig. 1



เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ในรูปแบบไฟล์อิเล็กทรอนิกส์ โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38 เมื่อวันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Fig. 2

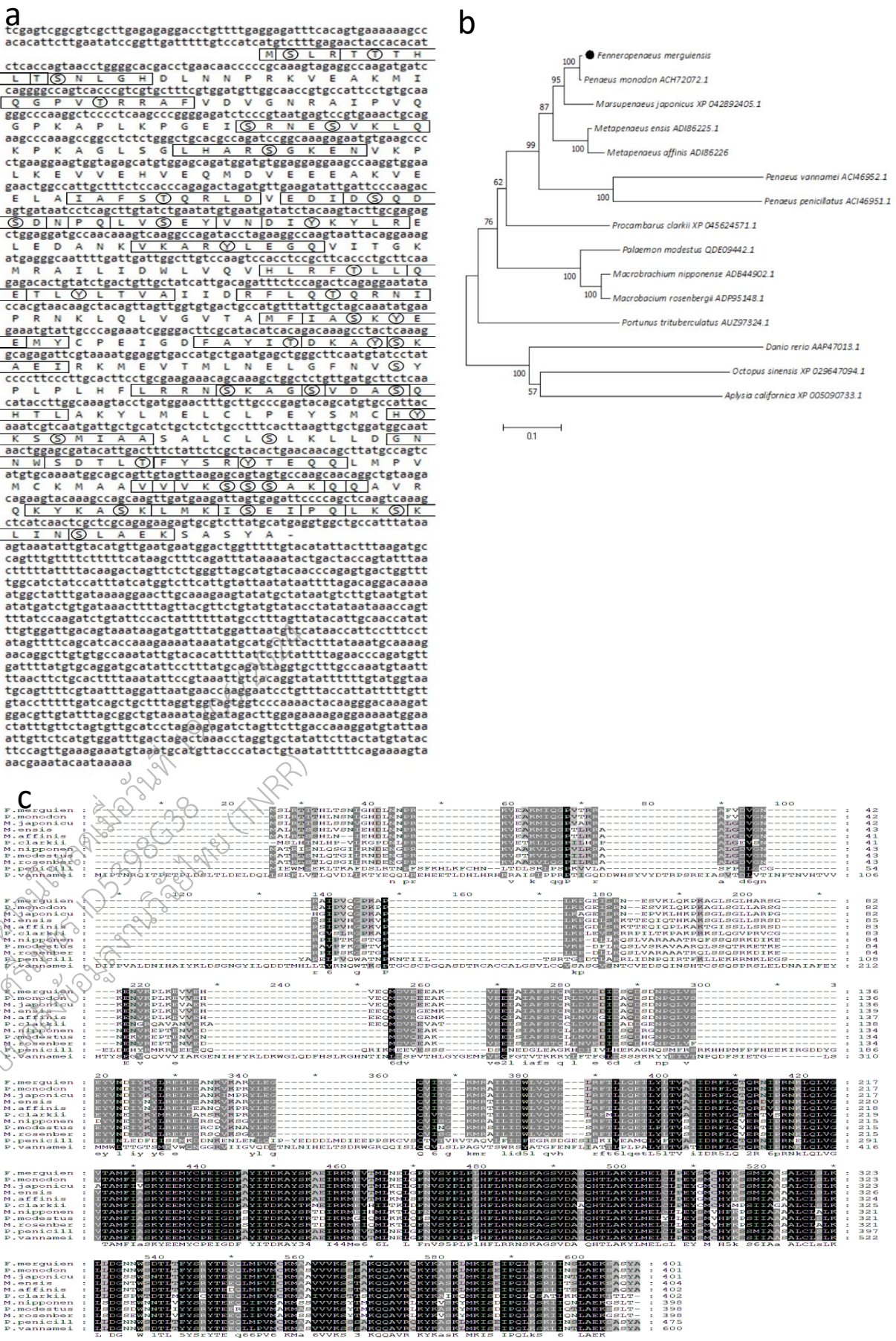

a
b
Fenneropenaeus merguiensis
Penaeus monodon ACH72072.1
Marsupenaeus japonicus XP 042892405.1
Metapenaeus ensis ADI86225.1
Metapenaeus affinis ADI86226
Penaeus vannamei ACI46952.1
Penaeus penicillatus ACI46951.1
Procambarus clarkii XP 045624571.1
Palaemon modestus QDE09442.1
Macrobrachium nipponense ADB44902.1
Macrobacium rosenbergii ADP95148.1
Portunus trituberculatus AUZ97324.1
Danio rerio AAP47013.1
Octopus sinensis XP 029647094.1
Aplysia californica XP 005090733.1
0.1
c

Fig. 3

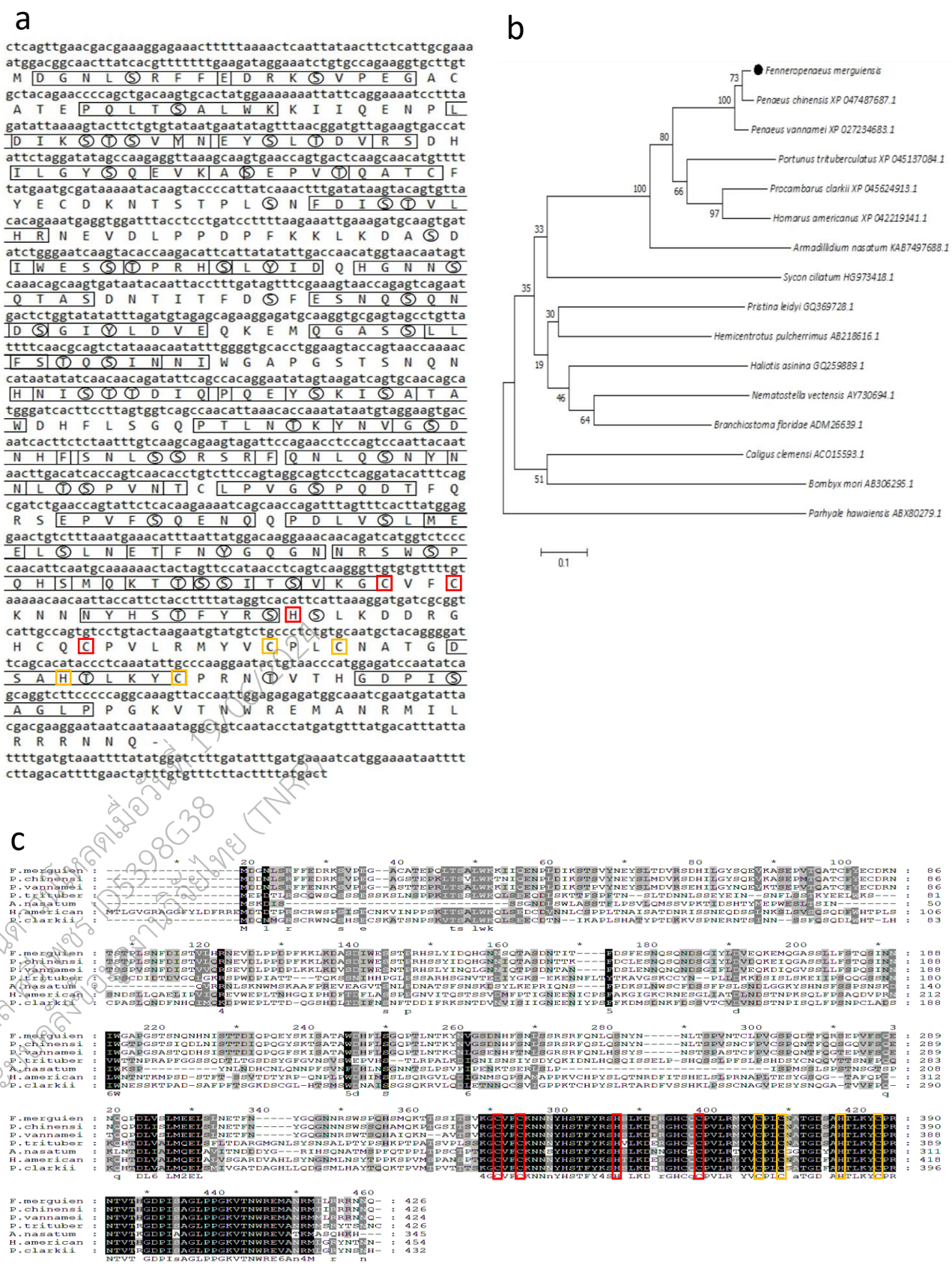

a
b
Fenneropenaeus merguiensis
Penaeus chinensis XP 047487687.1
Penaeus vannamei XP 027234683.1
Portunus trituberculatus XP 045137084.1
Procambarus clarkii XP 045624913.1
Homarus americanus XP 042219141.1
Armadillidium nasatum KAB7497688.1
Sycon ciliatum HG973418.1
Pristina leidyi GQ369728.1
Hemicentrotus pulcherrimus AB218616.1
Haliotis asinina GQ259889.1
Nematostella vectensis AY730694.1
Branchiostoma floridae ADM26639.1
Caligus clemensi ACO15593.1
Bombyx mori AB306295.1
Parhyale hawaiensis ABX80279.1
0.1
c

Fig. 4

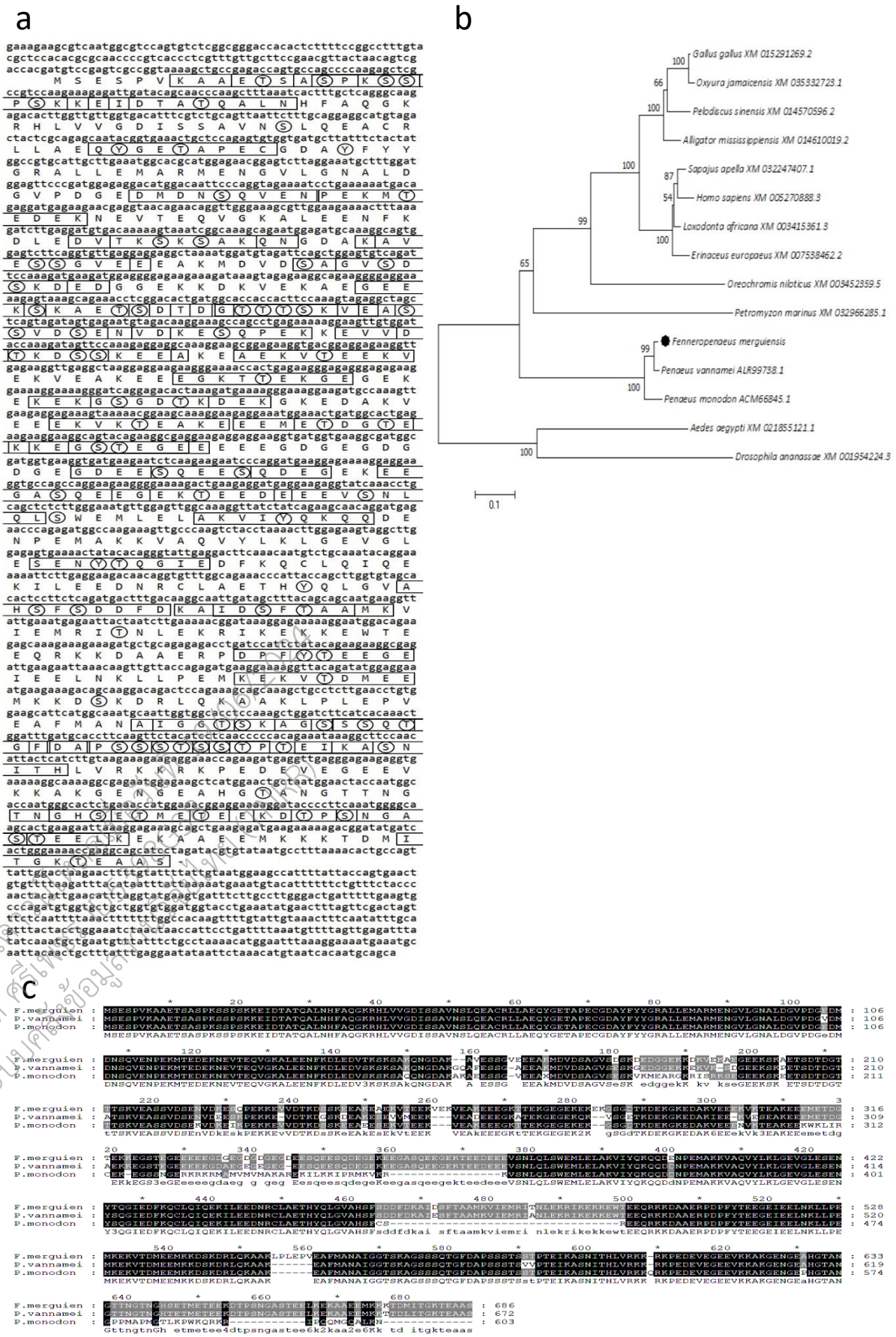
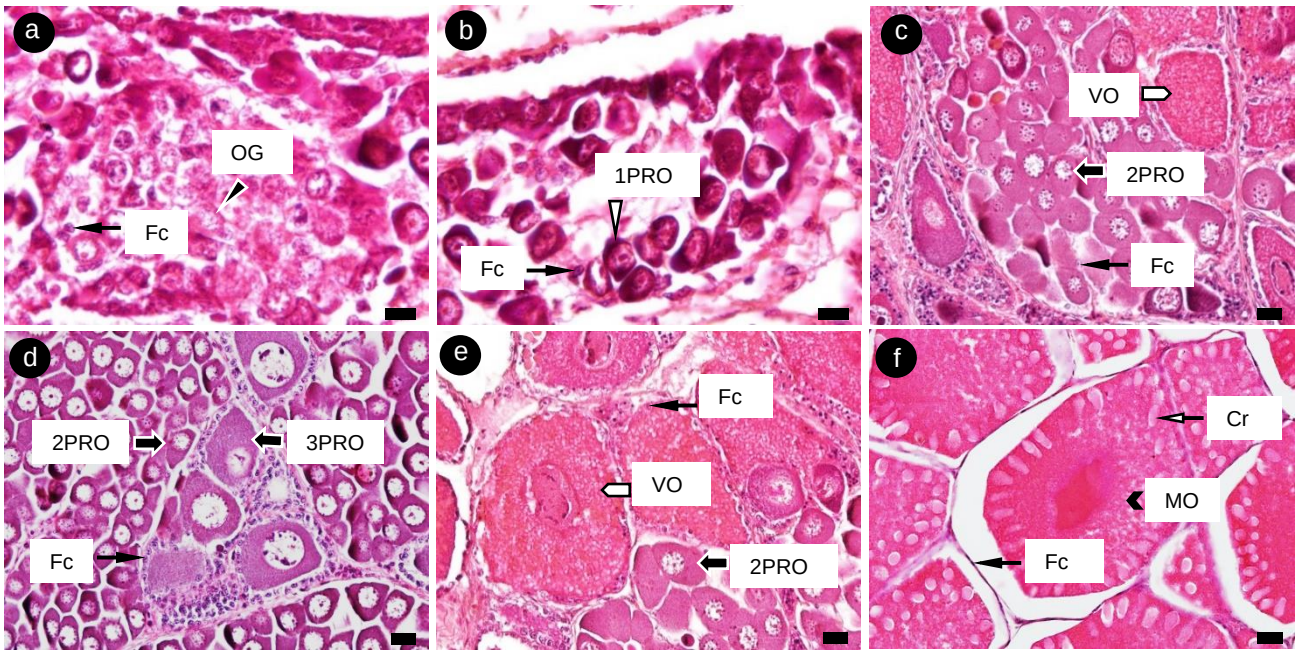

a
b
Gallus gallus XM 015291269.2
Oxyura jamaicensis XM 035332723.1
Pelodiscus sinensis XM 014570596.2
Alligator mississippiensis XM 014610019.2
Sapajus apella XM 032247407.1
Homo sapiens XM 005270888.3
Loxodonta africana XM 003415361.3
Erinaceus europaeus XM 007538462.2
Oreochromis niloticus XM 003452359.5
Petromyzon marinus XM 032966285.1
Fenneropenaeus merguiensis
Penaeus vannamei ALR99738.1
Penaeus monodon ACM66845.1
Aedes aegypti XM 021855121.1
Drosophila ananassae XM 001954224.3
0.1
c
F.merguien
P.vannamei
P.monodon

Fig. 5



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Fig. 6

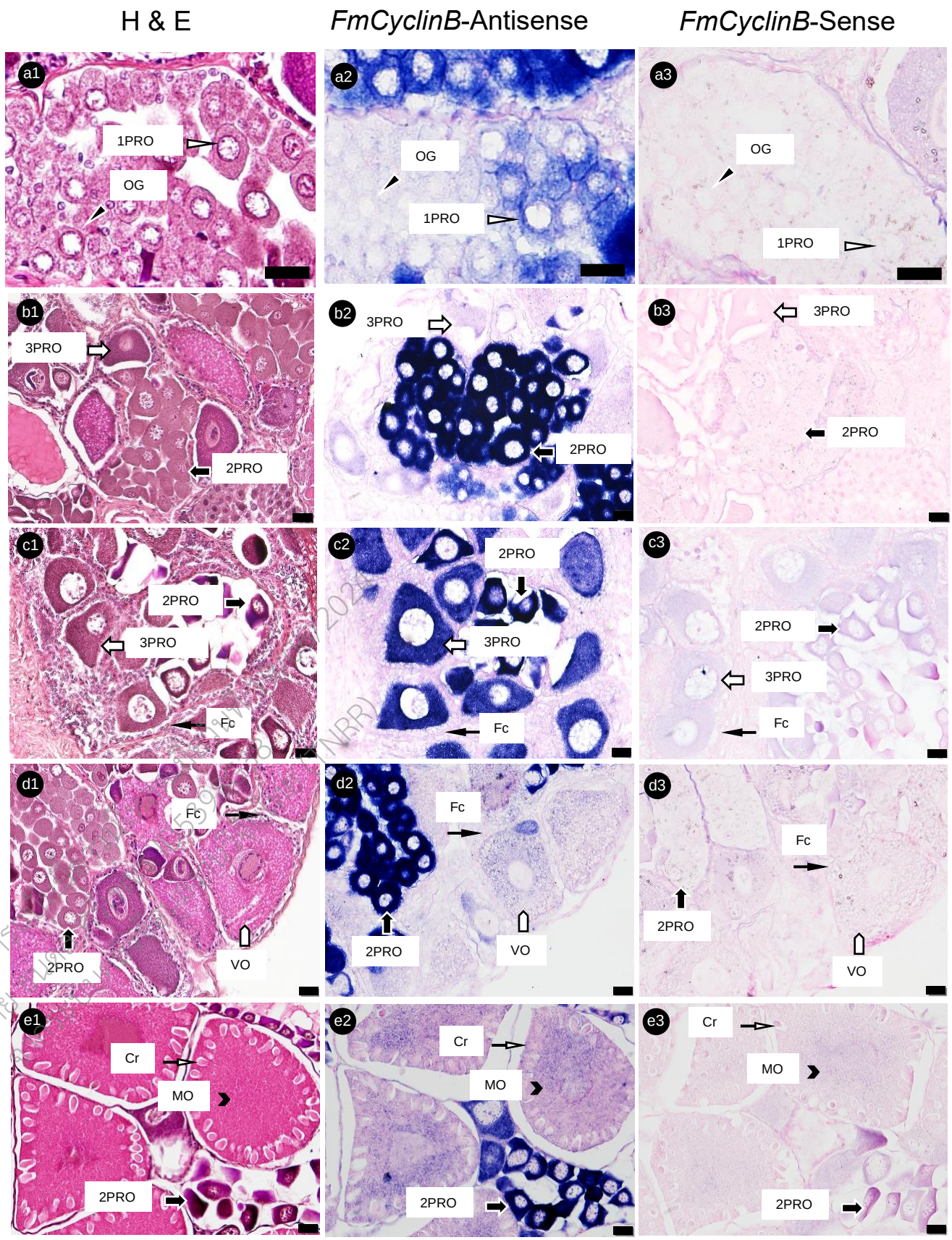

H & E
FmCyclinB-Antisense
FmCyclinB-Sense
a1
1PRO
OG
a2
OG
1PRO
a3
OG
1PRO
b1
3PRO
2PRO
b2
3PRO
2PRO
b3
3PRO
2PRO
c1
2PRO
3PRO
Fc
c2
2PRO
3PRO
Fc
c3
2PRO
3PRO
Fc
d1
Fc
2PRO
VO
d2
Fc
2PRO
VO
d3
Fc
2PRO
VO
e1
Cr
MO
2PRO
e2
Cr
MO
2PRO
e3
Cr
MO
2PRO

Fig. 7

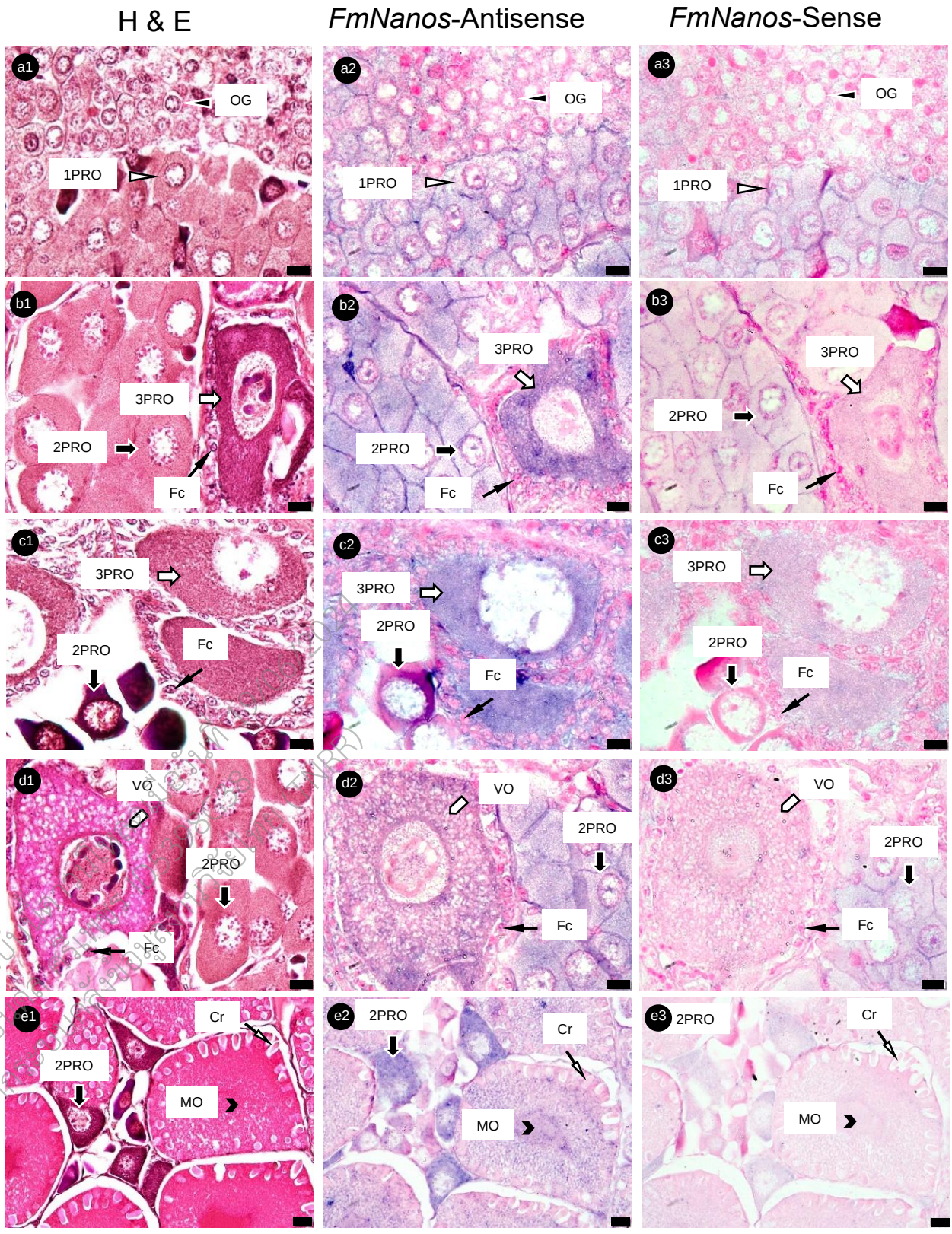

H & E
FmNanos-Antisense
FmNanos-Sense
a1
OG
1PRO
a2
OG
1PRO
a3
OG
1PRO
b1
3PRO
2PRO
Fc
b2
3PRO
2PRO
Fc
b3
3PRO
2PRO
Fc
c1
3PRO
2PRO
Fc
c2
3PRO
2PRO
Fc
c3
3PRO
2PRO
Fc
d1
VO
2PRO
Fc
d2
VO
2PRO
Fc
d3
VO
2PRO
Fc
e1
Cr
2PRO
MO
e2
2PRO
Cr
MO
e3
2PRO
Cr
MO

Fig. 8

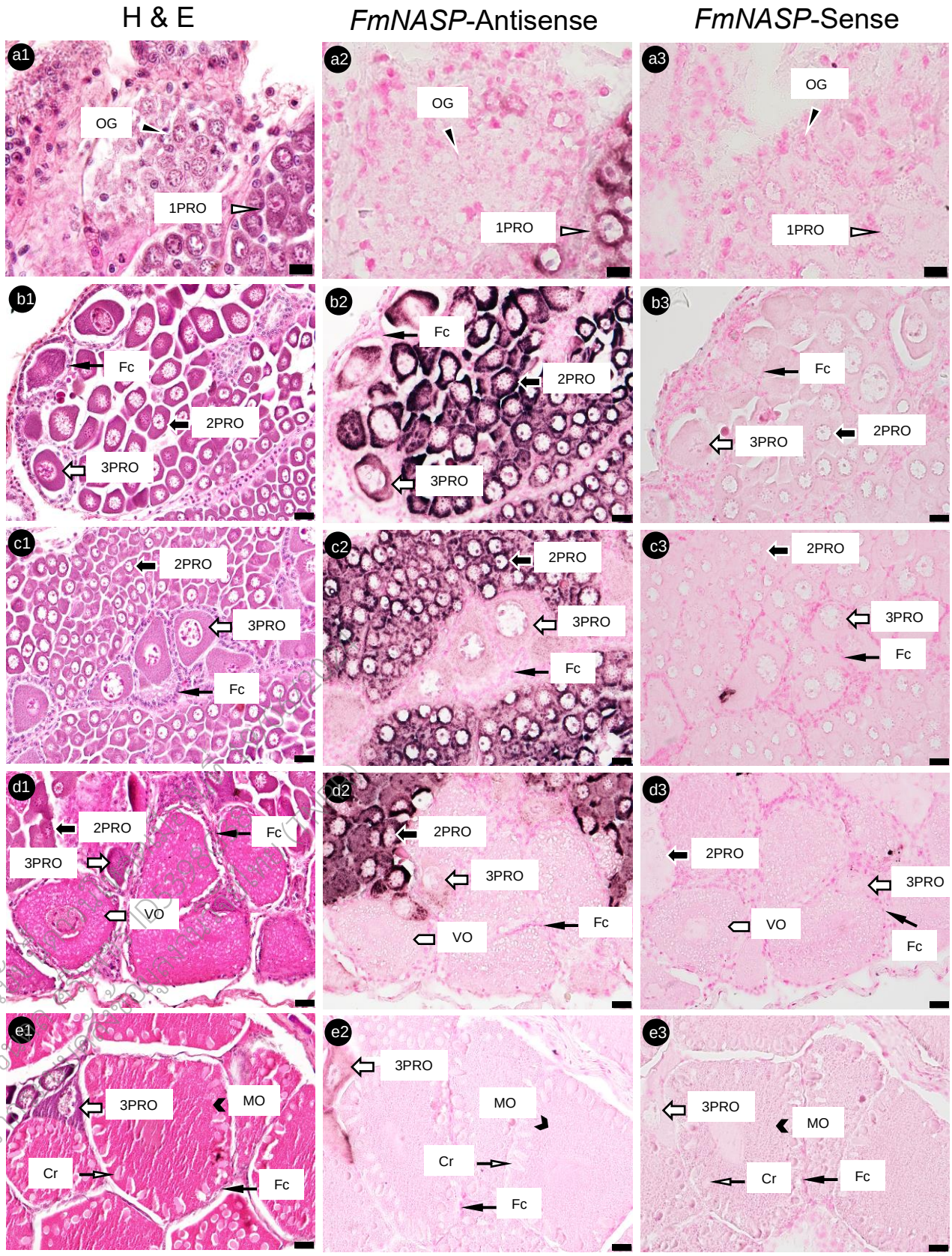
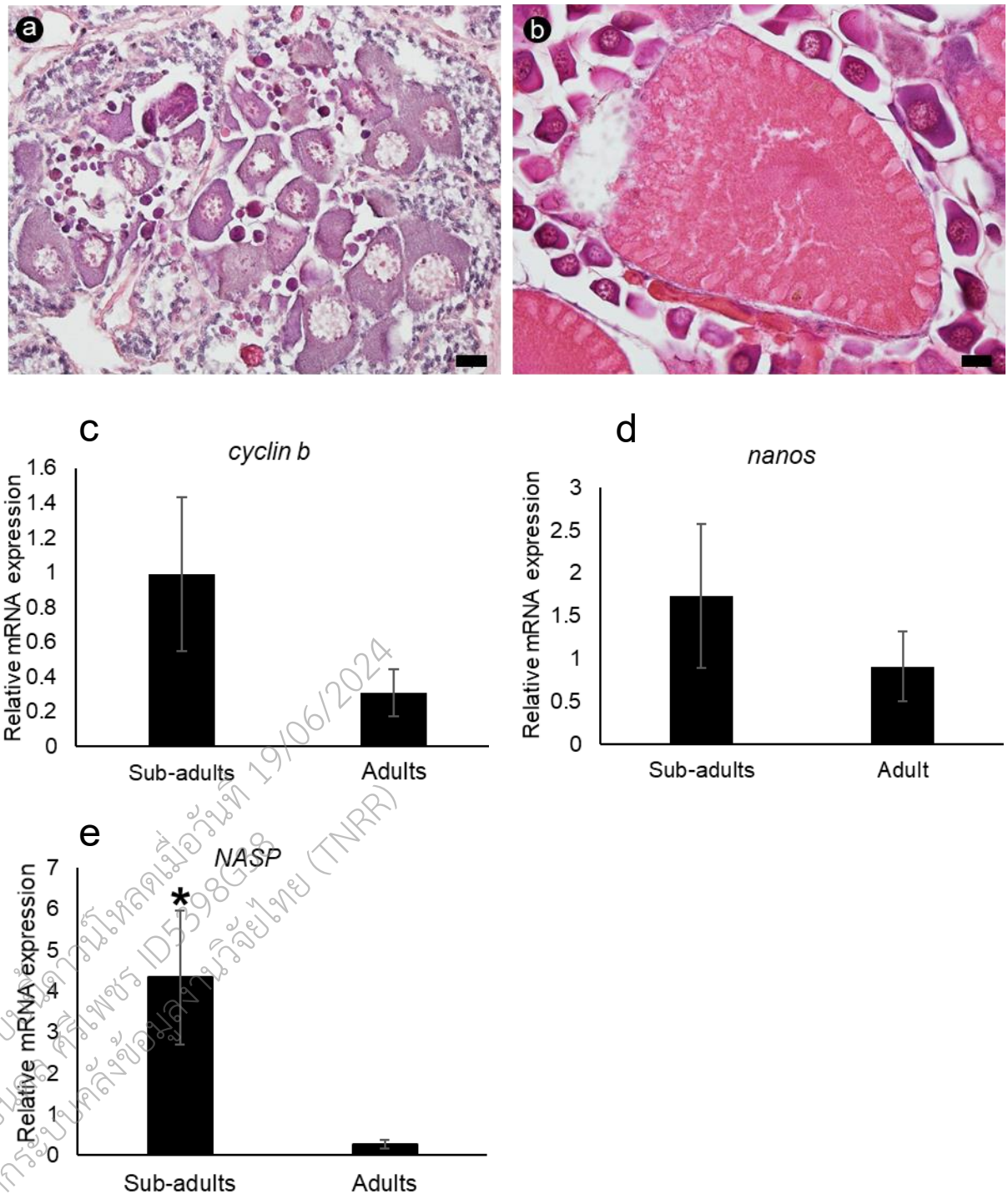

H & E
FmNASP-Antisense
FmNASP-Sense
a1
OG
1PRO
a2
OG
1PRO
a3
OG
1PRO
b1
Fc
2PRO
3PRO
b2
Fc
2PRO
3PRO
b3
Fc
2PRO
3PRO
c1
2PRO
3PRO
Fc
c2
2PRO
3PRO
Fc
c3
2PRO
3PRO
Fc
d1
2PRO
Fc
3PRO
VO
d2
2PRO
3PRO
VO
Fc
d3
2PRO
3PRO
VO
Fc
e1
3PRO
MO
Cr
Fc
e2
3PRO
MO
Cr
Fc
e3
3PRO
MO
Cr
Fc

Fig. 9



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อสงวนลิขสิทธิ์ของวิทยานิพนธ์ ID5398G38 ของ ธนพร ศรีเพชร ที่ส่งผ่านระบบคลังปัญญาจุฬาฯ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลวิจัยไทย (TNRR)

(ร่าง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการชุด การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
(ภาษาอังกฤษ) Germ Cell Transplant Technology in aquaculture

โครงการย่อยที่ 2 การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย
(Germ Cell Transplant Technology in Banana shrimp)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2021
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คณะนักวิจัย

รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2
ดร. อุไรพรรณ แซ่ตัน ผู้ร่วมโครงการย่อย ที่ 2

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2564 รหัสโครงการ SCI6405032b

ข้อมูลทั่วไป

1.ชื่อโครงการวิจัย(ภาษาไทย) **การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**

(ภาษาอังกฤษ) **Germ Cell Transplant Technology in aquaculture**

ประเภทโครงการ ☑ โครงการชุด ☐ โครงการดี่ยว

2. โครงการภายใต้ชุดโครงการวิจัย (กรอกเฉพาะชุดโครงการวิจัย)

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 2 การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย**

3. คณะผู้วิจัย

- รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าโครงการย่อยที่ 2
- ดร. อุไรพรรณ แซ่ตัน สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการย่อย ที่ 2

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID 5330230G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	7
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	9
การตรวจเอกสาร	11
วิธีการทดลอง	13
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	19
สรุปผลการทดลอง	33
เอกสารอ้างอิง	35

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Primer sequences used for PCR of Actin, Vasa741, Fm-15, COI, Vasa160	17
ตารางที่ 2	Percentage of spermatogonia extracted from testis of different sizes of *F. merguiensis*	21
ตารางที่ 3	Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into arch of hemolymph and carapace of *P. vannamei* molecular markers using Fm-15, VASA160 and VASA741	30
ตารางที่ 4	Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into **segment 1** of *P. vannamei* using molecular markers Fm-15, VASA160 and VASA741	30
ตารางที่ 5	Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into sperm sac of *P. vannamei* using molecular markers Fm-15, VASA160 and VASA741	31
ตารางที่ 6	Survival rate and fluorescent cluster rat after 1 trial transplantation in the recipient PL4, PL9 และ PL16.	32
ตารางที่ 7	การดำเนินงานวิจัยเปรียบเทียบแผนการดำเนินงานที่เสนอไว้	33
ตารางที่ 8	สรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR	34

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2023
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5390638
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการภาพประกอบ

หน้า

รูปที่ 1 Diagram of germ cell transplantation techniques in different stage of current recipient fish 11

รูปที่ 2 Dissociated Spermatogonial cells from testis of *F. merguiensis* and dyed with Trypan blue. Dead cells show in blue, live cells are white, the arrowhead indicates spermatogonia cells. 18

รูปที่ 3 Spermatogonia cells, (A) bright field, (B) spermatogonia cells dyed with PKH-26, the arrowhead indicates spermatogonia cells. 19

รูปที่ 4 Hematoxylin staining และ Immunohistochemistry ของเนื้อเยื่อtestisของกุ้งแชบ๊วย 20

รูปที่ 5 Immunohistochemistry demonstrating presence of vasa-like protein in spermatogonia of the shrimp testis 21

รูปที่ 6 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in various developmental stages of *Fenneropenaeus merguiensis* 22

รูปที่ 7 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in mysis and post-larva day 1 23

รูปที่ 8 Early gonad development of *F. merguiensis* during postlarva stage 1 (PL1) 24

รูปที่ 9 Early gonad development of *P. vannamei* during postlarva stage 1 (PL1) 24

รูปที่ 10 Sagittal sections of the whole protozoa in PL7(A-C) and PL10 (D-F) of *F. merguiensis* 25

รูปที่ 11 Sagittal sections of the whole protozoa (PL15) of *F. merguiensis* 26

รูปที่ 12 Fluorescent signal of spermatogonia cells from *F. merguiensis* after 15-day post transplantation into segment 1, sperm sac and arch of hemolymph of *Penaeus vannamei*. Arrow pointed fluorescent cells. 28

รูปที่ 13 Transplanted fluorescent cells of *F. merguiensis* in *P. vannamei*, lateral view of the transplant PL9 after 4 wks post transplantation, left picture was inspected under bright field microscope and right picture was under fluorescent light, IX-73 phase contrast microscope equipped with DP-72 digital camera 31

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในเว็บไซต์ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร 6553803G58
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (TNRR)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย ด้วยงบประมาณแผ่นดินประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ในครั้งนี้ และขอบคุณโครงการ Japan Science and Technology Agency (JST) ภายใต้โครงการ JICA Thai Fish Project (The Project for Utilization of Thailand Local Genetic Resources to Develop Novel Farmed Fish for Global Market) ที่สนับสนุนผู้เชี่ยวชาญให้คำแนะนำในการการวิจัยนี้ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอบคุณหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

รศ.ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

หัวหน้าโครงการ

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันมีการบริโภคและส่งออกสัตว์น้ำทะเลกันเป็นจำนวนมาก กุ้งแชบ๊วยเป็นสัตว์น้ำทะเลชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมกันมากโดยเฉพาะในประเทศไทย การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยค่อนข้างยากทำให้ไม่เป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการบริโภคหรือส่งออกจึงจับจากแหล่งธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ การรักษาพันธุ์กุ้งแชบ๊วยเป็นสิ่งจำเป็นทั้งในการเพาะพันธุ์แบบธรรมชาติ และการผสมเทียมต่างๆ งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาการเทคนิคการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์จากสัตว์น้าที่เพาะพันธุ์ยากไปสู่สัตว์น้ำตัวรับที่เพาะพันธุ์ง่ายในการเพิ่มจำนวนพันธุ์สัตว์น้ำโดยใช้กุ้งแชบ๊วยเป็นต้นแบบ ในการศึกษาในการทดลองนี้ได้พัฒนาการแยกเซลล์สืบพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจากกุ้งขนาดต่างๆกันพบว่ากุ้งขนาดระหว่าง 11-12 เซนติเมตร จะให้ปริมาณเซลล์มากที่สุดและเมื่อศึกษาการพัฒนาการของเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์เดินทางเป็นเซลล์เดี่ยวจากไข่ไปยังตำแหน่งที่จะเริ่มพัฒนาอวัยะสืบพันธุ์ในระยะ postlarva วันที่1ถึงระยะ postlarva วันที่ 15 (PL1-PL15) โดยวิธี Immunnohistochemistry และ Hematoxylin&Eosin ของเนื้อเยื่อกุ้ง ดังนั้นระยะที่ตัวรับสามารถรับถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์ได้ตั้งแต่ระยะไข่ถึงระยะ PL 15

การทดลองการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์ไปยังตำแหน่งต่างๆของกุ้งตัวรับได้แก่ ที่ปล้องที่ 1 แอ่งเลือด ท่อเสปิร์มและที่ใต้หัวกุ้งของPL10 พบว่ากุ้งที่ฉีดใต้หัวกุ้งตายหมดในวันถัดไป การฉีดที่แอ่งเลือด ที่ปล้องที่ 1และท่อเสปิร์มของกุ้งขาวนั้นสามารถตรวจพบฟลูออเรสเซนต์ได้ภายหลังการฉีด 2 อาทิตย์ และตรวจพบดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยได้ที่ testis กุ้งตัวรับภายหลังฉีดเซลล์ที่ 6-10 สัปดาห์ โดย molecular marker Fm15, VASA 741 และ VASA 160 ซึ่งเป็น genomic DNA แต่ไม่พบ mRNAของVASA ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า spermatogoniaที่ฉีดเข้าไปในกุ้งตัวรับถูกทำลายภายหลังการฉีดหรือไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ฉีด แต่ยังสามารถตรวจพบดีเอ็นเอได้ ดังนั้นจึงทดลองครั้งที่ 1 ฉีดกุ้งใต้หัวกุ้งในระยะต่างๆ โดยทดลองฉีด 3 ระยะพบว่ากุ้งระยะ PL4, PL9 และPL16 พบอัตราการรอดชีวิตภายหลังการถ่ายโอน spermatogonia ร้อยละ 26.4, 47.3 และ 14 นอกจากนั้นพบอัตราตรวจพบสีฟลูออเรสเซนต์จากกุ้งที่รอดชีวิตร้อยละ 24.3, 9.9 และ 57.1 ตามลำดับซึ่งบริเวณที่พบสีฟลูออเรสเซนต์เป็นตำแหน่งที่คาดว่าเป็นจุดกำเนิดสำหรับการพัฒนาเป็นอวัยะสืบพันธุ์ของกุ้งต่อไป

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร 1153308G58
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คำสำคัญ: กุ้ง; เซลล์ต้นกำเนิด; การถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์; Immunohistochemistry

Abstract

Presently, a lot of marine shrimp are harvested for consumption and export. Banana shrimp; *Fernerropenaeus merguiensis* (Banana shrimp) is one of the favorite shrimps in Thailand. *F. merguiensis* culture is tediness so it is not popular for farming. Therefore, the majority of *F. merguiensis* for consumption and export were harvested from natural resources. To conservation of *F. merguiensis* is essential both natural breeding and artificial breeding. This research is the technique development of germ cell transplantation in aquatic animals. The method is transferred the germ cells from a hardly propagated donor animals to the practical breeding recipients. *F. merguiensis* is a model of this study and used to extract spermatogonia grm cell from various sizes of shrimps. The highest number of spermatogonia derived from shrimp size of 11-12 cm. In addition, the stage of recipient that the primodial germ cell moving as a single cell to form gonad is the optimal stage Then the PGCs movement was evaluated in fertilized eggs to postlarva day 1 (PL1) by immunohistochemistry and PL1 to PL15 by histology. The result indicated the optimal stage of recipient between PL1-PL15.

Transplantation of *F. merguiensis*'s germ cell into different locations of *P. vannamei* was performed including segment 1, arch of hemolymph, sperm duct and carapace. The transplanted shrimp at the carapace were dead after one day while the transplanted shrimp at other locations was was detected the fluorescent signal after 2 wks transplantation. The DNA of the donor cell was detected by the genomic molecular marker Fm15, VASA 741 and VASA 160 in the testis of the recipient after 6-10 wks of transplantation however, mRNA of the VASA marker was not found. Therefore, another experiment was performed by transplantion into the capapace at postlarva 4, postlarva 9 and postlarva 16. The percentage of survival rate was 26.4, 47.3 and 14, respectively. In addition, the percentage of fluorescent cluster rate from the survived shrimp was 24.3, 9.9 and 57.1 respectively. In addition, the fluorescent signal located between the heart and hepatopancreas where the testis wiil be formed.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ ใช้ในการยื่นขอจดสิทธิบัตร เท่านั้น
โดย ธนดล ศรีพงษ์ ID5398538 วันที่ 19/06/2024
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Keywords: Shrimp; Germ cell: Immunohistochemistry; Germ cell transplantation

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยจัดเป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง สามารถพบการกระจายได้บริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน รวมไปถึงแถบมหาสมุทร อินโด-แปซิฟิค (Pérez Farfante and Kensley, 1997) ได้แก่ ฮ่องกง อินโดนีเซีย อินเดีย ออสเตรเลีย กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ และเนื่องจากที่ยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติได้น้อย เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นพิษของฟอร์มาลีนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทำให้เกษตรกรจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อบริโภคและส่งออกจำนวนมาก ทำให้ปริมาณกุ้งแชบ๊วยลดลงอย่างรวดเร็วจากแหล่งน้ำธรรมชาติ รวมถึงพ่อและแม่พันธ์กุ้งแชบ๊วยซึ่งไม่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างกว้างขวาง ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ซึ่งในปัจจุบันสัตว์น้ำหลายชนิดก็อยู่ในสภาวะเสี่ยงเช่นกันเช่นปลาทู ปลากะตักเป็นต้น การพัฒนาเทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิด (Germ cell transplantation) เป็นทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำนอกเหนือจากการผสมพันธุ์เทียมในสัตว์น้ำต่างๆ เทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดในสัตว์น้ำมีการดำเนินการประสบความสำเร็จในสัตว์หลายประเภทตลอดจนในสัตว์น้ำจำพวกปลาต่างๆ เช่น ปลาหางเหลือง (yellowtail fish) และปลาทูน่า (Morita et al., 2012; Yazawa et al., 2019) เทคโนโลยีนี้ยังไม่แพร่หลายในงานวิชาการของไทยโดยเฉพาะในสัตว์น้ำ การศึกษานี้เป็นการพัฒนาเทคโนโลยีโดยใช้สัตว์น้ำได้แก่กุ้งแชบ๊วยเป็นต้นแบบ หากประสบความสำเร็จการใช้เทคโนโลยีนี้กับกุ้งแชบ๊วยและหากดำเนินการป้องกันการสูญพันธุ์อย่าทันท่วงทีจะทำให้กุ้งแชบ๊วยยังคงเป็นอาหารที่มีคุณภาพสำหรับคนไทยและมีผลผลิตเพื่อการส่งออกอย่างยั่งยืน ดังนั้นแนวคิดของโครงการคือ พัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะพันธุ์กุ้งโดยใช้นำเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยพัฒนาการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยและการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์ให้กุ้งลูกกุ้งที่เพาะพันธุ์ได้ง่ายเป็นกุ้งอุ้มบุญและเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยดังกล่าวจะสามารถพัฒนาเป็นเสปิรม์หรือไข่ของกุ้งแชบ๊วยในกุ้งอุ้มบุญได้ กุ้งอุ้มบุญได้แก่กุ้งขาวเป็นกุ้งที่สามารถเพาะพันธุ์ได้ดีในโรงเพาะฟัก ทำให้การผลิตลูกกุ้งได้อย่างกว้างขวางเพื่อทดแทนกุ้งในแหล่งน้ำธรรมชาติหรือเพื่อส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยได้มากขึ้น เทคโนโลยีนี้เมื่อประสบควาสำเร็จสามารถถ่ายทอดให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนเกษตรกรที่จะผลิตลูกกุ้งเพื่อการเลี้ยงต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ 19/6/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร (53BG5...)
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TH-DRR)

<u>วัตถุประสงค์</u>

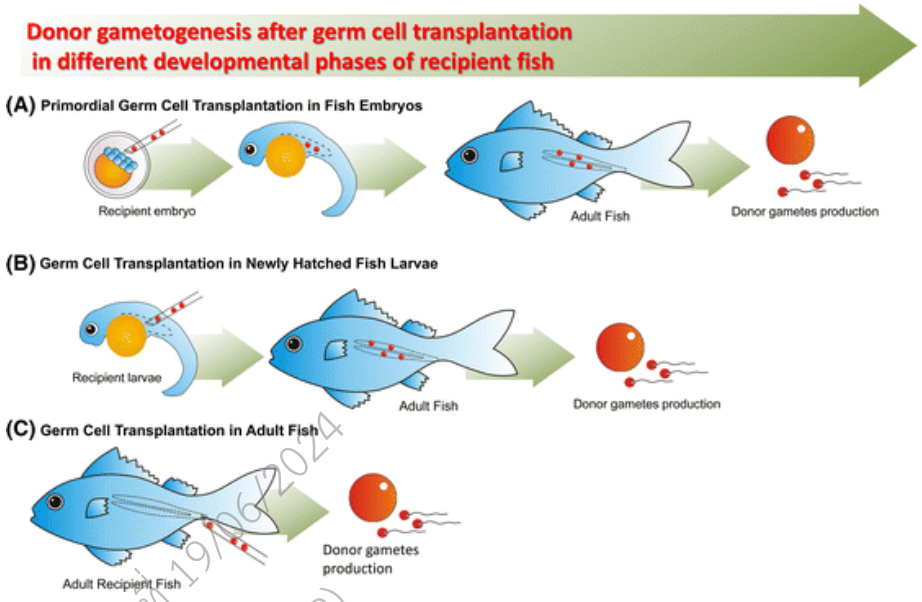
1) พัฒนาการแยกเซลล์สเปอร์มาโทโกเนีย สำหรับการนำไปปลูกถ่าย
2) พัฒนาวิธีการถ่ายฝากเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียเข้าไปยังกุ้งตัวรับได้อย่างน้อย 1 ชนิด

การตรวจเอกสาร

กุ้งแชบ๊วยจัดเป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง สามารถพบการกระจายได้บริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน รวมไปถึงแถบมหาสมุทร อินโด-แปซิฟิค (Perez Farfante and Kensley 1997) กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ กุ้งแชบ๊วยยังไม่มีการทำการเพาะเลี้ยงได้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติได้น้อย เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นพิษของฟอร์มาลีนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ปริมาณการผลิตกุ้งในประเทศจากสถิติของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาการประมง ในปี 2560 (เอกสารฉบับที่ 3/2562) มีปริมาณเพียง 129 ตัน คิดเป็น 0.04% ของปริมาณกุ้งที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดของประเทศ และ ในปี2562 ผลิตได้ 160 ตัน คิดเป็น 0.04% ของปริมาณกุ้งที่เพาะเลี้ยงทั้งหมดของประเทศเช่นเดียวกัน (เอกสารฉบับที่ 13/2563) ซึ่งไม่เพียงพอกับการบริโภคในประเทศหรือส่งออก นอกจากนั้นพ่อแม่พันธุ์เพื่อการผลิตลูกกุ้งเพื่อการเพาะเลี้ยงยังนำมาจากธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกษตรกรจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติจำนวนมาก ทำให้ปริมาณกุ้งแชบ๊วยลดลงอย่างรวดเร็วจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งเสี่ยงต่อสูญพันธุ์ได้ในอนาคต ซึ่งในปัจจุบันสัตว์น้ำหลายชนิดก็อยู่ในสภาวะเสี่ยงเช่นกันเช่นปลาทู ปลากะตักเป็นต้น การพัฒนาเทคโนโลยีนี้ในนักวิขาการไทยจะนำไปสู่การพัฒนารักษาพันธุกรรมกุ้งและสัตว์น้ำต่างๆได้ในอนาคต ดังนั้นหากดำเนินการป้องกันการสูญพันธุ์อย่าทันท่วงทีจะทำให้กุ้งแชบ๊วยยังคงเป็นอาหารที่มีคุณภาพสำหรับคนไทยและมีผลผลิตเพื่อการส่งออกอย่างยั่งยืน ดังนั้นแนวคิดของโครงการคือการพัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะพันธุ์กุ้งโดยใช้นำเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยโดยพัฒนาการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยและการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในสูตรสารเก็บรักษาในภาวะเยือกแข็ง ถึงแม้ได้มีการเก็บรักษาสเปิร์มของปลาต่างๆบ้างแล้วเช่นปลาซิวข้าวสารญี่ปุ่น (Oryzias latipes; medaka) (Zhang et al., 2005) ปลาตะเพียน (Sooksawat et al., 2019) และปลาแซลมอล (Lee et al., 2016) เทคนิคการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ปลา และการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์มีหลักการโดยที่เซลล์ต้นกำเนิดหรือ germ cell จะสามารถที่จะแบ่งตัวไปได้เรื่อยๆ (Cinalli et al., 2008) เมื่อถ่ายโอนเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะเพศผู้ (spermatogonia) จากผู้ให้ (Donor) เข้าไปในไข่หรือตัวอ่อนของผู้รับ(recipient) เซลล์ spermatogonia ของผู้ให้สามารถพัฒนาไปเป็นไข่ หรือเสปิร์มของผู้ให้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของตัวรับและสามารถให้กำเนิดลูกของตัวให้ได้จากตัวรับ แสดงภาพแบบแผนในรูปที่ 1 (Lacerda et al., 2013) เทคโนโลยีได้ทำสำเร็จในสัตว์ชั้นสูงหลายชนิด เช่น pigs (Honaramooz et al., 2002), goat (Honaramooz et al., 2003), chicken (Trefil et al., 2006), and cattle (Stockwell et al., 2009) นอกจากนั้นในสัตว์น้ำได้ประสพความสำเร็จในปลาหลายชนิด ได้แก่ปลาแซลมอน ปลาเทราท์ ปลา Chinese rosy bitterling และอื่นๆ (Nagasawa et al., 2019; Octavera and Yoshizaki, 2019; Okutsu et al., 2015; Yoshizaki et al., 2016)

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ภายใต้ใบอนุญาตแบบ CC BY-NC-ND 4.0 โดย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร (IP: 161.39.66.38) เมื่อวันที่ 19/06/2024 การนำไปใช้ประโยชน์ต้องได้รับอนุญาตจากเจ้าของลิขสิทธิ์ (THAIRR)

เทคโนโลยีนี้เป็นเทคโนโลยีที่ไม่มีการดำเนินการวิจัยในกุ้งมาก่อน การพัฒนาขีดความสามารถนักวิจัยไทยผ่านโครงการวิจัยจะทำให้นำความสามารถไปใช้ในการรักษาพันธุกรรมสัตว์อื่นๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่อาจจะสูญพันธุ์ในอนาคตของไทยได้ โดยมีแนวทางการดำเนินงานเป็น 2 แนวทางได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยซึ่งได้ดำเนินการแล้วในปีงบประมาณ 2562 และการฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยเข้าสู่กุ้งตัวรับได้แก่กุ้งขาวเพื่อการขยายพันธุกุ้งแชบ๊วยในอนาคต



เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่เมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ระบบคลังปัญญาไทย ID:398G38
จากระบบคลังปัญญาไทย (TNRR)

รูปที่ 1 แบบแผนแสดงเทคนิคการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell transplantation techniques) ในปลาตัวรับในระยะต่างๆในปัจจุบัน (a) Primordial germ cell (PGC) transplantation in fish embryos: โดยวิธีนี้จะฉีด PCGs ของปลาตัวให้ให้กับ embryoที่ blastodisc ในระยะ blastula-stage ที่ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะแบ่งตัวก่อนที่จะไปยังตำแหน่ง gonadal ridge (future gonads) ในตัวรับ ปลาตัวรับจะถูกเลี้ยงจนเจริญพันธุ์จนสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของตัวให้ได้ (b) Germ cell transplantation in newly hatched larvae: โดยวิธีนี้ PGCs ของปลาตัวให้ถูกฉีดเข้าช่องท้องของตัวอ่อน (หลังฟักตัวใหม่) ของปลาตัวรับเป็นะระยะที่PGCsของตัวรับยังเคลื่อนที่และสรางโคโลนีที่ genital ridges ของตัวรับ เมื่อเจริญพันธุ์ปลาตัวรับสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาตัวให้ได้ (c) Germ cell transplantation in adult fish: โดยวิธีนี้จะฉีด spermatogonial stem cells โดยตรงไปยัง testes ของปลารับที่ซึ่งจะสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลาตัวให้ได้ (Lacerda et al., 2013)

วิธีการทดลอง (Materials & Methods)

1 การเตรียมเซลล์ Spermatogonia เนื้อเยื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (testis) กุ้งแชบ๊วยเพื่อการถ่ายโอน

นำ Testis ของกุ้งแชบ๊วยขนาดประมาณ 11 – 12 cm มาทำการแยกเซลล์ โดยใส่ลงในหลุมที่มีอาหาร L-15+ Anti-Anti(1x) 420 µl, Collagenase H (40 mg/ml) 25 ไมโครลิตร, DispaseII (33.3 mg/ml) 25 µl และ DNase I (15 U/มิลลิลิตร) 30 µl จากนั้นทำการตัด Testis ด้วยกรรไกรปลายแหลม เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ 50 ครั้ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1.5 hr และใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ 50 ครั้ง ทุก ๆ 30 min เมื่อครบเวลาแล้วนำอาหารที่มีเซลล์อยู่ไปผ่านการกรองด้วยผ้ากรองที่มีรูกรองขนาด 42 µm ใส่ใน Eppendorf ขนาด 1.5 µl เติม L-15+ Anti-Anti(1x) อีก 1 ml เพื่อล้างหลุม แล้วกรองต่อด้วย ด้วยผ้ากรองที่มีรูกรองขนาด 42 µm และล้างเซลล์บนผ้ากรองด้วยอาหาร 1 ml แล้วดูดใส่หลอด Eppendorf เดิม จากนั้นนำหลอด Eppendorf ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งและเติม L-15+ Anti-Anti(1x) 1000 ml และผสมกันเบา ๆ จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง และล้างเซลล์อีกครั้งด้วยอาหารที่ปราศจาก 10%FBS เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วย 500 µl ของอาหารที่ปราศจาก 10%FBS แบ่งเซลล์ 50 µl นำไปย้อมด้วย trypan blue อัตราส่วน 1:2 และนำไปนับเซลล์ที่มีชีวิต จากนั้นทำการย้อมเซลล์ spermatogonia ด้วยสี PKH26 (Sigma, Missouri, USA) โดยนำเซลล์ 450 µl ปั่นนำตะกอนละลายด้วย 250 µl Dilute C ลงใน และ เมื่อผสมเข้ากันแล้วนำ Dilute C 240 ไมโครลิตร กับ PKH 26 dye 10 µl ที่ผสมกันแล้วมาใส่ในสารละลายเซลล์ ผสมกันเบา ๆ ด้วย pipette แล้ววางทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาใส่ L-15+ Anti-Anti(1x) ลงไป 500 µl เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม L-15+ Anti-Anti(1x) 250µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้น หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1800 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเซลล์โดยการเติม L-15+ Anti-Anti(1x) ลงไป 250 µl คำนวณปริมาณเซลล์เพื่อนำไปฉีดต่อไป

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองแล้วโดย ธนดล ศรีเพชร เมื่อวันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

2. การตรวจสอบเซลล์ spermatogoniaและค้นหาระยะกุ้งในการเตรียมspermatogonia ด้วยวิธี Immunnocytochemistry method

Anti-Vasa antibody ได้ผลิตมาจากการกระตุ้นด้วย VASA poly peptides (GRSRGGGRGGGRGGC) โดย บริษัท GeneScript (Japan Inc., Japan) ซึ่งได้มาจากเปรียบเทียบระหว่างกรดนิวคลีอิคของ *F. merguiensis* และ *L. vannamei*. การทดลองนี้เป็นการ ตรวจหาโปรตีน VASA ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเพาะอยู่ที่spermatogonia ของสัตว์ต่างๆ การตรวจหาVASAโปรตีนบนspermatogoniaจาก *F. merguiensis*

เนื้อเยื่อ testis(n=3) จากกุ้งขนาด 7 cm, 12 cm และ 16 cm ภายหลังได้ fix แล้วนำมาฝังในparaffin โดยผ่านกระบวนการ paraffin technique (Fischer et al., 2008) และตัดชิ้นเนื้อความหนาขนาด 5 μm thickนำมาติดบนสไลด์แก้ว กำจัดเอนไซม์ peroxidaseที่อยู่ในเซลล์เนื้อเยื่อ โดยการแช่ใน 3% H_2O_2 และสารละลาย methanol เป็นเวลา 30 min ในความมืดที่อุณหภูมิห้อง แล้วแช่ใน PBS เป็นเวลา 2 min นำไป permeabilized ใน 1% glycine in 0.3% TritonX-100 diluted in PBS (0.3% $PBST_{x-100}$) for 30 min ที่ อุณหภูมิห้อง ย่อยชิ้นเนื้อด้วย 0.5 μg/ml ของ proteinase K เป็นเวลา 20 min 37°C ก่อนที่จะนำไปบ่มกับสารละลาย blocking solution (10% FBS in 0.3% $PBST_{x-100}$), เวลา 2 hr ที่อุณหภูมิห้อง แล้วบ่มด้วย anti-vasa antibody (1:200) เป็นเวลา 16–18 hr ที่ at 4°C จากนั้นล้างด้วย PBS เป็นเวลา 30 min จำนวน 5 ครั้ง และบ่มด้วย HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody ที่เจือจาง 1:500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง-3 ครั้ง ด้วย $PBST_{x-100}$ครั้งละ 10 min และเนื้อเยื่อบนสไลด์ จะถูกย้อมด้วย 0.05% 3,3′-diaminobenzidine solution (Sigma, USA) ที่มี 0.015% H_2O_2 ใน PBS เมื่อได้สีน้ำตาลที่เหมาะสมแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วยสี hematoxylin หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำก๊อกและทำการติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ด้วยน้ำยา permounted นำไปถ่ายรูปได้เลยด้วยกล้อง BX–53 light microscope equipped with a DP–72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan)

3. ศึกษาการเคลื่อนที่และพัฒนาการของ Primodial germ cells (PGCs) ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี whole mount immunohistochemistry

การศึกษานี้เพื่อเป็นการค้นหาระยะที่เหมาะสมที่จะถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์จากกุ้งแชบ๊วยไปยังกุ้งขาวตัวรับ เพื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่มีรายงานแล้ว จึงศึกษาเพื่อหาระยะที่ PGCs ยังมีการเคลื่อนที่ก่อนที่จะสร้าง gonad ที่genital ridge

ได้ทำการเก็บ fertilized eggs, the nauplius 4, zoea 3, mysis 3, postlarva 1 stages ระยะละ อย่างน้อย 3 ตัว ทำการตรึงใน 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 24 hr ที่ 4°C แล้วย้ายลงแช่ใน phosphate buffered saline (PBS) เก็บที่ 4°C เพื่อนำไปใช้ เมื่อนำไปใช้นำไปแช่ใน 0.5% TritonX-100 เจือจางใน PBS เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปแช่ใน Dent's solution (80% methanol and 20% dimethyl sulfoxide) ที่ –20°C เป็นเวลา 6 hr จากนั้นล้างด้วย PBS เป็นเวลา 30 min จำนวน 5 ครั้ง นำไปบ่มด้วย anti-vasa solution (1:1,000 dilution) เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นล้างด้วย PBS เป็นเวลา 30 min จำนวน 5 ครั้ง และบ่มด้วย HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody ที่เจือจาง 1:2,000 เป็นเวลา 2 วัน ล้าง-3 ครั้ง ด้วย $PBST_{x-100}$ ครั้งละ 10 นาที ขั้นตอนการบ่มและล้างทำการทดลองที่ 4°C ตัวอย่างทั้งตัวจะถูกย้อมด้วย 0.05% 3,3′-diaminobenzidine

เอกสารฉบับนี้ได้รับอนุเคราะห์โดยคุณ ศรัณพร ID53...3G=30 วันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THAIRR)

solution (Sigma, USA) ที่มี 0.015% H_2O_2 ใน PBS เมื่อได้สีน้ำตาลที่เหมาะสมแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น ตัวอย่าง whole-mount สามารถนำไปถ่ายรูปได้เลยด้วยกล้อง BX–53 light microscope equipped with a DP–72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan) การทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อ testis (n=3) เป็นชุดควบคุมบวก

4. การศึกษาการพัฒนาอวัยสืบพันธุ์ในกุ้งโดยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา Histology

การศึกษาการเคลื่อนที่ และ พัฒนาการของ Primodial germ cells ของกุ้งขาวและกุ้งแชบ๊วย เพื่อเป็นแบบแผนในการหาระยะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia โดยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำกุ้งตัว Postlarva ระยะต่างๆและ เนื้อเยื่อ testis มาแช่ใน Davison's fixative เป็นเวลา 24 ชั่วโมงล้างด้วย 70% ethanol เป็นเวลา 10 นาที 3 ครั้ง นำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการ processing ต่างๆ แล้วนำมา ใส่ใน (embedded) paraffin wax เนื้อเยื่อ Testis นำมาตัดหนา 5 µm ในขณะที่กุ้งทั้งตัวตัดหนา 7 µm โดยใช้เครื่อง 820 Spencer rotary microtome (MedCon, Colorado, USA) เนื้อเยื่อที่ตัดนำมาเอา paraffin ออก แล้วทำให้แห้ง ย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin (H&E) ตามวิธีมาตรฐาน แล้วนำมาทำให้ใสและทำให้ติดแน่นบนไสลด์ ถ่ายภาพเนื้อเยื่อด้วย BX-53 light microscope equipped with a DP-72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan)

5. การถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)ไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว)

เพื่อค้นหาตำแหน่งและระยะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia

5.1 การถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)ไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว) ในตำแหน่งต่างๆกัน

โดยถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วยไปที่ตำแหน่งต่างๆได้แก่ แอ่งเลือดโดย ถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วยไปที่หัวของกุ้งตัวรับ postlarva ขนาด 5-6 cm จำนวน 8 ตัว ถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วยไปที่ตำแหน่งปล้องที่ 1 ของกุ้งตัวรับขนาด 8 cm ถูก จำนวน 10 ตัว และถ่ายโอนเซลล์ spermatogoniaไปยังท่อเสปิร์ม ของกุ้งตัวรับขนาด11-12 cm จำนวน 20 ตัว

การถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia ได้ดำเนินการโดยดัดแปลงจากงานของ lacerda และคณะ และ Takeuchi และคณะ (Lacerda et al., 2006; Takeuchi et al., 2009) โดยนำกุ้งแต่ละตัวมาทำให้สลบโดยบนน้ำแข็งประมาณ 1 นาที แล้ววางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เคลือบด้วยวุ้น3 % แล้วถ่ายโอนเซลล์spermatogonia จำนวน 1 µl ปริมาณ 1.0 x 10^5 cells ที่ตำแหน่งปล้องที่ 1ด้วยวิธี microinjection และที่แอ่งเลือดตามที่กล่าวข้างต้นด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 27 ภายหลังการถ่ายโอน 6 wks นำมาทำให้สลบโดยบนน้ำแข็งประมาณ 1 min นำไปตรวจสอบการเคลื่อนที่ของ spermatogonial cells ในกุ้งตัวรับด้วยกล้อง Fusion Solo S - Western Blot & Chemiluminescence Imaging (Vilber, Collégien, France) สำหรับกลุ่มที่ฉีดเข้าท่อเสปิร์มฉีดปริมาณ 1.0 x 10^6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การแสวงหากำไร การทำซ้ำ หรือการเผยแพร่ในรูปแบบอื่นๆ โดยไม่ได้รับอนุญาตจากผู้เขียนก่อน โดย ธนดล ศรีเพชร ID: 3960638 เมื่อวันที่ 19/06/2024 ระบบบริหารจัดการงานวิจัย (TNRR)

cells นำ testis มาตรวจสอบที่ 15 และ 35 วัน ภายหลังการถ่ายโอนเซลล์ นอกจากนั้นยังได้ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของเซลล์spermatogoniaที่ถ่ายโอนด้วยวิธี PCR molecular marker ในระยะเวลาต่างๆกัน โดยตรวจสอบด้วยการทำ PCR ของgenomic DNAของกุ้งแชบ๊วยที่ถ่ายโอนในกุ้งตัวรับ โดย primer VASA160, VASA 741 และ Fm15 และ cDNA โดย primer VASA160 หรือ VASA 741

5.2 การถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)ไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว) ในเข้าในระยะต่างๆของกุ้ง postlarva วันที่ 4 (PL4), postlarva วันที่ 9 (PL9)และ postlarva วันที่ 16 (PL16)

จากการศึกษาพัฒนาการอวัยวะสืบพันธุ์ของกุ้งใน การทดลองที่ 3และ 4 จึงนำมาซึ่งข้อมูลในการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์โดยการฉีด 15000 เซลล์ต่อ1 ตัวรับ ฉีดอย่างน้อย 100 ตัวของแต่ละระยะ ฉีดเข้าบริเวณใต้ carapace ของกุ้งตัวรับ PL4, PL6และ PL16 ตรวจสอบFluorescent หลังการถ่ายโอน ที่สัปดาห์ที่ 4 หลังจากฉีด คำนวณอัตราการรอด และอัตราการตรวจพบ Fluorescent และเก็บตัวอย่าง สัปดาห์ที่ 4 หลังจากฉีดอย่างละ 1 ตัวเพื่อตรวจสอบทางเนื้อเยื่อต่อไป

5.3 การตรวจสอบเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์กุ้งแชบ๊วยด้วยด้วย cDNA marker ของ VASA (Potiyanadech et al., 2022)

นำเนื้อเยื่อ testisปริมาณ 100 mg มาบดใน 1 ml TRIzol® reagent แล้วดำเนินการสกัด RNA ตามวิธีของบริษัท (Promega, Madison, USA) จากนั้นนำ RNA ที่สกัดได้ (2 µg) มากำจัดDNA ด้วย1unit of DNase I (Promega, Madison, USA) จากนั้นเตรียม cDNA โดยนำ 1 µg RNA ละลายใน 10 µl แล้วผสมกับ 2 µl ของ random primer (100 ng/µl), บ่มที่ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที นำมาวางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที เติม 5x reverse transcription buffer (4 µl), 4U/ µl AMV (0.5 µl) และ 10 mM dNTP (1.25 µl) ลงในหลอดปฏิกิริยา เติมน้ำจนปริมาตรครบ 20 µl), นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 1 h คุณภาพของ cDNA เช็คโดยการทำการเพิ่มจำนวน ยีน **β**-Actin ด้วย specific primers แสดงในตารางที่ 1 ปฏิกิริยา 12.5 µl ประกอบด้วยThe cDNA 100 ng, 1x GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, USA), 0.25 µM of the reverse primer, 0.25 µM of the forward primer และเติมน้ำจนครบ 12.5 µl. การทำ PCR ประกอบด้วย denaturationเริ่มต้นที่ 94 °C for 5 min, 35 cycles of amplification (94 °C for 30 sec, 55 °C for 30 sec, 72 °C for 30 sec), และ a final extension of 72 °C for 10 min PCR products นำมาแยกบน 2% agarose gel electrophoresis. การเพิ่มจำนวน VASA 160, VASA 741 นั้นใช้ specific primer แสดงใน **ตารางที่ 1** โดยออกแบบจากส่วนที่เหมือนกันน้อยที่สุดจากการเทียบกรดนิวคลีนิคระหว่าง GenBank accession numbers: *L. vannamei*: DQ095772.2, *F. merguiensis*:

เอกสารนี้เป็นการโพสต์เมื่อวันที่ 19/06/2024 โดย ธนิดา ศรีเพชร ID 5306G30 จากระบบหลังบ้านมหาวิทยาลัย (NARIT)

MZ173499.1 สำหรับปฏิกิริยาการเพิ่มจำนวน cDNA ของ VASA 160 และ VASA 741 ทำเช่นเดียวกับ β-Actin หากแต่ annealing temperature คือ 65°C

5.4 การตรวจสอบเซลล์ต้นกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์กุ้งแซบ๊วยด้วยด้วย genomic markers (Potiyanadech et al., 2022)

Genomic DNA จากtestisสกัดโดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (Geneaid, New Taipei City, Taiwan) โดยปั่นtestis จำนวน 30 mg 200 µl ของ GT bufferและ 20 µl (10 mg/ml) Proteinase K บ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 30 min แล้วเติม GBT buffer of 200 µl บ่มที่ 60 °C เป็นเวลา 40 min กำจัด RNA ด้วย RNase A 4 µl (10 mg/ml) was added to บ่มที่ 25°C เป็นเวลา 5 min แล้วเติม 200 µl absolute ethanol and ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายลง GS column, ปั่นที่ 15,000 x g เป็นเวลา 2 min เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้งและ ล้างด้วย 400 µl W1 buffer ปั่นที่ 15,000 x g เป็นเวลา 1 min ล้างซ้ำด้วย 600 µl Wash buffer ปั่นที่ 15,000 x g เป็นเวลา 1 min เทส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์ทิ้งและ ปั่นที่ 15,000 x g เป็นเวลา 3 min จากนั้นเติม 100 µl Elution buffer บ่ม 5 min แล้วปั่นที่15,000 x g เป็นเวลา1 min เก็บ DNA ชะออกจากคอลัมน์ สำหรับเพิ่มจำนวน microsatellite Fm-15 (ATC (7) ซึ่งได้มาจากงาน Ovarian Transcriptome Analysis (Saetan et al., 2016) mitochondrial Cytochrome oxidase subunit I gene (COI) ได้มาจากส่วน conserved regions of COI genes (Folmer et al., 1994) และ VASA 160

ปฏิกิริยา PCR ของ Fm15 ประกอบด้วย DNA 200 ng, 0.2 mM dNTP, 0.25 µM of the reverse primer,และ 0.25 µM of the forward primer, 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq DNA polymerase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., CA, USA) สำหรับปฏิกิริยา COI PCR ทำเช่นเดียวกับ Fm 15 ยกเว้นใช้ 4.0 mM $MgCl_2$ การกระบวนการเพิ่มจำนวนเช่นเดียวกับ VASA160 ตามที่กล่าวข้างต้น โดย annealing temperature ของ Fm-15, COI และ VASA160 คือ 54 °C, 50 °C and 65 °C, ตามลำดับ ผลผลิต PCR ของ Fm-15 และ VASA160 แยกบน 6.0% polyacrylamide gel และ1.5% agarose gel electrophoresis ผลผลิต PCR ของCOI ตัดด้วย *Xbal* (Promega, Madison, USA) ที่ 37 °C 24 hr โดยผล PCR COIของกุ้งแซบ๊วยจะถูกตัดด้วย *Xbal* ในขณะที่PCR COIของกุ้งขาวจะไม่ถูกตัด และวิเคราะห์ด้วย 2% agarose gel electrophoresis

เอกสารนี้ได้รับการโหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนัฏ ศรีเพชร ID 5309803
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THAIRR)

ตารางที่ 1. Primer sequences used for PCR of Actin, Vasa741, Fm-15, COI, Vasa160

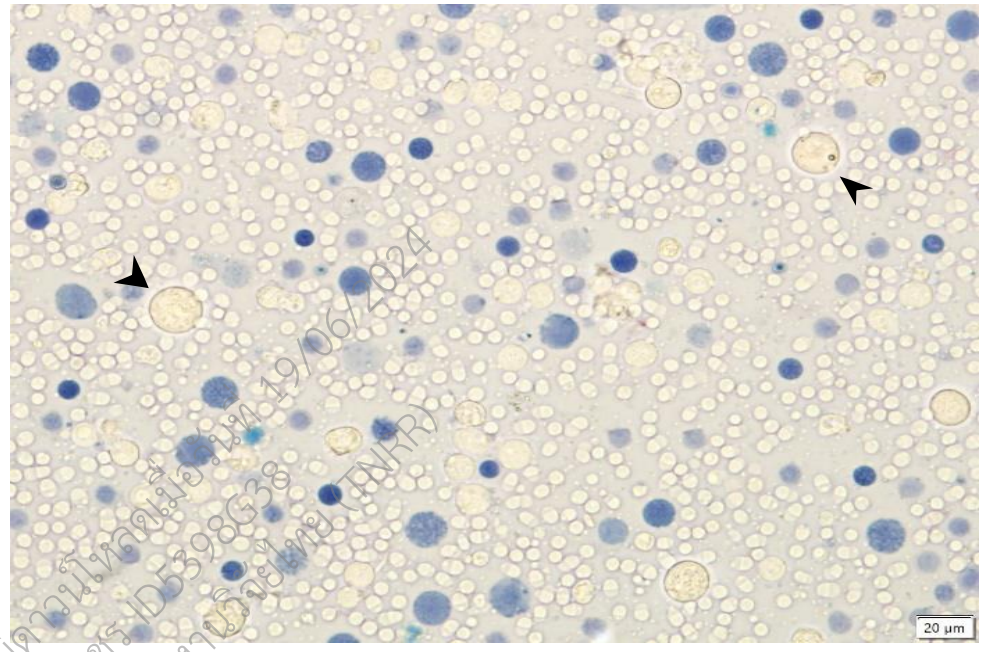
Primer name	Primer sequences	Annealing temperature (°C)
Forward β-actin	5'CAGATCATGTTTGAGACCTTC'3	55
Reverse β-actin	5'GATGTCCACGTCCACTTCAT'3	
Forward Vasa741	5'TCCAGGGGAGGTGGTAGAGG'3	65
Reverse Vasa741	5'ACTCCCTGTCTGAGCACAGC'3	
Forward Fm-15	5'TTGCCATCATTATCATTAGCAGA'3	54
Reverse Fm-15	5'AAGTATGATGAAGAAGGCCATGA'3	
Forward COI	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG'3	50
Reverse COI	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA'3	
Forward VASA160	5'CCTCAAAGAAAGCATTTGACTCTGG'3	65
Reverse VASA160	5'CCACCTCTACCTCCTCCTCTACC'3	

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussion)

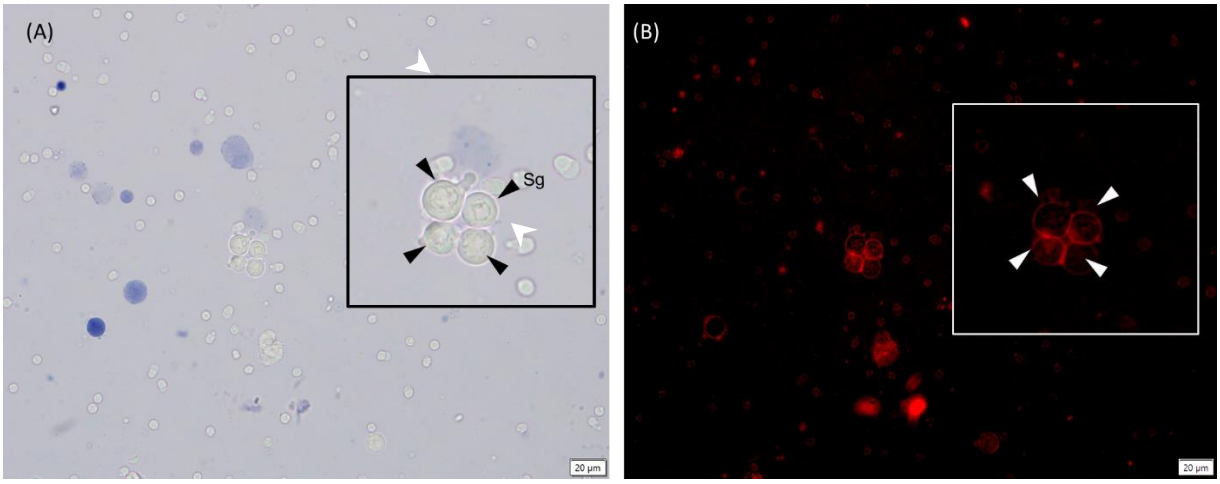
1 เตรียมเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)เพื่อการถ่ายโอนไปไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว)

จากการเตรียมเซลล์เพื่อการถ่ายโอนจะพบเซลล์ขนาด 8-10 μm ซึ่งคาดว่าคือเซลล์ spermatogonia เมื่อย้อมสี trypan blue เซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีใส แต่อย่างไรก็ตามจะพบเซลล์ขนาดเล็กๆปนอยู่จำนวนมาก แสดงใน**รูปที่ 2** นอกจากนั้นเซลล์ spermatogoniaจะย้อมสี PKH 26 ซึ่งจะเรืองแสงสีแดงซึ่งใช้ในการติดตามภายหลังการฉีดเข้ากุ้งตัวรับแสดงใน**รูปที่ 3**



รูปที่ 2. Dissociated Spermatogonial cells from testis of *F. merguiensis* and dyed with Trypan blue. Dead cells show in blue, live cells are white, the arrowhead indicates spermatogonia cells.

เอกสารฉบับนี้ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น 19/06/2024
โดย ธนิกา ศรีเพชร ID6398038
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

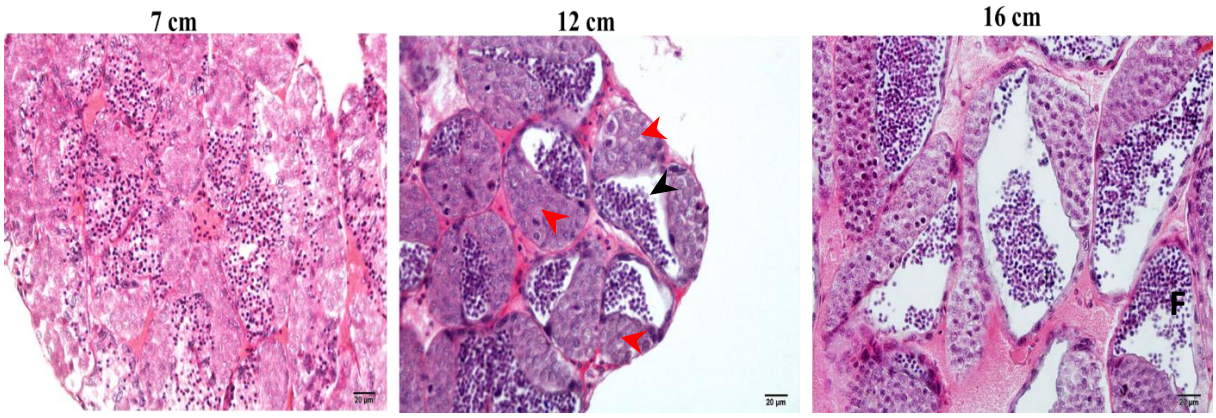


รูปที่ 3 Spermatogonia cells, (A) bright field, (B) spermatogonia cells dyed with PKH-26, the arrowhead indicates spermatogonia cells.

2. การตรวจสอบเซลล์ spermatogoniaและค้นหาระยะกุ้งในการเตรียมspermatogonia ด้วยวิธี Immunnohistochemistry (ISH)

การตรวจสอบเซลล์spermatogonia ด้วยวิธี ISH เป็นการพิสูจน์เซลล์ที่แยกคือเซลล์ spermatogonia และเพื่อใช้ประโยชน์ในการการคัดเลือกขนาดกุ้งที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์กุ้งแชบ๊วย สำหรับการนำไปปลูกถ่าย ในการทดลองจึงนำ testis ของกุ้งแชบ๊วยขนาดต่างๆกัน เพื่อมาทำ IHC ผลการทดลองโดยการทำ IHC ของเนื้อเยื่อ testis ของกุ้งเพื่อคัดเลือกขนาดกุ้งที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์สืบพันธุ์ Spermatogonia) กุ้งแชบ๊วยจะพบว่าลักษณะของเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลทีเกิดจากเปอร์ออกซิเดสที่เกาะกับ secondary antibody ที่เกาะกับ primary antibody ต่อ VASA บนเซลล์ Spermatogonia และพบว่าลักษณะเซลล์ทั่วไปของtestisของกุ้งขนาดประมาณ 7 cmมี spermatogonia มีปริมาณน้อยมาก กุ้งที่ขนาด 12cm จำนวนมากกว่ากุ้งขนาดประมาณ 7 cm และ 16 cm อย่างชัดเจน แสดงใน**รูปที่ 4** นอกจากนั้นเมื่อทำการสกัด ตัวอย่างกุ้งขนาด 8 cm, 9 cm, 10 cm และ 12 cm มี Spermatogonia โดยเฉลี่ยประมาณ 66666±14433 (n=3)เซลล์, 60833±24537 (n=3)เซลล์, 283333±123222 (n=3)เซลล์ และ1150000 (n=2) เซลล์ ตามลำดับ และเมื่อเตรียมเซลล์จากกุ้งขนาด 12 cm ได้เซลล์spermatogonia ปริมาณมากที่สุดและมีชีวิตมากที่สุดร้อยละ 86

เอกสารนี้เป็นกรรมสิทธิ์ของ ม.ราชภัฏรำไพพรรณี 19/06/2024
โดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่นวัตกรรมการท่องเที่ยวอย่างยั่งยืน (องค์การมหาชน) ID5398538
การนำไปใช้ประโยชน์ด้านวิจัยไทย (TNRR)



รูปที่ 4 Hematoxylin staining (A-C) of testis tissue of *F. merguiensis* size 7 cm, 12 cm and 16 cm, black arrow head pointed Spermatid (St), red arrow head pointed spermatogonia (Sg)

ตารางที่ 2 Percentage of spermatogonia extracted from testis of different sizes of *F. merguiensis*

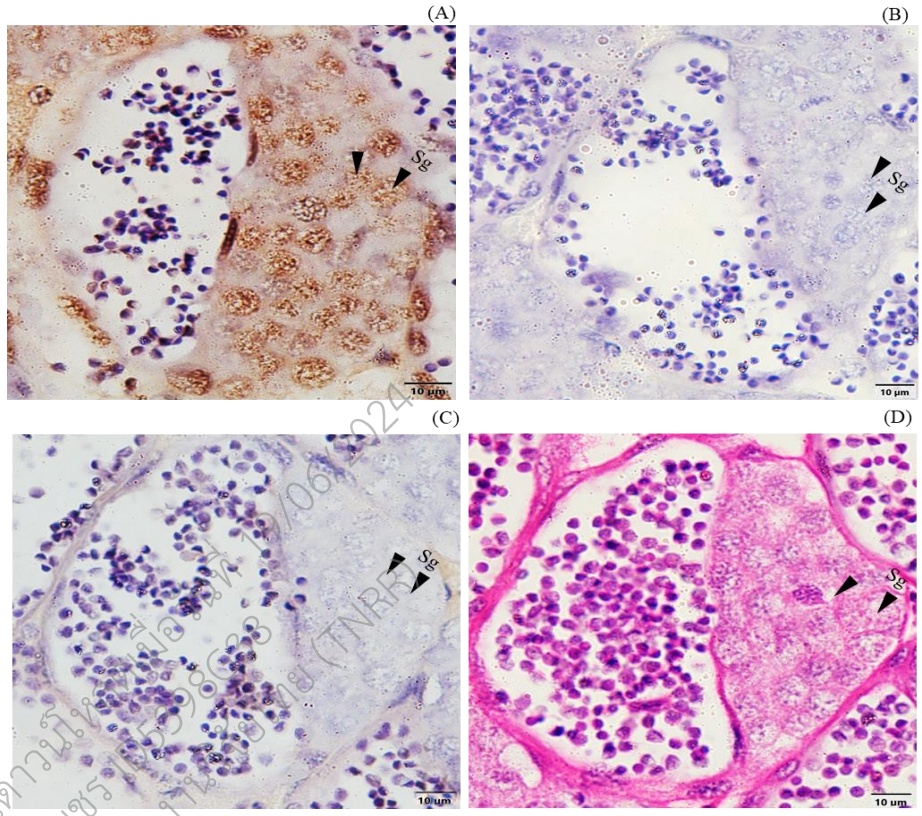
Shrimp size (cm.)	Survival cells	% Survival cells
8.5 ± 0.01	66666±14433 (n=3)	56.1±12.3
9.0±0.15	60833±24537(n=3)	59.1±25.2
9.9±0.423	283333±123222 (n=3)	68.0±9.9
12.5±0.35	1150000± 0 (n=2)	86±1.13

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนัตถ์ศรี ไพรัช ID5396638
จากระบบคลังองค์ความรู้ด้านวิจัยไทย (TNRR)

3. ศึกษาการเคลื่อนที่และพัฒนาการของ Primodial germ cells ของกุ้งแชบ๊วยด้วยวิธี Whole mount immunohistochemistry

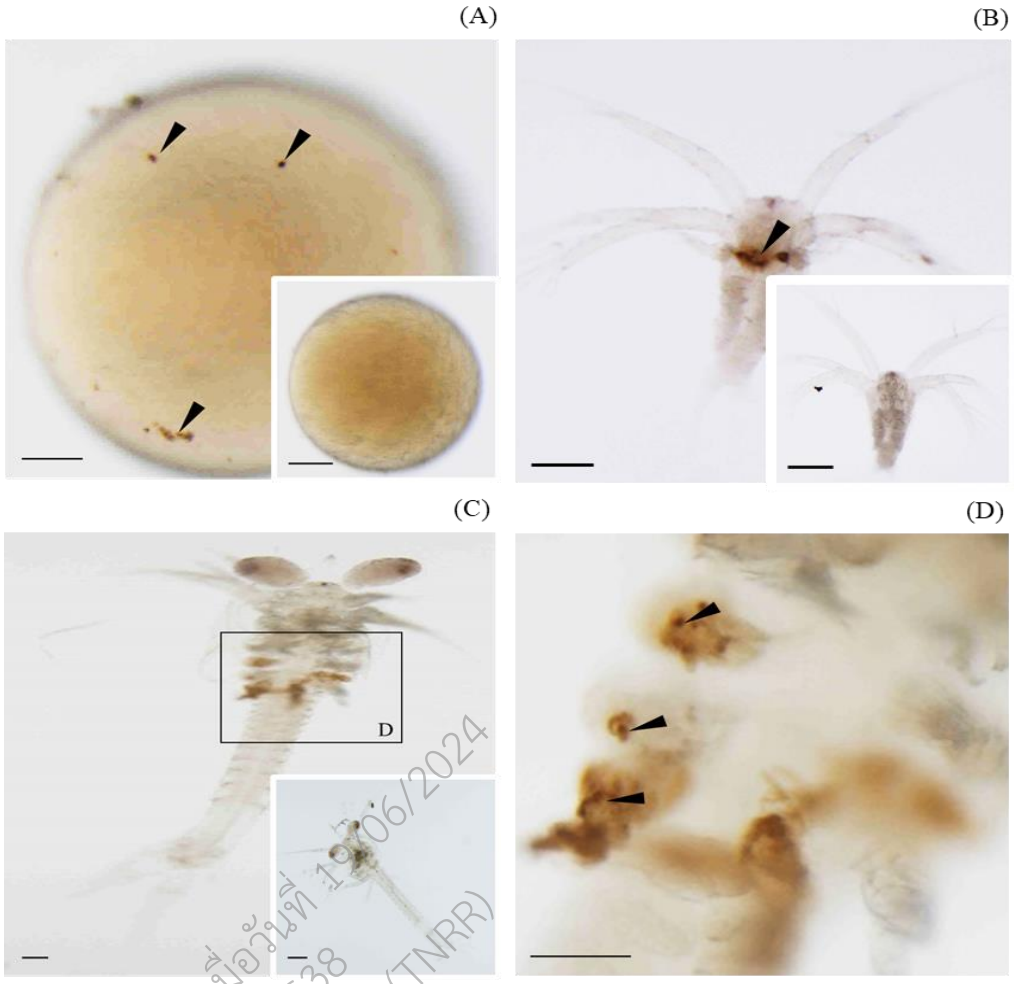
เมื่อทำ Whole mount immunohistochemistry กับตัวอย่าง fertilized eggs, the nauplius 4, zoea3, mysis 3, postlarva 1 stages ระยะละอย่างน้อย 3 ตัว พบว่า Vasa-like protein ติดสีน้ำตาลบนเซลล์ spermatogonia ในเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันูเพศผู้ในกุ้งที่โตเต็มวัย (รูปที่ 5A) ไม่พบการติดสีของเซลล์ spermatogonia ในเนื้อเยื่อที่เป็นตัวควบคุมลบ (รูปที่5B) และเมื่อเนื้อเยื่อบ่มกับ pre-immunize serum พบว่าติดสีน้ำตาลอ่อนมากๆ ปริมาณเล็กน้อยกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจนกับผลบวก (รูปที่5C)

ในไข่ที่ผสมแล้ว พบ vasa-like protein ปรากฏเป็นจุดสีน้ำตาลที่ขอบของไข่ (รูปที่6A) และพบที่ด้านหน้าของบริเวณ cephalothorax ในตัวอ่อนระยะ nauplius 4 (รูปที่ 6B) ในระยะ zoea 3 พบ PGCsที่ cephalothorax และเคลื่อนที่ไปที่บริเวณขาpereopod regions (รูปที่6C–6D) ชุดควบคุมลบแทรกอยู่ในรูป A-C จะไม่พบจุดสีน้ำตาล ใน mysis 3 สัญญาณของ vasa-like protein ยังคงอยู่ที่ cephalothorax และ pereopod regions (Figs. 7A–7B) และใน postlarva 1 stage พบPGCs ที่ cephalothorax, pereopod (รูปที่ 7D–7E) และ telson (รูปที่ 7F) ชุดควบคุมลบจะไม่พบสีน้ำตาลซึ่งแทรกอยู่ในรูป 7C-7G



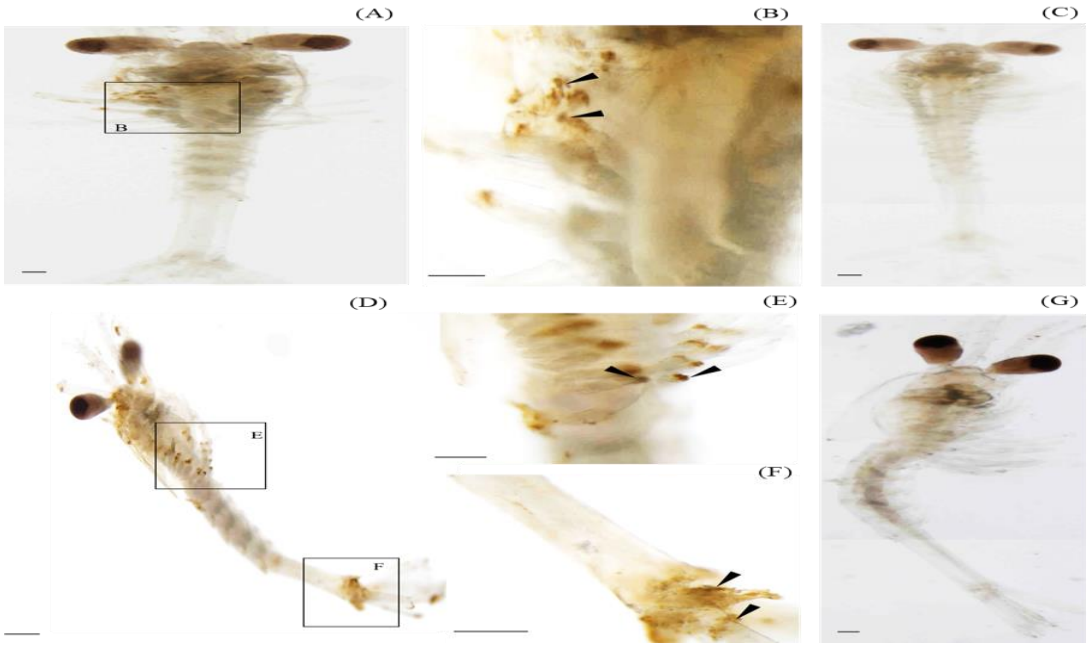
เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดมาจากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR) โดย ชัยสิทธิ์ ศรีเพชร IP: 10.0.60.124 [15/08/68 เวลา 14:...]

รูปที่ 5 Immunohistochemistry demonstrating presence of vasa-like protein in spermatogonia of the shrimp testis: (A) testis section of *Fenneropenaeus merguiensis* incubated with anti-vasa antibody showing positive vasa-like protein in spermatogonia (arrowheads); (B) control section without anti-vasa antibody showing no reactivity; (C) pre-immunized serum incubated section showing no reactivity and connective tissue showing as very pale brown color; (D) testis section of *F.merguiensis* stained with hematoxylin and eosin, scale bars are 10 µm and experiment was performed in triplicate (Chimnuan et al., 2022).



เอกสารฉบับนี้ความโหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย นายณัฐ ศรีพันธ์ ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 6 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in various developmental stages of *Fenneropenaeus merguiensis*: (A) the fertilized egg; (B) nauplius 4 stage; (C) zoea 3 stage; (D) zoea 3 stage with magnification, where negative control without anti-vasa did not develop a brown color in any tested stage, as shown in the inserts for A–C, scale bars represent 2 μm for C and C-insert, 8 μm for A, A-insert, B and B-insert and 13.5 μm for D and experiment performed in triplicate using three samples of each stage (Chimnuan et al., 2022)

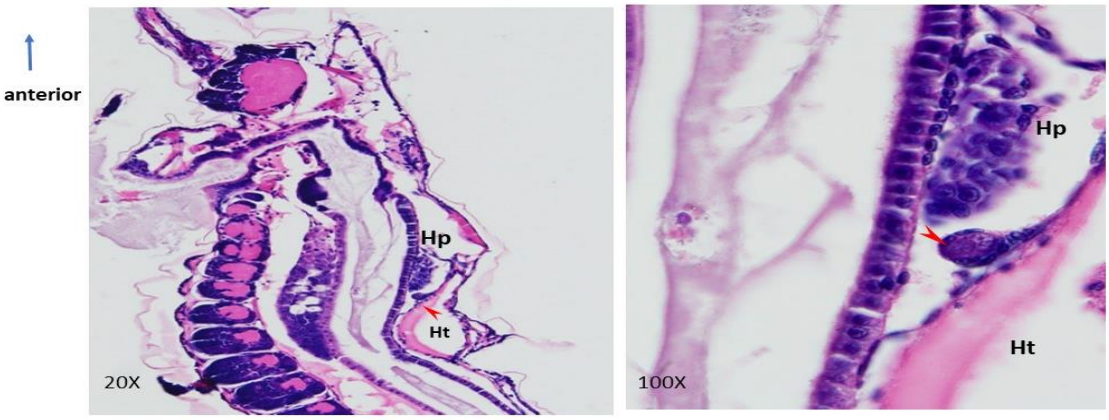


รูปที่ 7 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in mysis and post-larva day 1 of *Fenneropenaeus merguiensis*: (A) the mysis 3 stage; (B) with magnification; and (D) the postlarva 1 stage; (E, F) with magnifications; (C, G) the negative control without anti-vasa did not develop a brown color in any tested stage, scale bars represent 2 μm for A, C, D and G, 8 μm B, E and F. The experiment was performed in triplicate using three samples of each stage (Chimnuan et al., 2022)

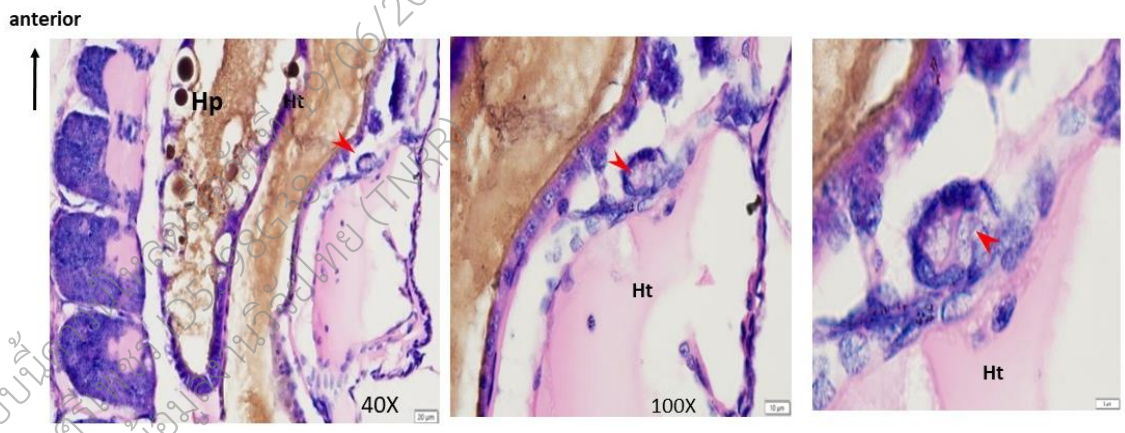
เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้ลงทะเบียนเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ชนิดา ศรีเพชร ID5310238G38
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งชาติ มหาวิทยาลัยนเรศวร (TNRR)

4. การศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในกุ้งโดยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา Histology

การศึกษาการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์สืบพันธุ์ในกุ้งโดยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อใช้ในการศึกษาการเคลื่อนที่ และ พัฒนาการของ Primodial germ cells (PGCs) ของกุ้งขาวและแชบ๊วยเพื่อเป็นแบบแผนในการหาระยะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia เริ่มมีการสร้างโคโลนีในกุ้ง postlarva ระยะที่ 1 ของทั้งกุ้งแชบ๊วย (รูปที่ 8) และกุ้งขาว (รูปที่ 9) และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้น ยังพบ PGCs เคลื่อนที่ ในPL7 และ PL10 (รูปที่ 10) และเพิ่ม มากขึ้นและเริ่มมีการสร้าง PGCs โคโลนีที่บริเวณขอบตับในPL 15 ซึ่ง PGCs เหล่านี้ตรวจพบ VASA germ cell marker (ไม่ได้แสดงในที่นี้) (รูปที่ 11)และPGCs จะเพิ่มจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนพัฒนาเป็น gonadซึ่งเป็น testisในตัวผู้ และovaryในตัวเมีย

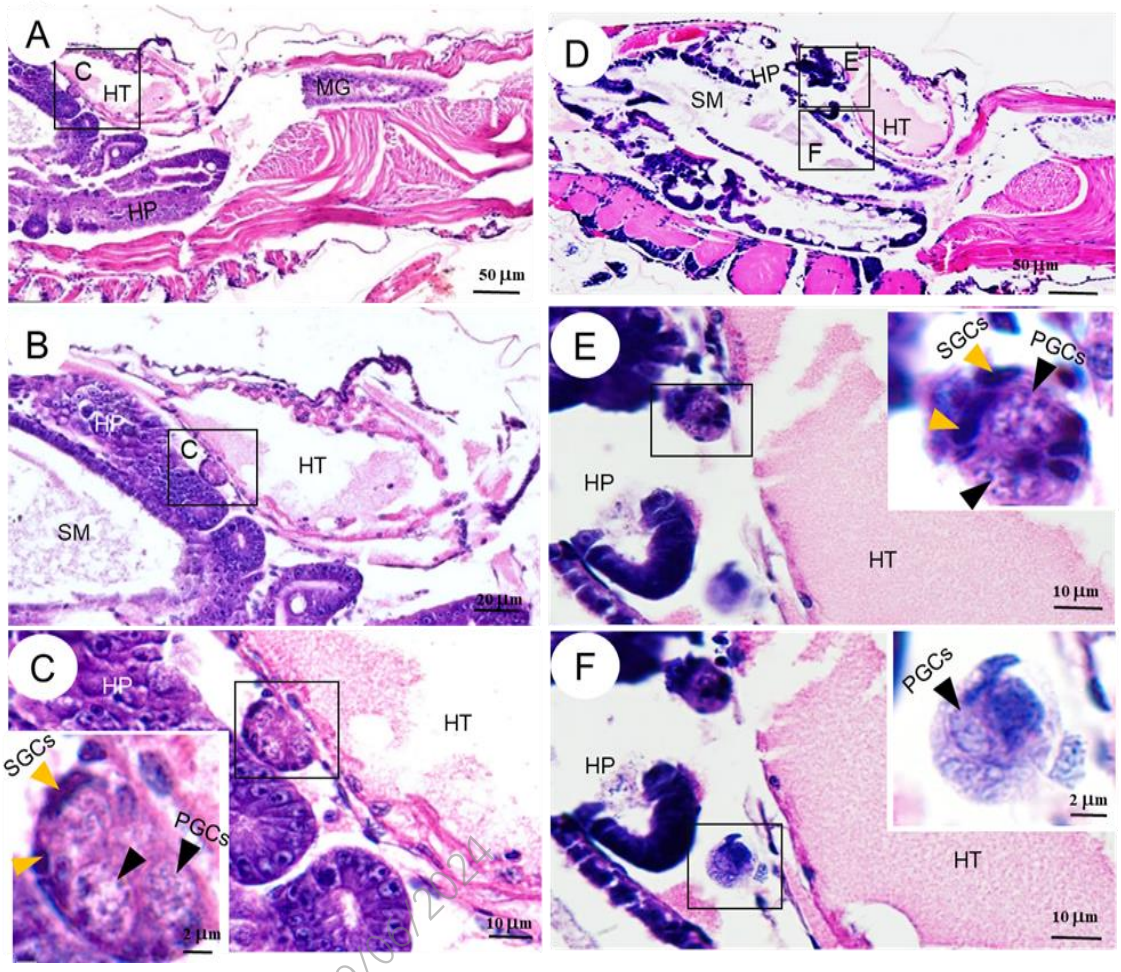


รูปที่ 8 Early gonad development of *F. merguiensis* during postlarva stage 1 (PL1), saggital section whole body of PL1 and H&E staining, arrowhead pointed primidial germ cell, Hp-hepatopancreas, Ht- heart, images were taken under a BX-53 light microscope equipped with a DP-72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).



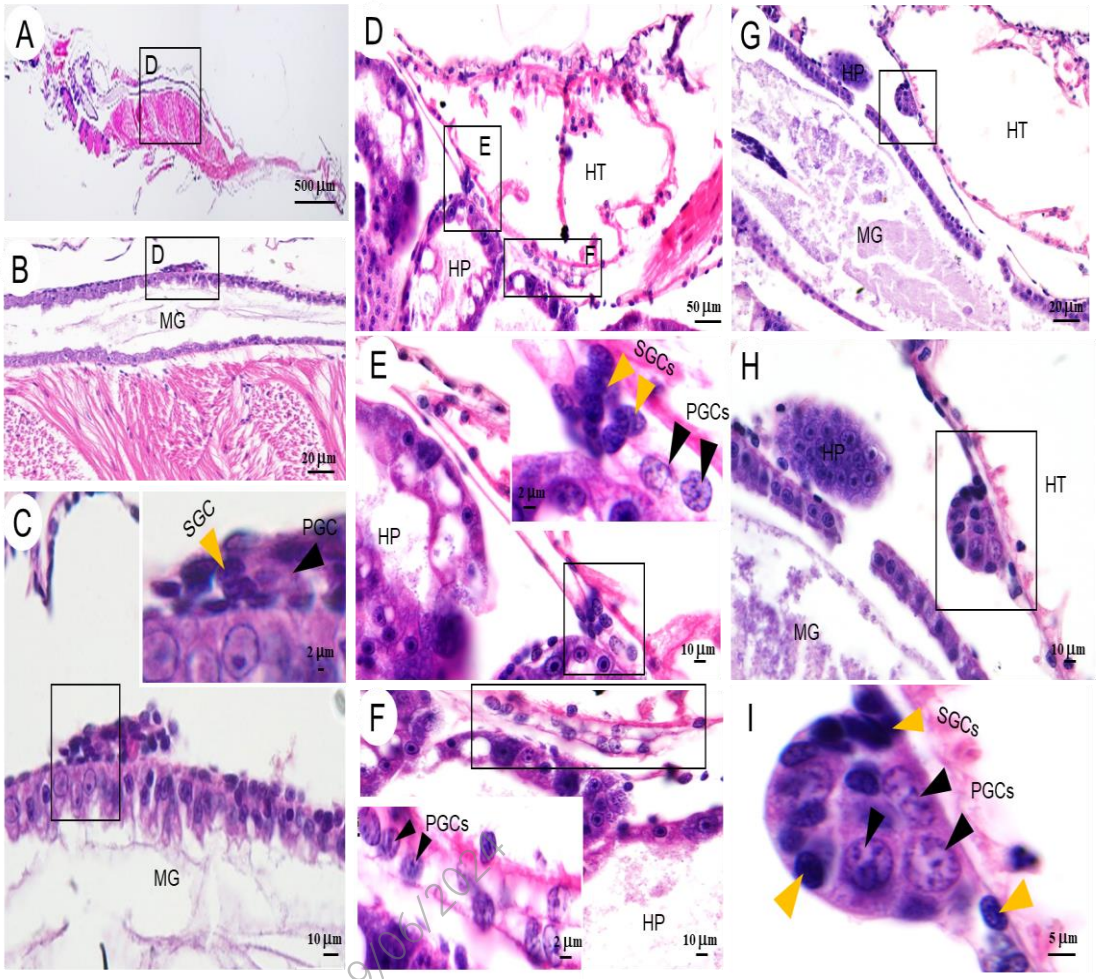
เอกสารฉบับนี้ [illegible] 9706/2024
โดย ธนดล [illegible] 05 [illegible] ในระบบ (TNRR)
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย

รูปที่ 9 Early gonad development of *P. vannamei* during postlarva stage 1 (PL1), saggital section whole body of PL1 and H&E staining, arrowhead pointed primidial germ cell, Hp-hepatopancreas, Ht- heart, images were taken under a BX-53 light microscope equipped with a DP-72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan).



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ เมื่อวันที่ 19/07/2024
โดย ณัฐดนัย ศรีพงษ์ ID 6398G38
ภายใต้โครงการอนุรักษ์จามจุรีไทย (TNRR)

รูปที่ 10 Sagittal sections of the whole protozoa in PL7(A-C) and PL10 (D-F) of *F. merguiensis*. A–F stained with H&E. A gross picture of PL7 (A) and PL10 (D). The PCGs (black arrowheads) were found to colonize at the outer line of the heart while they tended to increase cell numbers in PL7 (B) and PL10 (E). The PGCs migrating have arrived at the gap between the heart and hepatopancreas, where the genital ridge will be formed. Yellow arrowheads demonstrated the somatic germ cells (SGCs) assisted with PGCs. Bar of A and D are 50 µm. The bar of B is 20. The bars of C E-F are10 µm, respectively. Bar of C *insert* and F *insert* are 2 µm. CP: carapace, HT: heart, HP: hepatopancreas, and SM: stomach.



รูปที่ 11 Sagittal sections of the whole protozoa (PL15) of *F. merguiensis*. A–D stained with H&E. A gross picture of PL15 (A), migrating PGCs (black arrowhead), and SGC (yellow arrowhead) have arrived at the outer line of the midgut (C). The PGCs migrated to the lower side of the anterior heart border and to the surface of the hepatic line (D-F). The PCGs cluster was found at the outer line of the heart while they tended to increase cell numbers where the genital ridge will form (G-I). The bar of A is 500 µm. B to D are high magnification of PL15. The bar of B and D are 20 and 50, respectively. The bar of C, E-F, and H is 10 µm. The bar of I is 5 µm. Bar of C *insert*, E *insert* and F *insert* are 2 µm. CP: carapace, HT: heart, HP: hepatopancreas, and MG: midgut.

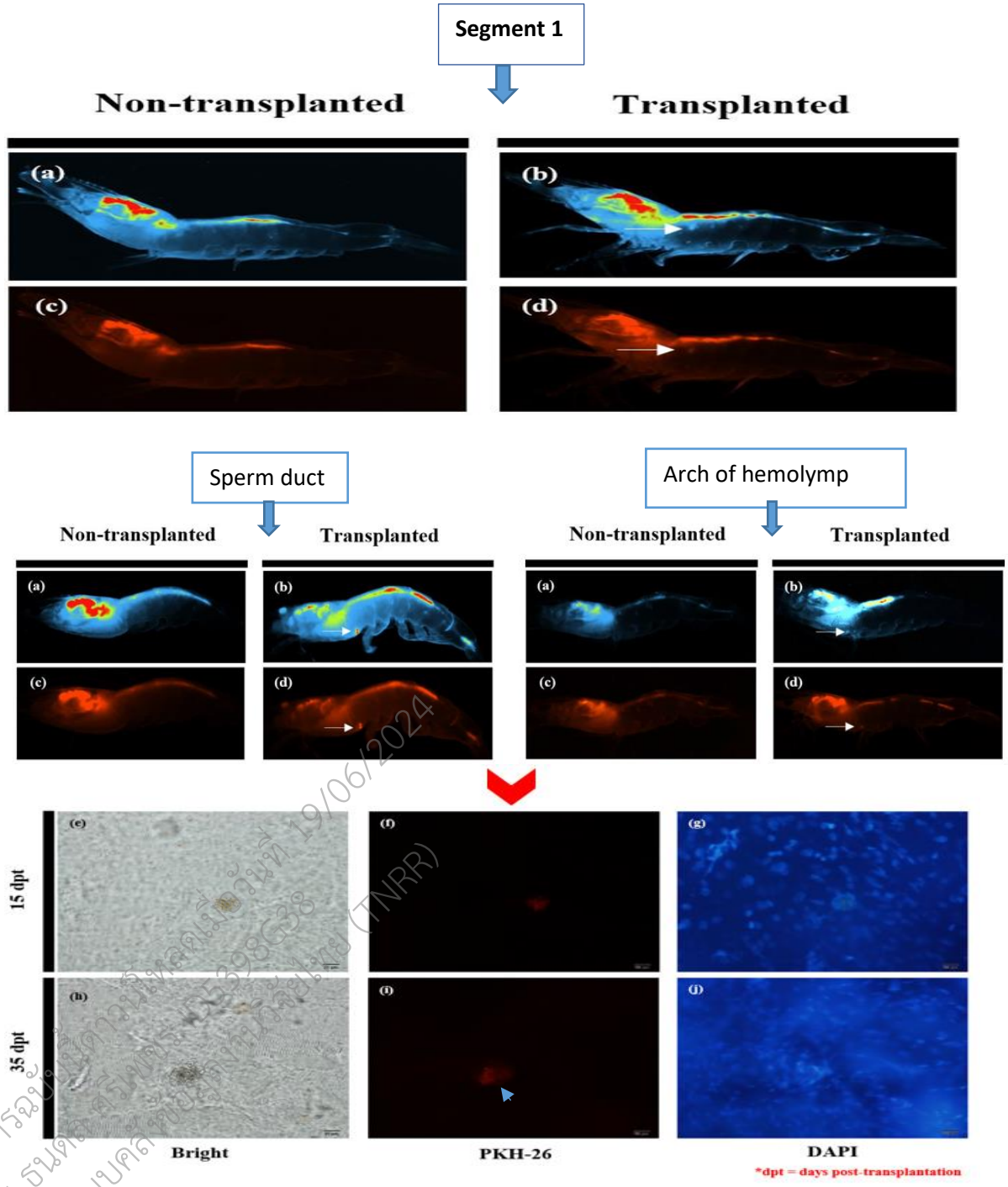
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับ... ลงวันที่ 19/06/2... โดย ... ภายใต้โครงการ ...

5 การถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)ไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว)

5.1 การค้นหาตำแหน่งในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia กุ้งแชบ๊วย (donor)ไปยังกุ้งตัวรับ(กุ้งขาว)ที่ตำแหน่งArch of hemolymph, Sperm duct และ segment 1

การทดลองนี้ได้ทดลองฉีดกุ้งเพื่อหาตำแหน่งที่เหมาะสมในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia เพื่อให้ เซลล์ที่ถ่ายโอนสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนได้ที่gonadตัวรับ เบื้องต้นได้ถ่ายโอนไปยัง 4 ตำแหน่ง ได้แก่บริเวณใต้ ที่ Arch of hemolymph (แอ่งเลือด), Head ของ Post-larvaL10 (ตายภายหลังฉีดทั้งหมด), ที่ segment1 และ ที่sperm duct ของกุ้งตัวรับ และ ที่ segment1 ผลการตรวจสอบด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์พบว่าสามารถติดตาม เซลล์ที่ฉีดได้ประมาณ 3-4 อาทิตย์สีจะค่อยๆจางไปซึ่งจากลักษณะที่เห็นจะพบว่าสีฟลูออเรสเซนต์คงอยู่ตรงบริเวณตำแหน่งที่ฉีด ไม่พบการเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่พบ testis หรือ ovary ของกุ้งที่ซึ่งปกติจะวางอยู่ตำแหน่งระหว่างตับและหัวใจของกุ้ง แสดงใน**รูปที่ 12** ดังนั้นจึงตรวจการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ฉีดและผลการตรวจสอบด้วย Molecular markers โดย genomic molecular marker ของ กุ้งแชบ๊วยได้แก่ Fm15, VASA 160และ VASA 741 พบว่าการฉีด spermatogoniaของกุ้งแชบ๊วยที่แอ่งเลือดของกุ้งขาวนั้นสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยได้ที่ testis กุ้งตัวรับภายหลังฉีดเซลล์ที่ 9 และ 10 สัปดาห์ โดย molecular marker Fm15และ VASA 160 (**ตารางที่ 3**) ซึ่งเป็น genomic DNA การฉีด spermatogonia ที่ segment 1สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยได้ที่ testis กุ้งตัวรับภายหลังฉีดเซลล์ที่ 6 สัปดาห์ โดย molecular marker Fm15 และ VASA 741(**ตารางที่ 4**) และ เมื่อฉีดเข้า sperm duct ตรวจพบดีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยใน testisของกุ้งตัวรับโดย VASA160(**ตารางที่ 5**) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าสามารถตรวจพบ genomic ดีเอ็นได้ใน testis ซึ่งแสดงว่ามี มีเอ็นเอของกุ้งแชบ๊วยสามารถเข้าไปยังที่ testisโดยการฉีดที่segment 1 และจากการฉีดที่แอ่งเลือด แต่ไม่พบ mRNAของVASA ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า spermatogoniaที่ฉีดเข้าไปในกุ้งตัวรับถูกทำลายภายหลังการฉีดหรือไม่มีการเพิ่มจำนวนของ spermatogonia หากแต่ยัง สามารถตัวพบดีเอ็นเอได้

เอกสารฉบับนี้ได้รับการอนุมัติจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) เมื่อวันที่ 17/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพ็ชร์ 1 1253BG0
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยแห่งชาติ (NRIIS)



รูปที่ 12 Fluorescent signal of spermatogonia cells from *Fenerropenaeus merguiensis* after 15 day post transplantation into segment 1, sperm sac and arch of hemolymph (of *Penaeus vannamei*. Arrow pointed fluorescent cells.

ตารางที่ 3 Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into arch of hemolymph and carapace of *P. vannamei* using molecular markers Fm-15, VASA160 and VASA741

Gr. 5-6 cm	wks	#Sam/ Pos flu	Genomic marker/Positive									cDNA marker VASA741 /Positive	
			Fm-15			VASA160			VASA741				
			Head	Testis	Vas	Head	Testis	Vas	Head	Testis	Vas	Head	Testis
Arch	1	8/5											
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X
	9		√	√	-	X	X	-	X	X	-	-	-
	11		X	√	√	X	√	√	?	?	?	-	-
Head5-6 cm		8/0(die)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4 Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into segment 1 of *P. vannamei* using molecular markers Fm-15, VASA160 and VASA741

Gr. 8 cm.	wks	#sam/ pos flu	Genomic marker (# sample/ #Positive)									cDNA marker VASA741 (#sample/ #Pos)	
			Fm-15			VASA160			VASA741				
			Head	Testis	Vas	Head	Testis	Vas	Head	Testis	Vas	Head	Testis
Seg1		10/6											
	3		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/0	1/0
	5		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/0	1/0
	6		1/0	1/1	-	-	-	-	1/0	1/1	-	-	-
	8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนัตถ์ ศรีพยุ ID5398638
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ตารางที่ 5 Detection of *F. merguiensis* DNA and mRNA of *F. merguiensis* after transplantation into sperm duct of *P. vannamei* using molecular markers Fm-15, VASA160 and VASA741

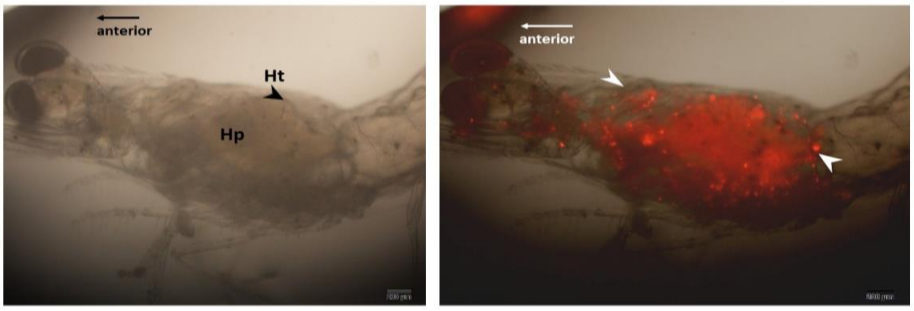
Days	#Sample/Positive fluorescent (% survival rate 65%)			Genomic marker(Number sample/ %Positive)						cDNA marker VASA160 (Number sample/ %Positive)		
				Fm-15			VASA160					
	Testis	Vas	Sac	Testis	Vas	Sac	Testis	Vas	Sac	Testis	Vas	Sac
2	3/2	3/3	3/2	3/?	3/?	3/?	3/0	3/1	**3/0**	3/0	3/0	-
6	3/1	3/2	3/3	3/?	3/?	3/?	1/0	1/0	**1/1**	1/0	1/0	-
9	3/3	3/2	3/3	3/?	3/?	3/?	1/0	1/0	**1/0**	1/0	1/0	-
12	3/2	3/2	3/2	3/?	3/?	3/?	3/2	3/2	**3/2**	3/0	3/0	-
21	3/3	3/3	3/3	3/?	3/?	3/?	1/0	1/0	**1/0**	1/0	**1/0**	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ
โดย ธนิดา ศรีเพชร ID 3985638
การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น
ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
จากเว็บไซต์คลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

5.2 การทดสอบการถ่ายโอนเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วยไปสู่กุ้งขาวระยะต่างๆ

จากการศึกษาการเคลื่อนที่ และ พัฒนาการของ Primodial germ cells (PGCs) ของกุ้งขาวและกุ้งแชบ๊วย เพื่อเป็นแบบแผนในการหาระยะที่เหมาะสมในการถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia โดยการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่า PGCsของทั้งกุ้งขาวและกุ้งแชบ๊วย เริ่มมีการสร้างโคโลนี ใน PL 1 ของทั้งกุ้งแชบ๊วยและกุ้งขาวตามที่กล่าวแล้วข้างต้น และเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นยังพบ PGCs เคลื่อนที่ใน postlarva 7 (PL7), PL 10 และ PL15 และเพิ่มมากขึ้นและเริ่มมีการสร้าง PGCs เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆจนพัฒนาเป็น gonad ซึ่งเป็น testis ในตัวผู้และovary ในตัวเมีย ดังนั้นจึงทดลองถ่ายโอนเซลล์ spermatogonia เข้าตัวอ่อน จึงฉีด spermatogonia cells ฉีดเข้าบริเวณใต้carapace ของกุ้ง ในกุ้ง 3 ระยะ PL4 , PL 9, PL16 สามารถตรวจพบสี Fluorescent ใน 4 สัปดาห์หลังจากฉีดในระยะ PL4 และ PL9 และPl16 แสดงในตัวอย่างรูปที่ 12 และพบการเคลื่อนที่ของสี fluorescent จากตำแหน่งที่ฉีดไปอยู่ระหว่างตำแหน่งที่คาดว่าจะพัฒนาเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ต่อไป ร้อยละอัตรารอดของกุ้ง PL4, PL 9, PL 16 เมื่อครบใน 4 สัปดาห์มีปริมาณ ร้อยละ 26, 47 และ 14 ตามลำดับ อัตราการตรวจพบกลุ่ม fluorsescence มีปริมาณร้อยละ 24, 10 และ 57 ของกุ้งที่รอดชีวิตตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีอัตราการรอดที่ดีขึ้นเมื่อครบ 4 สัปดาห์ และตำแหน่ง

การเคลื่อนที่ของ Spermatogonia เคลื่อนไปยังตำแหน่งที่คาดว่าจะเป็นจุดกำเนิดของ gonad การทดลองนี้เป็นการทำเพียงครั้งเดียว ซึ่งต้องทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง ให้ได้ข้อมูลน่าเชื่อถือมากขึ้น และทำให้ต้องมีการพัฒนาความชำนาญของผู้ที่ทำการถ่ายโอน และเพื่อให้เหลือกุ้งที่เจริญเติบโตจนสามารถพัฒนาเป็น gonad และมีกุ้งเหลือที่จะตรวจสอบด้วยmolecular marker เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของ spermatogonia และพัฒนาเป็นเสปิร์ม ในกุ้งตัวรับได้ต่อไป การทดลองเพิ่มเติมต่างๆคาดว่าต้องใช้เวลาเนื่องจากต้องรอจนกุ้งพัฒนาจาก postlarva จนโตเต็มวัยเพื่อพัฒนาtestis และ spermatogonia พัฒนาเป็นเสปิร์มได้



รูปที่ 13 Transplanted fluorescent cells of *F. merguiensis* in *P. vannamei* located between heart and hepatopancreas. Lateral view of the transplant PL9 after 4 wks post transplantation, left picture was the transplanted shrimp was inspected under bright field microscope and right picture was under fluorescent light, IX-73 phase contrast microscope equipped with DP-72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan)

เอกสารนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ณัฐพล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ตารางที่ 6 Survival rate and fluorescent cluster rat after 1 trial transplantation in the recipient PL4, PL9 และ PL16.

Stage of recipient	1 st Trials of transplantation	No. of survived 4 wpt	No. of Survival rate (%)	No. of fluorescent cluster	fluorescent cluster rate (%) of survived shrimp
PL4	140	37	26.4	9	24.3
PL9	150	71	47.3	7	9.9
PL16	100	14	14.0	8	57.1

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยนั้นจำเป็นต้องศึกาปัจจัยที่เกี่ยวข้องก่อนเพื่อการฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยจะทดลองได้ ได้แก่

1. การหาระยะที่เหมาะสมของกุ้งแชบ๊วย (donor) ในการเตรียม spermatogoniaซึ่งพบว่าขนาดของกุ้

ควรมีขนาด11-13 เซนติเมตร

2. ศึกษาระยะกุ้งตัวรับที่เหมาะสมในการจะนำมาใช้เป็นกุ้งตัวรับควรอยู่ที่ระยะน้อยกว่า postlarva 203. การปลูกถ่ายเซลล์ spermatogonia ไปยังกุ้งตัวรับได้ทำการทดลองหลายตำแหน่งได้แก่ segment 1, sperm duct, arch of artery และ ใต้ carapace หากแต่การฉีดใต้ carapace นั้นกุ้งตัวรับตายหมด ตำแหน่งที่ เหมาะสมควรเป็นตำแหน่งที่ใต้ carapace เนื่องจากมีช่องว่างเป็นตำแหน่งของtestis และ ovary หากแต่ต้องใช้ความชำนาญในการดำเนินการ

4. ตรวจสอบผลของการปลูกถ่ายเซลล์เบื้องต้นด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์ และ molecular markersพบว่าเมื่อฉีดเซลล์ที่ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์สามารถติดตามสีได้ตั้งแต่ฉีดเซลล์ตลอดจนถึง 4 อาทิตย์ และเมื่อตรวจสอบด้วย molecular markers พบว่า เมื่อฉีดเซลล์ spermatogonia เข้าที่segment 1, sperm duct, arch of artery สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของ spermatogoniaที่ฉีดได้ที่testisของกุ้งตัวรับหากที่ตรวจพบจะเป็นgenomic DNA และไม่ตรวจพบ cDNA ของ spermatogoniaที่ฉีดแสดงว่าเซลล์ที่ฉีดเข้าสามารถเคลื่อนที่ไปยัง testis ได้แต่ไม่พบเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ซึ่งได้ทดลองซ้ำฉีดที่ตำแหน่งที่ใต้ carapace พบว่าอัตราการรอดดีขึ้นหากต้องรอเวลาจนกว่ามีการพัฒนา testis จึงจะตรวจหา spermatogonia ของกุ้งตัวให้ (Donor) ด้วย molecular markersซึ่งไม่สามมารถทำได้ทันในโครงการนี้ การดำเนินงานตามแผนแสดงใน**ตารางที่ 7** และ สรุปผลผลิต ผลลัพธ์ใน**ตารางที่ 8**

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/6/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398538
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THAIRR)

ตารางที่ 7 การดำเนินงานวิจัยเปรียบเทียบแผนการดำเนินงานที่เสนอไว้ (ระบุวิธีการดำเนินงานวิจัยที่สำคัญโดยสรุป และแสดงแผนการดำเนินงานรายกิจกรรมและระยะเวลาที่ใช้ เปรียบเทียบการดำเนินงานจริง)

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 2 การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย**

กิจกรรมการดำเนินงานวิจัย	ระยะเวลาดำเนินงาน (เดือน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ปี 2564												
1) หาระยะที่เหมาะสมของกุ้งแชบ๊วย (donor) ในการเตรียม spermatogonia												
2) ศึกษาระยะกุ้งตัวรับที่เหมาะสมในการจะนำมาใช้เป็นกุ้งตัวรับ												
3) ปลูกถ่ายเซลล์ spermatogonia ไปยังกุ้งตัวรับ												
4) ตรวจสอบผลของการปลูกถ่ายเซลล์เบื้องต้นด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์และ molecular markers												
5)สรุปผลและเขียนอนุสิทธิบัตร/สิทธิบัตร หรือผลงานตีพิมพ์												

แผนการดำเนินงาน

ผลการดำเนินงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้จากระบบโทรสารอิเล็กทรอนิกส์ ณ วันที่ 19/06/2024
โดย ธันตะ ศรีเพชร ID5398038
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

4. สรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR

ตารางที่ 8 สรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR **(Output/Outcome/Impact)**

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 2 การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย**

4.1 ผลผลิต

รายการ	**รายละเอียด**
1) องค์ความรู้	กระบวนการเตรียมเซลล์ spermatogonia ระยะที่เหมาะสมของกุ้งแชบ๊วยในการใช้เตรียมเซลล์ spermatogonia ระยะที่เหมาะสมของกุ้งในการเป็นตัวรับ
2) บทความวิชาการ	Chimnuan, J., Saetan, J., Chotigeat, W., 2022. Primordial germ cells (PGCs) migration in Banana shrimp: *Fenneropenaeus merguiensis*. Agric. Nat. Resour. 56, 497–502. Chimnuan, J., Saetan, J., Chotigeat, W., 2022. Histology and molecular aspect of gonad development in Banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis.* Manuscript for submission
3) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ	นำเสนอแล้ว

5.2 ผลลัพธ์ *(โปรดระบุผลลัพธ์จากผลผลิตภายใต้โครงการ)*

รายการ	**รายละเอียด**
1) นักศึกษาปริญญาโท	มีนักศึกษาปริญญาโทในโครงการ 1 คน สำเร็จการศึกษาแล้ว มิ.ย 2565
1) นักศึกษาปริญญาเอก	มีนักศึกษาปริญญาเอกในโครงการ 1 คน (คาดว่าสำเร็จการศึกษา 2566)
2) กระบวนการ	กระบวนการเตรียมเซลล์ spermatogoniaเพื่อการถ่ายโอนยีน

4.3 ผลกระทบ *(โปรดระบุผลกระทบได้จากผลลัพธ์ภายใต้โครงการ)*

รายการ	**รายละเอียด**
การจ้างงาน	ผู้ช่วยวิจัยนักศึกษาปริญญาโท
การพัฒนาบุคลากร	นักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโทมีวัสดุและสารเคมีในการวิจัย

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเก็บรักษาไว้ในระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)
โดย ธนพล ศรีเพชร ID 6298G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR) วันที่ 19/06/2024

5. เอกสารอ้างอิง (Reference)

Chimnuan, J., Saetan, J., Chotigeat, W., 2022. Primordial germ cells (PGCs) migration in Banana shrimp: Fenneropenaeus merguiensis. Agric. Nat. Resour. 56, 497–502.

Cinalli, R.M., Rangan, P., Lehmann, R., 2008. Germ cells are forever. Cell 132, 559–562. https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.02.003

Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R., 2008. Paraffin embedding tissue samples for sectioning. Cold Spring Harb Protoc. doi.org/10.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 3, 294–299. https://doi.org/10.1071/ZO9660275

Honaramooz, A., Behboodi, E., Blash, S., Megee, S.O., Dobrinski, I., 2003. Germ cell transplantation in goats. Mol. Reprod. Dev. 64, 422–428. https://doi.org/10.1002/mrd.10205

Honaramooz, A., Megee, S.O., Dobrinski, I., 2002. Germ cell transplantation in pigs. Biol. Reprod. 66, 21–28. https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.21

Lacerda, S.M.S.N., Batlouni, S.R., Silva, S.B.G., Homem, C.S.P., França, L.R., 2006. Germ cell transplantation in fish: the Nile-tilapia model. Anim. Reprod. 3, 146–159.

Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., França, L.R., 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. Fish Physiol. Biochem. 39, 3–11. https://doi.org/10.1007/s10695-012-9606-4

Lee, S., Iwasaki, Y., Yoshizaki, G., 2016. Long-term (5 years) cryopreserved spermatogonia have high capacity to generate functional gametes via interspecies transplantation in salmonids. Cryobiology 73, 286–290. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.08.001

Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (Seriola quinqueradiata). Biol. Reprod. 86, 176–177. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.097873

Nagasawa, K., Ishida, M., Octavera, A., Kusano, K., Kezuka, F., Kitano, T., Yoshiura, Y., Yoshizaki, G., 2019. Novel method for mass producing genetically sterile fish from surrogate broodstock

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองโดย ธนดา ศรีเพชร ID-3960036 วันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THAIRR)

via spermatogonial transplantation. Biol. Reprod. 100, 535–546. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy204

Octavera, A., Yoshizaki, G., 2019. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in Chinese rosy bitterling. Biol. Reprod. 100, 1108–1117. https://doi.org/10.1093/biolre/ioy236

Okutsu, T., Shikina, S., Sakamoto, T., Mochizuki, M., Yoshizaki, G., 2015. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female recipients and subsequent production of YY supermales in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. Aquaculture 446, 298–302. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.020

Pérez Farfante, I., Kensley, B., 1997. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. Mémoires du Muséum Natl. d'Histoire Nat. 175, 1–233.

Potiyanadech, W., Saetan, U., Choomee, C., Chotigeat, W., 2022. Molecular markers for differentiation of Fenneropenaeus merguiensis among Penaeus species. Aquac. Res. 00, 1–12. https://doi.org/10.1111/ARE.15901

Saetan, U., Sangket, U., Deachamag, P., Chotigeat, W., 2016. Ovarian Transcriptome Analysis of Vitellogenic and Non-Vitellogenic Female Banana Shrimp (Fenneropenaeus merguiensis). PLoS One 11, e0164724. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164724

Sooksawat, T., Boonthai, T., Nimrat, S., Vuthiphandchai, V., 2019. Development of cryopreservation methods for silver barb (Barbodes gonionotus, Bleeker) spermatozoa by manipulation of cooling rates in dry shipper. Aquac. Res. 50, 2289–2299. https://doi.org/10.1111/are.14114

Stockwell, S., Herrid, M., Davey, R., Brownlee, A., Hutton, K., Hill, J.R., 2009. Microsatellite detection of donor-derived sperm DNA following germ cell transplantation in cattle. Reprod. Fertil. Dev. 21, 462–468. https://doi.org/10.1071/RD08130

Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., Yoshizaki, G., 2009. Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, Nibea mitsukurii (Perciformes, Sciaenidae). Biol. Reprod. 81, 1055–1063. https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.077701

Trefil, P., Micáková, A., Mucksová, J., Hejnar, J., Poplstein, M., Bakst, M.R., Kalina, J., Brillard, J.-P.,

เอกสารฉบับนี้ได้รับการยืนยันว่า
โดย ธนัตถ์ ศรีนาคา วันที่ 19/06/2024
จากระบบคลังปัญญาของจุฬาฯ (CUIR)
D5398028

2006. Restoration of Spermatogenesis and Male Fertility by Transplantation of Dispersed Testicular Cells in the Chicken1. Biol. Reprod. 75, 575–581. https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.050278

Yazawa, R., Takeuchi, Y., Machida, Y., Amezawa, K., Kabeya, N., Tani, R., Kawamura, W., Yoshizaki, G., 2019. Production of triploid eastern little tuna, Euthynnus affinis (Cantor, 1849). Aquac. Res. 50, 1422–1430. https://doi.org/10.1111/are.14017

Yoshizaki, G., Takashiba, K., Shimamori, S., Fujinuma, K., Shikina, S., Okutsu, T., Kume, S., Hayashi, M., 2016. Production of germ cell-deficient salmonids by dead end gene knockdown, and their use as recipients for germ cell transplantation. Mol. Reprod. Dev. 83, 298–311. https://doi.org/10.1002/mrd.22625

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J., Chen, S.L., 2005. Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (Paralichthys olivaceus) embryos. Theriogenology 63, 763–773. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.04.011

Fisheries Statistics Analysis and Research Group, Fisheries Development Policy and Strategy Division, Department of Fisheries Ministry of Agriculture and Cooperatives. Document No. 3/2019. https://www.fisheries.go.th/strategy-stat/themeWeb/books/2560/4/shrimp_2560.pdf, excess 12 July 2022.

Fisheries Statistics Analysis and Research Group, Fisheries Development Policy and Strategy Division, Department of Fisheries Ministry of Agriculture and Cooperatives. Document No. 13/2020. https://www4.fisheries.go.th/doffile/fkey/ref67695, excess 12 July 2022.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร (053208G33)
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (NRR)

6. รายงานการเงิน

แบบวิจัย 5/งบแผ่นดิน

รายงานสรุปแสดงรายการค่าใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัย
จากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ชื่อโครงการย่อยที่ 2 (ภาษาไทย) การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย
(Germ Cell Transplant Technology in Banana shrimp)
ชุดโครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
(ภาษาอังกฤษ) Germ Cell Transplant Technology in aquaculture
ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2564 จำนวน 801,867.00 บาท (แปดแสนหนึ่งพันแปดร้อยหกสิบเจ็ดบาทถ้วน) ได้ใช้จ่ายเงินทั้งโครงการไปแล้วทั้งสิ้น จำนวน 801,910.32 บาท (แปดแสนหนึ่งพันเก้าร้อยสิบบาทถ้วนสามสิบสองสตางค์) (รวมเงินงวดสุดท้ายที่ยังไม่ได้เบิกจากคณะ/หน่วยงานด้วย) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

หมวดค่าใช้จ่าย	บาท	สต.
1. หมวดค่าจ้างชั่วคราว 1. ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย นักศึกษาปริญญาโท เดือนละ 10,000 บาท จำนวน 12 เดือน ค่าลงทะเบียน 2 ภาคการศึกษา และผู้ช่วยวิจัยวุฒิปริญญาตรี 11801,910.32 เดือน เดือนละ 15,000 บาท	344000	00
2. หมวดค่าวัสดุ วัสดุและสารเคมี เช่น สารเคมีสกัดดีเอ็นเอ การทำ PCR การทำ insitu hybridization ค่าตัวอย่างกุ้ง สารเตรียม spermatogonia หลอดทดลองพลาสติและอื่นๆ	432525.43	00
3. ค่าใช้สอย ค่าน้ำมันรถ ค่าตอบแทนคนขับรถไปเอาตัวอย่างกุ้ง ค่าใช้สอยอื่นๆ เช่น น้ำยาล้างเครื่องแก้ว กระดาษเช็ดมือ ปากกาเขียนหลอดทดลอง ถุงพลาสติก และอุปกรณ์อื่นที่จำเป็นสำหรับการทดลอง	33984	89
รวมเงิน แปดแสนหนึ่งพันเก้าร้อยสิบบาทถ้วนสามสิบสองสตางค์	801,910	32

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

(ลงชื่อ).....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิไลวรรณ โชติเกียรติ)
หัวหน้าโครงการฯ
วันที่...../...../.....

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สหัช จันทนาอรพินท์)
หัวหน้าสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
วันที่...../...../.....

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/08/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5908681
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (NRIR)

ภาคผนวก

Publication

Chimnuan, J., Saetan, J., Chotigeat, W., 2022. Primordial germ cells (PGCs) migration in Banana shrimp: Fenneropenaeus merguiensis. Agric. Nat. Resour. 56, 497–502

Manuscript

Chimnuan, J., Saetan, J., Chotigeat, W., 202x. Hiostology and molecular aspect of gonad development in Banana shrimp, *Fenneropenaeus merquiensis.*

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Agr. Nat. Resour. 56 (2022) 497–502

AGRICULTURE AND NATURAL RESOURCES

Journal homepage: http://anres.kasetsart.org

Research article

Primordial germ cell migration in banana shrimp: *Fenneropenaeus merguiensis*

Jirakanit Chimnual[a,†], Wutthipat Potiyanadech[a,†], Jirawat Saetan[b,*], Wilaiwan Chotigeat[a,c,*]

[a] *Division of Biological Science, Molecular Biotechnology and Bioinformatics program, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand*

[b] *Division of Health and Applied Sciences, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand*

[c] *Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand*

Article Info

Article history:
Received 19 January 2022
Revised 3 March 2022
Accepted 6 April 2022
Available online 17 June 2022

Keywords:
F. merguiensis,
Immunohistochemistry,
Vasa,
Vasa-like protein,
Whole-mount

Abstract

Importance of the work: For broodstock preparation and germ cell transplantation in *Fenneropenaeus merguiensis*, essential information on primordial germ cell (PGC) migration is lacking.

Objectives: To locate and track PGCs in *F. merguiensis* by detecting vasa-expressed cells during gonad development.

Materials & Methods: Immunohistochemistry of the vasa-like protein was performed to validate the vasa of the spermatogonia in the shrimp testis. Using whole-mount staining of the vasa-like protein, migrating PGCs were detected in the fertilized egg and the nauplius 4, zoea 3, mysis 3 and postlarva 1 stages.

Results: The vasa-like protein in the spermatogonia of the adult testis was specifically detected based on immunohistochemistry. Using whole-mount immunohistochemistry, the stained vasa-like protein was identified around the egg margin of fertilized eggs. In the nauplius 4 stage, vasa-like protein in PGCs was found in the ventral aspect of the cephalothorax region. In the zoea 3 and mysis 3 stages, vasa-like protein was detected in PGCs at the ventral aspect of the cephalothorax and migrated to the pereopod parts. Finally, in the postlarva 1 stage, the appearance of the vasa-like protein in PGCs was noted in the cephalothorax, pereopod and telson.

Main finding: Vasa-like protein was identified and indicated the migration of PGCs during gonad formation in *F. merguiensis* larvae. The obtained information should facilitate PGC tracking and provide valuable information for germ cell manipulation concerning gonad development in shrimp.

† Equal contribution.
* Corresponding author.
E-mail address: wilaiwan58@hotmail.com (W. Chotigeat)

online 2452-316X print 2468-1458/Copyright © 2021. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/), production and hosting by Kasetsart University of Research and Development Institute on behalf of Kasetsart University.

https://doi.org/10.34044/j.anres.2022.56.3.06

เอกสารฉบับนี้ถูกนำมาเผยแพร่ในโหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนพล ศรีพร ID5398G38
จากระบบบริการแหล่งงานวิจัยไทย (ThaiRP)

Introduction

The Banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis*, is a common species in the Gulf of Thailand and the Andaman Sea (Saetan et al., 2016). It is a commercial species and a consumer favorite that commands a reasonable price; however, broodstocks have declined because of overfishing to meet demand (Wonglapsuwan et al., 2009). Furthermore, the complicated life cycle of the species is a barrier to broodstock recovery since this shrimp requires an offshore coastal spawning ground linked to a mangrove-lined estuarine nursery (Noor-Hidayati et al., 2014).

In the early development of organisms, primordial germ cells (PGCs) are in a different location from the gonad and using amoeboid movements they migrate to the gonadal precursors where they further differentiate into sperm or eggs. Therefore, the PGCs have to reach the somatic part of the gonad for it to perform its crucial role in the propagation of the species, serving as a general model for long-range cell migration (Raz and Reichman-Fried, 2006; Yön and Akbulut, 2015). Generally, in the males of organisms, PGCs differentiate into sperm cells during the processes of spermatogenesis and spermiogenesis (Richardson et al., 2010). In fish, PGCs are large, with a low nucleocytoplasmic ratio due to their limited cell division (Duangkaew et al., 2019). In *Fenneropenaeus chinensis*, PGCs were found initially in the early embryonic stage (Feng et al., 2011). A distinct nuclear border and granular nuclear chromatin were noted as characteristics of PGCs (Feng et al., 2011; Duangkaew et al., 2019). In the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, PGCs were oval with a prominent nucleus comprising 4–6 nucleoli. The PGCs of *M. rosenbergii* varied between 6–14 μm in diameter as the gonad developed (Rungsin et al., 2012). Therefore, the PGCs in crustaceans and fish could be typified as large cells with distinct nuclear chromatin.

The *vasa* gene first identified in *Drosophila* spp. encodes an adenosine triphosphate -dependent RNA helicase belonging to the DEAD-box family, which is detected during development before zygotic gene activation and expression restricted to migratory cells, most likely to be primordial germ cells (Olsen et al., 1997). Since the *vasa* gene expression is localized to the PGCs during early development, its activity is required for cell lineage. Surprisingly, a *vasa* homolog is also expressed in the somatic cells of planarian that somatic cells were identified as neoblasts a totipotent cell type that functions in regeneration (Raz, 2000). Therefore the *vasa* function is essential for preserving totipotency which inhibits the expression of genes that would lead to somatic differentiation (Seydoux et al., 1996; Raz, 2000; Yön and Akbulut, 2015).

The *vasa* gene has been identified as a germ cell marker in most animals and its expression is restricted to migratory PGCs and gonial cells in reproductive organs (Olsen et al., 1997). The *vasa* gene has been used as a molecular marker for studies on germ cell development and reproductive processes in several animals, such as Chinese shrimp, *F. chinensis*, (Feng et al., 2011), fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Renault, 2012), Pacific oyster, (*Crassostrea gigas*), (Fabioux et al., 2004), Japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*), (Wu et al., 2014) and the striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*, (Duangkaew et al., 2019).

Aflalo et al. (2007) characterized the *vasa* gene and considered it as a maternal factor contributing to embryos in *Litopenaeus vannamei*. In *F. chinensis*, the *vasa* transcript was detected in mature oocytes, fertilized eggs and throughout multiple embryonic stages. This gene is still expressed in the PGCs of the nauplius 4, zoea 3, mysis 3 and postlarva 1 stages (Türkmen, 2005; Feng et al., 2011).

To date, germ cell development and the reproductive processes in *F. merguiensis* are not known; however, they are essential for breeding technology, such as germ cell transplantation and artificial insemination (Herrid and McFarlane, 2013). The current study aimed to identify a vasa-like protein in migrating PGCs during the gonadal development of *F. merguiensis*. The study should provide basic information on gonad formation and help to clarify the optimal stage for spermatogonia transplantation during the cultivation of *F. merguiensis* and potentially of other shrimp species.

Materials and Methods

Animals

Banana shrimps were collected from a farm in Nakhon Sri Thammarat province, Thailand and reared in a cement tank containing aerated seawater. The mature shrimps were fed three times daily with shrimp pellets and the larvae were fed four times daily with artemia. To start the experiment, the fertilized eggs, the nauplius 4, zoea 3, mysis 3, postlarva 1 stages, and the adult testis (length 12 cm) were collected, fixed in 4% paraformaldehyde for 24 hr at 4 °C, transferred to phosphate buffered saline (PBS) and kept at 4 °C until used.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ (วช.) ตามประกาศ วช. ที่ 19/2564 ลงวันที่ 1 มิถุนายน 2564 โดย ธนาคารข้อมูลงานวิจัยแห่งชาติ (ThaiJO) ภายใต้ระบบการจัดการวารสารวิชาการ (TNRR)

Antibody

The nucleotide sequence of the *vasa* gene of *F. merguiensis* (GenBank accession no. MZ173499.1) was obtained from gonad transcriptome (Saetan et al., 2016); it contained the same conserved domains with *Drosophila* spp. (Lasko, 2013). In shrimp species, the glycine-rich domain is one of the conserved domains of *vasa* among *F. merguiensis*, *M. rosenbergii* (GenBank accession no. DQ339110.1) and *P. monodon* (GenBank accession no. HQ385221.1). The glycine-rich region containing the translated GRSRGGGRGGGRGGC amino acids was synthesized and used for anti-vasa production by the Genscript Company (NJ, USA).

Immunohistochemistry and whole-mount staining of vasa-like protein

The fixed testis (n = 3) were processed using the paraffin technique (Fischer et al., 2008) and the tissue was cut into 5 µm thick slices to be mounted on glass slides. Endogenous peroxidase was removed by submerging samples in a 3% H_2O_2 and methanol solution for 30 min in darkness at room temperature. Then, samples were placed in PBS for 2 min. The tissue slides were permeabilized with 1% glycine in 0.3% TritonX-100 diluted in PBS (0.3% $PBST_{x-100}$) for 30 min at room temperature. The tissue sections were mildly digested further with 0.5 µg/mL of proteinase K for 20 min at 37 °C before soaking the blocking solution (10% FBS in 0.3% $PBST_{x-100}$), for 2 hr at room temperature. Then, the tissues then incubated by covering the slides in anti-vasa antibody at 1:200 dilution for 16–18 hr at 4 °C. After washing three times with $PBST_{x-100}$ for 10 min each time, they were incubated in horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody at a dilution of 1:500 (Merck, Germany) for 1 hr at room temperature. Then, the tissue slides were washed three times with 0.3% $PBST_{x-100}$ for 10 min each time.

Whole-mount samples of fixed fertilized eggs and the nauplius 4, zoea 3, mysis 3, and postlarva 1 stages (n = 3 for each stage) were immersed for 2 d in 0.5% TritonX-100 diluted in PBS and then soaked in Dent's solution (80% methanol and 20% dimethyl sulfoxide) at –20 °C for 6 hr. The samples were washed five times in PBS for 30 min each time before being incubated in anti-vasa solution (1:1,000 dilution) for 4 d. Following washing as described above, the samples were incubated in the HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody at a dilution of 1:2,000 for 2 d, and subsequently washed three times with $PBST_{x-100}$ for 10 min each time. All the washing and incubation steps were performed at 4°C. The tissue slides and whole samples were stained with 0.05% 3,3′-diaminobenzidine solution (Sigma, USA) containing 0.015% H_2O_2 prepared in PBS. After a brown color had developed, the reaction was stopped in distilled water. After that, the testis sections were stained using hematoxylin. The sections were stopped in tap water and were finally permounted while the whole-mount immunohistochemistry samples were skipped for this step. Finally, photographs were taken under a BX–53 light microscope equipped with a DP–72 digital camera (Olympus, Tokyo, Japan) (Joyner and Wall, 2008; Graham and Vermeron, 2022).

Ethics

This study was approved and conducted according to the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Prince of Songkla University (Approval no. MHESI 6800.11/558).

Results

Vasa-like protein was detected as a brown color in the spermatogonia of the adult testis (Fig. 1A). No reactivity in spermatogonia was detected in the negative control section (Fig. 1B), while the section incubated with pre-immunize serum was a very pale brown color with connective tissue (Fig. 1C) which was clearly discriminated from the positive cell. In the fertilized egg, the vasa-like protein appeared as dark brown dots around the egg margin (Fig. 2A). In the nauplius 4 stage, this protein was concentrated in PGCs located in the ventral aspect of the cephalothorax region (Fig. 2B). In the zoea 3 stage, the vasa-like protein was found in PGCs migrating to the ventral aspect of the cephalothorax and pereopod regions (Figs. 2C–2D). The negative control without anti-vasa did not develop a brown color, as presented in the insets of Figs. A–C. In the mysis 3 stage, the vasa-like protein signal remained in the cephalothorax and pereopod regions (Figs. 3E–3F). Finally, the signal of vasa-like protein by PGCs in the postlarva 1 stage was noted in the cephalothorax, pereopod (Figs. 3H–3I) and telson (Fig. 3J). The negative control without anti-vasa did not develop a brown color and is shown in Figs. 3G and 3K.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการอนุเคราะห์ โดย ธนกฤต สายพิณ ID5908238 จากระบบคลังปัญญาวิจัย (THIRD) 2/2/24

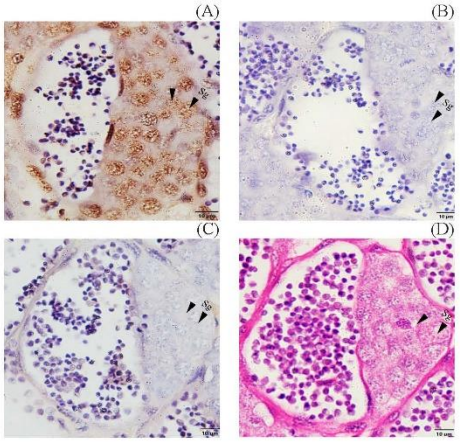


Fig. 1 Immunohistochemistry demonstrating presence of vasa-like protein in spermatogonia of the shrimp testis: (A) testis section of *Fenneropenaeus merguiensis* incubated with anti-vasa antibody showing positive vasa-like protein in spermatogonia (arrowheads); (B) control section without anti-vasa antibody showing no reactivity; (C) pre-immunized serum incubated section showing no reactivity and connective tissue showing as very pale brown color; (D) testis section of *F.merguiensis* stained with hematoxylin and eosin, scale bars are 10 μm and experiment was performed in triplicate.

Fig. 2 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in various developmental stages of *Fenneropenaeus merguiensis*: (A) the fertilized egg; (B) nauplius 4 stage; (C) zoea 3 stage; (D) zoea 3 stage with magnification, where negative control without anti-vasa did not develop a brown color in any tested stage, as shown in the inserts for A–C, scale bars represent 2 μm for C and C-insert, 8 μm for A, A-insert, B and B-insert and 13.5 μm for D and experiment performed in triplicate using three samples of each stage.

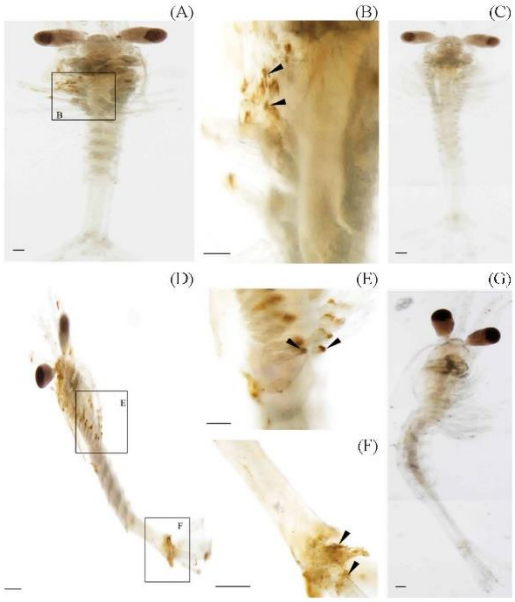


Fig. 3 Whole-mount immunohistochemistry showing vasa-like protein in various developmental stages of *Fenneropenaeus merguiensis*: (A) the mysis 3 stage; (B) with magnification; and (D) the postlarva 1 stage; (E, F) with magnifications; (C, G) the negative control without anti-vasa did not develop a brown color in any tested stage, scale bars represent 2 μm for A, C, D and G, 8 μm B, E and F. The experiment was performed in triplicate using three samples of each stage.

Discussion

The *vasa* gene has been previously characterized and used as a germ cell marker in crustaceans (Feng et al., 2011). The current study has demonstrated for the first time the distribution of vasa-like protein in the fertilized eggs and larvae of *F. merguiensis*. In *L. vannamei*, the *vasa* gene has been cloned and its transcript was detected in the oogonia of the shrimp ovary (Aflalo et al., 2007). The amino acid sequence homology was used to design the peptide for generating the antibody used in the current study and the selected region is a conserved region among the *vasa* of *F. merguiensis*, *P. monodon*, *M. rosenbergii* and *Drosophila* spp. However, the selected region was not found in the *vasa* of *L. vannamei* and therefore may be used to differentiate the germ cell of *F. merguiensis* from the germ cell of *L. vannamei*. Then, the produced anti-vasa was used to track the vasa-producing cells.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการนำเข้าโดย ธนพล ศรีสุข ID5598G38 เมื่อวันที่ 19/06/2024 จากระบบบริการจัดการงานวิจัย (TNRR)

The developed antibody successfully depicted the spermatogonia of the testis, which resembled the vasa protein specificity.

The current whole-mount study successfully demonstrated the presence of PGCs in various juvenile stages. In addition, the vasa-like protein detected in the current study corresponded with the vasa transcript found in the eggs, embryo and PGCs at the cephalothorax of the nauplius 4 stage, in pereopods of the zoea 3 and mysis 3 stages and near the hepatopancreas of the postlarva 1 stage of *F. chinensis* (Feng et al., 2011). The pattern of migration was initiationed from the egg to the ventral aspect of the cephalothorax (nauplius), followed by from the cephalothorax to the pereopod (zoea 3 and mysis 3 stages) and then to the telson (postlarva 1 stage). The early vasa-like protein detected in fertilized eggs and embryos was possibly transmitted vertically by the maternal route (Feng et al., 2011). In addition, the current findings suggested that PGC migration followed a similar pattern in these two shrimp species and also suggested that any manipulation concerning gonad development could be done at any stage from the egg until the postlarva 1 stage (the last stage in the current study). In mammals, PGCs are found near the yolk sac outside the embryonic region, from where they migrate to the hindgut and separate from the gut epithelium to enter the dorsal mesentery to form a gonadal ridge. Therefore, PGC migration was proposed in three steps: separation, migration and colonization (Soto-Suazo and Zorn, 2005). The current study showed only PGC migration in separation and in part of the migration step; thus, further study is required until the PGCs have colonized the genital ridge to confirm the route of PGC migration.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The Fundamental Fund, Prince of Songkla University, contract no. SCI6405032b provided funding. This research was supported by the Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development (SATREPS) and the Japan Science and Technology Agency (JST, JPMJSA1806)/Japan International Cooperation Agency (JICA).

References

Aflalo, E.D., Bakhrat, A., Raviv, S., Harari, D., Sagi, A., Abdu, U. 2007. Characterization of a *vasa*-like gene from the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its expression during oogenesis. Mol. Reprod. Dev. 74: 172–177. doi.org/10.1002/mrd.2062

Duangkaew, R., Jangprai, A., Ichida, K., Yoshizaki, G., Boonanuntanasarn, S. 2019. Characterization and expression of a vasa homolog in the gonads and primordial germ cells of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Theriogenology 131: 61–71. doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.01.022

Fabioux, C., Pouvreau, S., Roux, F.L., Huvet, A. 2004. The oyster vasa-like gene: A specific marker of the germline in *Crassostrea gigas*. Biochem. Biophys. Res. Com. 315: 897–904. doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.01.145

Feng, Z.-F., Zhang, Z.-F., Shao, M.-Y., Zhu, W. 2011. Developmental expression pattern of the *Fc-vasa-like* gene, gonadogenesis and development of germ cell in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Aquaculture 314: 202–209. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.02.017

Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J., Zeller, R. 2008. Paraffin embedding tissue samples for sectioning, Cold Spring Harb Protoc. doi.org/10.1101/pdb.prot4989

Herrid, M., McFarlane, J.R. 2013. Application of testis germ cell transplantation in breeding systems of food producing species: a review. Anim. Biotechnol. 24, 293–306. doi.org/10.1080/10495398.2013.785431

Graham, A., Vermeron, M. 2022. Chick or mouse embryo whole mount immunohistochemistry. London, UK. http://www.abcam.com/technical, 22 February 2022.

Joyner, A., Wall, N. 2008. Immunohistochemistry of whole-mount mouse embryos. Cold Spring Harb Protoc. doi: 10.1101/pdb.prot4820

Lasko, P. 2013. The DEAD-box helicase Vasa: Evidence for a multiplicity of functions in RNA processes and developmental biology. BBA.-Gene. Regul. Mech. 1829: 810–816. doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.04.005

Noor-Hidayati, A.B., Shahreza, M.S., Abol-Munafi, A.B., Ikhwanuddin, M. 2014. Sperm quality assessment of banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis* (De Man, 1888) from ultraviolet irradiation for initial development of gynogenesis application. J. Fish. Aquat. Sci. 9: 187–196. doi: 10.3923/jfas.2014.187.196

Olsen, L.C., Aasland, R., Fjose, A. 1997. A *vasa-like* gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. Mech. Develop. 66: 95–105. doi.org/10.1016/S0925-4773(97)00099-3

Raz, E., 2000. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. Genome Biol. 1: 1–6. doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017

Raz, E., Reichman-Fried, M. 2006. Attraction rules: Germ cell migration in zebrafish. Curr. Opin. Genet. Dev. 16: 355–359. doi.org/10.1016/j.gde.2006.06.007

Renault, A.D. 2012. *Vasa* is expressed in somatic cells of the embryonic gonad in a sex-specific manner in *Drosophila melanogaster*. Biol. Open 1: 1043–1048. doi.org/10.1242/bio.20121909

Richardson, B.E., Lehmann, R. 2010. Mechanisms guiding primordial germ cell migration: Strategies from different organisms. Nat. Rev. Mol. Cell Bio. 11: 37–49. doi.org/10.1038/nrm2815

เอกสารฉบับนี้ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนคาร์ศิลป์ ใหญ่ยิ่ง รหัส 6105398G38 วันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังปัญญาจุฬาฯ (TNIR)

Rungsin, W., Swatdipong, A., Na-Nakorn, U. 2012. Development stages of androgenic glands in giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879 in relation to size and age, and the success rate of feminization after andrectomy in small and large size prawn. Aquaculture 354–355: 136–143. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.03.015

Saetan, U., Sangket, U., Deachamag, P., Chotigeat, W. 2016. Ovarian transcriptome analysis of vitellogenic and non-Vitellogenic female banana shrimp (*Fenneropenaeus Merguiensis*). Plos One 11: e0164724. doi.org/10.1371/journal.pone.0164724

Seydoux, G., Mello, C.C., Pettitt, J., Wood, W.B., Priess, J.R., Fire, A. 1996. Repression of gene expression in the embryonic germ lineage of *C. elegans*. Nature 382: 713–716. doi.org/10.1038/382713a0

Soto-Suazo, M., Zorn, T.M. 2005. Primordial germ cells migration: Morphological and molecular aspects. Anim. Reprod. 2: 147–160.

Türkmen, G. 2005. The larval development of *Penaeus semisulcatus* (de Hann, 1850) (De capoda : Penaeidae). Turk. J. Fish. Aquat. Sc. 22: 195–199.

Wonglapsuwan, M., Phongdara, A., Chotigeat, W., 2009. Dynamic changes in gene expression during vitellogenic stages of the white shrimp: Fenneropenaeus merguiensis de Man. Aquaculture 40: 633–643. doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02136

Wu, X., Wang, Z., Jiang, J., Gao, J., Wang, J., Zhou, X., Zhang, Q. 2014. Cloning, expression promoter analysis of vasa gene in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Comp. Biochem. Comp. Biochem. Phys. B. 167: 41–50. doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.06.004

Yön, N.D., Akbulut, C. 2015. Identification of primordial germ cells: Cytological, histological and immunohistochemical aspects. Braz. Arch. Biol. Techn. 58: 222–228. doi.org/10.1590/S1516-8913201500335

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

(ร่าง) รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการชุด การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
(ภาษาอังกฤษ) Germ Cell Transplant Technology in aquaculture

โครงการย่อยที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ (DNA Fingerprint in Banana shrimp offspring from Germ Cell Transplant Technology)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คณะนักวิจัย

รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ **หัวหน้าโครงการย่อยที่ 3**
ดร. อุไรพรรณ แซ่ตัน **ผู้ร่วมโครงการย่อยที่ 3**

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2564
รหัสโครงการ SCI6405032c

ข้อมูลทั่วไป

1.ชื่อโครงการวิจัย(ภาษาไทย)**การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**

(ภาษาอังกฤษ) **Germ Cell Transplant Technology in aquaculture**

ประเภทโครงการ ☑ โครงการชุด ☐ โครงการดี่ยว

2. โครงการภายใต้ชุดโครงการวิจัย (กรอกเฉพาะชุดโครงการวิจัย)

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์**

3. คณะผู้วิจัย

- รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ หัวหน้าโครงการย่อยที่ 3
- ดร. อุไรพรรณ แซ่ตัน สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ หลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้ร่วมโครงการย่อย ที่ 3

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	7
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	8
บทนำ	9
วัตถุประสงค์	10
การตรวจเอกสาร	11
วิธีการทดลอง	17
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	21
เอกสารอ้างอิง	35

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	Microsatellite primers used to study relationship between female broodstock and offsprings	**19**
ตารางที่ 2	Microsatellite primers used to study differentiation between female and male	**20**
ตารางที่ 3	Microsatellite primers used to determine broodstock M1-M5	**27**
ตารางที่ 4	Microsatellite primers used to determine female and male	**27**
ตารางที่ 5	Sex identification using 4a, and FmM microsatellites, pos; positive, un; unidentified.	32

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 กระบวนการเกิดครอสซิ่งโอเวอร์ที่ไม่สมดุลกัน (unequal crossing over)	11
รูปที่ 2 ลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์	15
รูปที่ 3 ชนิดของการเกิดการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (tandem repeats; TRs)	15
รูปที่ 4 PCR product (710 bp) of COI gene from M1 female broodstock and offspring	22
รูปที่ 5 Nucleotide sequence of COI gene from female bloodstock M121 and its offspring	23
รูปที่ 6 PCR product pattern of genomic DNA from broodstock shrimp M1-M5 amplified by Fm2–Fmx microsatellite primer	24
รูปที่ 7 PCR product pattern of genomic DNA from 1st generation (F1) of female shrimp M1-M5	25
รูปที่ 8 Comparison of PCR product pattern of genomic DNA from 25 offspring (F1) of female shrimp M1-M5 amplified by FmM microsatellite primer	26
รูปที่ 9 PCR product pattern of genomic DNA from male and female amplified by 4a microsatellite primer	30
รูปที่ 10 PCR product pattern of genomic DNA from male and female progeny amplified by FmI, FmM, FmN microsatellite primer	31
รูปที่ 11 PCR product pattern of genomic DNA from male and female from Songkhla and Satun amplifiedby FmM microsatellite primer	31

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองโดยสำนักวิทยบริการฯ 19/06/2024
โดย ธิดาภัทร ศรีเพชร 0593980038
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัย มทร.ศรีวิชัย (TNRR)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนงบประมาณในการทำวิจัย ด้วยงบประมาณแผ่นดินประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 ในครั้งนี้ และขอบคุณโครงการ Japan Science and Technology Agency (JST) ภายใต้โครงการ JICA Thai Fish Project (The Project for Utilization of Thailand Local Genetic Resources to Develop Novel Farmed Fish for Global Market) ที่สนับสนุนผู้เชี่ยวชาญให้คำแนะนำในการการวิจัยนี้ สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอบคุณหลักสูตรชีววิทยาโมเลกุลและชีวสารสนเทศและเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการดำเนินงานการวิจัยมาโดยตลอด

รศ.ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ

หัวหน้าโครงการ

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันมีการบริโภคและส่งออกกุ้งทะเลกันเป็นจำนวนมาก กุ้งแชบ๊วย (*Fenneropenaeus merguiensis*) เป็นสัตว์น้ำทะเลชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมกันมากโดยเฉพาะในประเทศไทย การเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยค่อนข้างยาก ดังนั้นการตรวจสอบและคัดเลือกพันธุ์กุ้งแชบ๊วยเป็นสิ่งจำเป็นทั้งในการเพาะพันธุ์แบบธรรมชาติ และการผสมเทียมต่างๆการวิจัยนี้ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ*Fenneropenaeus merguiensis* การตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแม่และลูกกุ้ง ตลอดจนการแยกเพศกุ้งเพื่อใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยในการเพาะพันธุ์กุ้ง

ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้คัดเลือกจาก ทรานสคริปโทรมของกุ้งแชบ๊วยเพศเมียและเพศผู้ของกุ้ง โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ 29 คู่ในการตรวจสอบความสัมพันธ์แม่และลูกและพบว่า ไมโครแซทเทลไลท์ FmI, FmM และ FmN สามารถใช้ตรวจหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแม่และลูกได้ ในตัวอย่าง 5 ครอบครัว นอกจากนั้นไมโครแซทเทลไลท์ FmM ยังสามารถคัดแยกลูกทั้ง 5 ครอบครัวออกจากกันได้ สำหรับการแยกเพศกุ้งการทดลองนี้ใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ ในการตรวจสอบ 15 คู่ พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ 4a เป็นไมโครแซทเทลไลท์ ที่ใช้แยกเพศเมียและเพศผู้ออกจากกันได้ นอกจากนั้นยังพบว่า FmM ไมโครแซทเทลไลท์มีความเป็นไปได้ในการแยกเพศกุ้งได้ การใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์ 2 ชนิดร่วมกัน จะได้ผลที่ชัดเจนมากขึ้นในการแยกเพศผู้และเพศเมียของกุ้งแชบ๊วยออกจากกัน เครื่องหมายโมเลกุลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์พื้นฐานในการพัฒนาเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วในการคัดเลือกลูกกุ้งจำนวนมากในการเพาะเลี้ยงต่อไป

เอกสารนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คำสำคัญ: กุ้ง; ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ; ไมโครแซทเทลไลท์, การแยกเพศ

Abstract

Currently, the demand for marine shrimp for consumption and export has increased in Thailand. Banana shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) is one of the favorite shrimp for consumption in the country. Culturing of Banana shrimp is more severe than other commercial shrimps. Therefore, a DNA fingerprint is essential for the identification and selection of broodstock for breeding and sex selection for culture. In this study, microsatellites in *F. merguiensis* were used to survey the genetic relationship between female broodstock and offsprings and differentiate females and males for breeding programs.

The microsatellites in this study were derived from transcriptome data of banana shrimp. Twenty-nine microsatellite primers were designed to screen female broodstock and F1 offspring DNA fingerprints. The FmI, FmM, and FmN microsatellites primer generated the DNA fingerprint from five families (M1-M5), which showed the genetic relationship between female broodstock and its offspring. In addition, the FmM microsatellites primer could also identify the progeny of each of the five families (M1-M5). Fifteen microsatellite primers were used to screen females from male shrimp. The PCR products of 4a microsatellites primers could distinguish some females of *F. merguiensis* from males. In addition, FmM microsatellite primer was used to screen female and male shrimp and found that FmM had a potential to indentify female and male. Two microsatellite primers were required to confirm a better result. In conclusion, DNA fingerprint using microsatellites was beneficial in identifying the broodstock's progeny and screening the sex of shrimp for further culture.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5328G58
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Keywords: Shrimp; DNA fingerprint microsatellite; sex determination

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ จึงจัดเป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง และเนื่องจากที่ยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ที่มีการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติได้น้อย เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นพิษของฟอร์มาลีนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทำให้เกษตรกรจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อบริโภคในประเทศและส่งออกจำนวนมาก ทำให้ปริมาณกุ้งแชบ๊วยลดลงอย่างรวดเร็วจากแหล่งน้ำธรรมชาติ เนื่องจากการการเพาะเลี้ยงกันไม่เพียงพอกับความต้องการ ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ได้ในอนาคต การคัดเลือกพันธุ์กุ้งที่ดีทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้ดี มีการเจริญเติบโตที่ดี จะเป็นเครื่องมือในการพัฒนาพันธุ์กุ้งและเพาะพันธุ์กุ้งที่ดี สามารถการเพาะเลี้ยงในปริมาณที่หนาแน่นและเลี้ยงได้ง่ายขึ้น จะทำให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงมากขึ้นและป้องกันการสูญพันธุ์ในอนาคต

การคัดเลือกพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันได้มีการใช้ดีเอ็นเอในการคัดเลือกพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลาย อย่างเช่น Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) มีความหลากหลายระหว่างสปีชีย์มาก (Acín-Pérez et al., 2003; Hellberg et al., 2016; Scarano & Rao, 2014) ดังนั้นจึงนิยมใช้ เป็นDNA barcode ในการแยกระหว่างสปีชีย์ที่ใกล้ชิดกัน (Fernandes et al., 2020; Folmer et al., 1994; Hebert et al., 2003; Hebert et al., 2004; Hellberg et al., 2016; Scarano & Rao, 2014) นอกจากนั้น ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite) หรือ simple sequence repeat (SSR) หรือ short tandem repeat (STR) DNAประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์สั้นๆที่ซ้ำกันประมาณ 1-6 bp กระจายตลอดจีโนมของยูคารีโอต (eukaryotes) (Edwards et al., 1991; Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989) จะช่วยให้แยกสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวโดยใช้แบบแผนทางพันธุกรรมที่มี ลักษณะจำเฉพาะของแต่ละครอบครัวและใช้ในการคัดเลือกพันธุกรรมที่ดีเพื่อใช้ในการเลี้ยงและเพาะพันธุ์ โครแซทเทลไลท์พบได้ทั้งในส่วนของ exon และ intron (Sznajder et al. 2018) โครแซทเทลไลท์มีความหลากหลายมากเนื่องจากเกิดการกลายพันธุ์จากการเพิ่มหรือการขาดหายไปรวมถึงการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอแบบ ไม่เท่ากันบนโครโมโซม มีการประยุกต์ใช้โครแซทเทลไลท์ในการทำสร้าง DNA fingerprintในการจัดกลุ่ม สัตว์น้ำเช่น *Pangasius* sp. และ *Clarias* sp. (Volckaert et al. 2003) และใช้ในการศึกษาความหลากหลายของประชากรกุ้ง (González-Castellano et al., 2020; Purushothaman et al., 2020; Song et al., 2020; Zhao et al., 2019)

การศึกษานี้จะใช้โครแซทเทลไลท์ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Fenneropenaeus merguiensis* เพื่อใช้ประโยชน์ในการพัฒนาพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วยในการเพาะพันธุ์กุ้ง เทคโนโลยีนี้เมื่อประสบความสำเร็จสามารถถ่ายทอดให้หน่วยงานที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนเกษตรกรที่จะผลิตลูกกุ้งเพื่อการเลี้ยงต่อไป

เอกสารฉบับนี้เผยแพร่เมื่อวันที่ 19/06/2021
โดย ธนพล ศรีพุทธ ID5980388
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

<u>วัตถุประสงค์</u>

1) พัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมของกุ้งแชบ๊วย
2) ออกแบบเพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลที่สำคัญที่จะใช้เป็นเครื่องมือในการจำแนกกุ้งโดยลายพิมพ์ ดีเอ็นเอเพื่อการใช้ประโยชน์ เช่น ติดตามพ่อ-แม่-ลูก หรือ การจำแนกเพศกุ้ง หรือการจำแนกกุ้งแชบ๊วยออกจากกุ้งชนิดอื่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดและความหลากหลายของไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งแชบ๊วย ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ในการจำแนกความเป็นพ่อแม่ลูก หรือใช้ในการจำแนกกุ้งแชบ๊วยออกจากกุ้งชนิดอื่นหรือ การจำแนกเพศกุ้ง

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

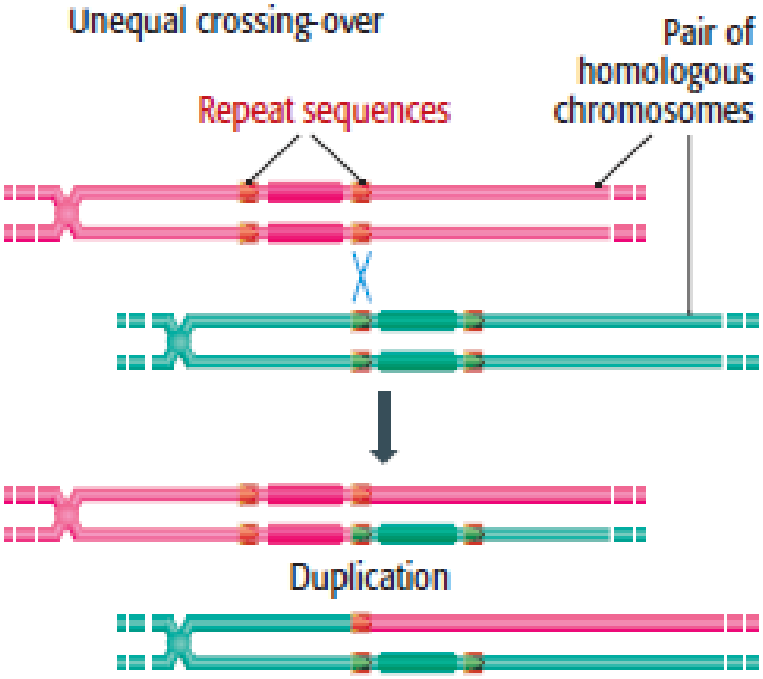
<u>การตรวจเอกสาร</u>

กุ้งแชบ๊วยจัดเป็นกุ้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง สามารถพบการกระจายได้บริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน (ทวีป 2536) รวมไปถึงแถบมหาสมุทร Indo-West Pacific (Perez Farfante and Kensley 1997) ที่ยังไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงทางธรรมชาติได้น้อย เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นพิษของฟอร์มาลีนหรือสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเหตุผลที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้อย่างกว้างขวางทำให้เกิดการผสมกันเองของกุ้งภายในครอบครัว (อนิดา และคณะ 2013) อย่างไรก็ตามกุ้งชนิดนี้จัดเป็นกุ้งทางเลือกที่สามารถชดเชยกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) และกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ที่มีการตายจากปัญหาการติดโรคในธรรมชาติ ได้แก่ โรคตายด่วน (Early mortality syndrome; EMS) (Putth et al. 2016) ทอร่าซินโดรม (TSV) (Limsuwan and Chuchird 2007) โรคไวรัสหัวเหลืองชนิดที่ 1 (Yellow head virus type-1; YHV-1) และโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White spot syndrome virus; WSSV) (Flegel 2015) ส่งผลให้มีจำนวนลดลงอย่างมาก การพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่เป็นลายพิมพ์ดีเอ็นเอกุ้งที่สามารถใช้จำแนกกุ้งแต่ละตัวออกจากกันออกจากกันได้ จะทำให้สามารถใช้ในการพัฒนาพันธุกรรมกุ้งที่ต้องการได้ นอกจากนั้นยังสามารถใช้บอกความเป็นพ่อแม่ลูกภายในกุ้งชนิดเดียวกันได้และอาจใช้ในการคัดเลือกเพศของกุ้งได้

1. เครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker)

เครื่องหมายทางพันธุกรรมหรือเครื่องหมายดีเอ็นเอหมายถึงดีเอ็นเอที่สามารถใช้บ่งชี้เอกลักษณ์ของแต่ละสิ่งมีชีวิตในระดับสายพันธุ์เดียวกันหรือระหว่างสายพันธุ์ เนื่องจากมีความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลดีเอ็นเอเกิดเป็นลักษณะโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphism) ทำให้เกิดความแตกต่างในแต่ละสิ่งมีชีวิต ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถพบได้บริเวณโครโมโซมและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นถัดไปได้ (หทัยรัตน์และณัฐหทัย 2548)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5390630
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TH-DIR)



รูปที่ 1 กระบวนการเกิดครอสซิ่งโอเวอร์ที่ไม่สมดุลกัน (unequal crossing over) (Saleh 2013)

ในทางพันธุศาสตร์ เครื่องหมายทางชีวโมเลกุลถูกนำมาใช้ในทางชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกลำดับของดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากดีเอ็นเออื่นๆที่ผสมรวมกัน เครื่องหมายทางพันธุศาสตร์หรือเครื่องหมายทางดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีหลายชนิด ได้แก่ allozymes, mitochondria DNA (mtDNA) และ nuclear marker เช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Random amplification of polymorphic (RAPD), Amplified fragment length polymorphism (AFLP), Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) และ ไมโครแซทเทลไลท์

Allozyme จัดเป็นเครื่องหมายทางพันธุศาสตร์ที่ถูกนำมาใช้ในพันธุศาสตร์ประชากร (Ballment et al. 1992; David et al. 2003; Nei 1978) และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic analysis) ในกุ้ง crayfish (Fetzner 1996; Chiesa 2009) และกุ้ง lobsters (Hou et al. 1990) ข้อดีของการใช้ allozymes เป็นเครื่องหมายพันธุศาสตร์ ได้แก่ ความรวดเร็วและราคาไม่แพง ซึ่งสามารถใช้ในการวิเคราะห์ความหลายหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต, สภาวะการข่มร่วมในธรรมชาติได้ ในขณะที่ข้อเสียของวิธีนี้คือต้องใช้ปริมาณเนื้อเยื่ออย่างมากและต้องเป็นเนื้อเยื่อที่ยังสดในการอ่านลำดับจีโนไทป์ในสิ่งมีชีวิต อีกทั้งยังไม่สามารถตรวจหาความแตกต่างของการแทนที่ของลำดับอะมิโนที่เกิดขึ้นได้จากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มาจากการทำ electrophoresis ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ของ allozyme (Richardson et al. 1986)

mitochondria DNA (mtDNA) มีโครงสร้างและลักษณะการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแตกต่างจากนิวเคลียร์ดีเอ็นเอ โดย mtDNA มีลักษณะเป็นวงกลมที่ไม่มีกระบวนการเกิด recombination จึงไม่ก่อให้เกิดความ

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในวันที่ 19/06/2024
โดย ... ศรีเพชร ID5908G30
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

เปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและจะถ่ายทอดผ่านทางแม่สู่ลูกเท่านั้น อีกทั้งยังมีอัตราการเกิดการกลายพันธุ์สูงกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ (Castro et al. 1998) เนื่องจากสามารถเกิดความผิดพลาดในกระบวนการจำลองตัวเอง (replication) ได้มากกว่า จึงทำให้มีความเหมาะสมในการนำมาใช้จำแนกแต่ละสิ่งมีชีวิตได้ (Vaseeharan et al. 2013) mtDNA ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์เครื่องหมายทางพันธุกรรมในกุ้งหลายชนิด (Garcia-Machado et al. 2001; Klinbunga et al. 2001; McMillen-Jackson และ Bert 2003)

nuclear marker คือเครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส แบ่งออกเป็นหลายชนิดได้แก่

RFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดแรกที่ใช้ในการแยกประชากร (Parker et al. 1998) โดยการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณที่ต้องการ ทำให้ได้ดีเอ็นเอขนาดต่างๆผสมกันซึ่งสามารถนำไปรันบน agarose gel แล้วย้อมด้วยสาร ethidium bromide หลังจากนั้นนำไปดูภายใต้แสงยูวี อย่างไรก็ตามการใช้วิธีนี้มีข้อเสียคือดีเอ็นเอขนาดสั้นๆที่เกิดจากการตัดแล้วมีขนาดใกล้เคียงกันมากๆสามารถเกิดการซ้อนทับกันภายใต้การรันเจล จึงทำให้เห็นเป็นแถบของดีเอ็นเอเพียงเถบเดียว (Fetzner and Crandall 2001) อย่างไรก็ตามได้มีการใช้วิธีนี้ในการจำแนกประชากรของกุ้งกุลาดำในบริเวณอินโดแปซิฟิก และพบว่าแถบอินโดแปซิฟิกมีความหลากหลายทางพันธุกรรมกุ้งมากกว่าบริเวณต้นกำเนิดของกุ้งนั้นๆ (Benzie et al. 2002) นอกจากนี้ยังมีการใช้ RFLP ในการจำแนกประชากรกุ้งกุลาดำในประเทศไทยบริเวณทะเลอันดามัน ได้แก่ จังหวัดสตูล ตรัง พังงา และระนอง รวมไปถึงบริเวณอ่าวไทยได้แก่ จัหวัด ชุมพรแลตราด โดยการวิเคราะห์ความหลากหลายในส่วนของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) และพบว่าแต่ละประชากรมีการแยกออกจากกันเป็นกลุ่มๆ มีเปลี่ยนแปลงตามเวลาหรือสถานที่ (unique demographic and dynamic properties) (Khamnamtong et al. 2009)

RAPD คือการเพิ่มจำนวนอย่างสุ่มของโลคัสที่ไม่ทราบแน่ชัดโดยการทำ PCR วิธีนี้เป็นวิธีที่สามารถทำได้ง่าย รวดเร็วและค่าใช้จ่ายน้อย อีกนั้งยังให้ผลความหลากหลายทาง polymorphism ที่สูง ใช้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยในการทำเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมโดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอเป้าหมายเพราะใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะกับบริเวณใดๆของดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อเสียคือทำซ้ำให้ได้ผลแบบเดิมยาก เนื่องจาก RAPD มีความไวต่อสภาวะต่างๆที่อาจเปลี่ยนแปลงได้ระหว่างการทดลอง อีกทั้งแถบของดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำ RAPD ยังแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง homozygote และ heterozygote ได้ นอกจากนี้การวิเคราะห์ผลยังทำได้ยากเนื่องจากมีปริมาณของจำนวนของข้อมูลเยอะมาก (Brown and Epifanio 2003) มีการรายงานการใช้ RAPD ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งปลา และ หอย (Zhuang et al. 2001a, b; Mishra et al. 2009; Lakra et al. 2010 และ Rezvani Gilkolaei et al. 2011)

AFLP คือหนึ่งในวิธีของการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอโดยการพัฒนาวิธีโดยการนำข้อดีของการทำ RFLP และ RAPD มารวมกัน ข้อดีหลักของวิธีนี้คือเราไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถทำได้

เอกสารนี้ได้รับการเผยแพร่ในเว็บไซต์ 19/08/2021
โดย คณะศรีนครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ID5308028)
การระบุแหล่งข้อมูลอ้างอิงบังคับโดย (ENRO)

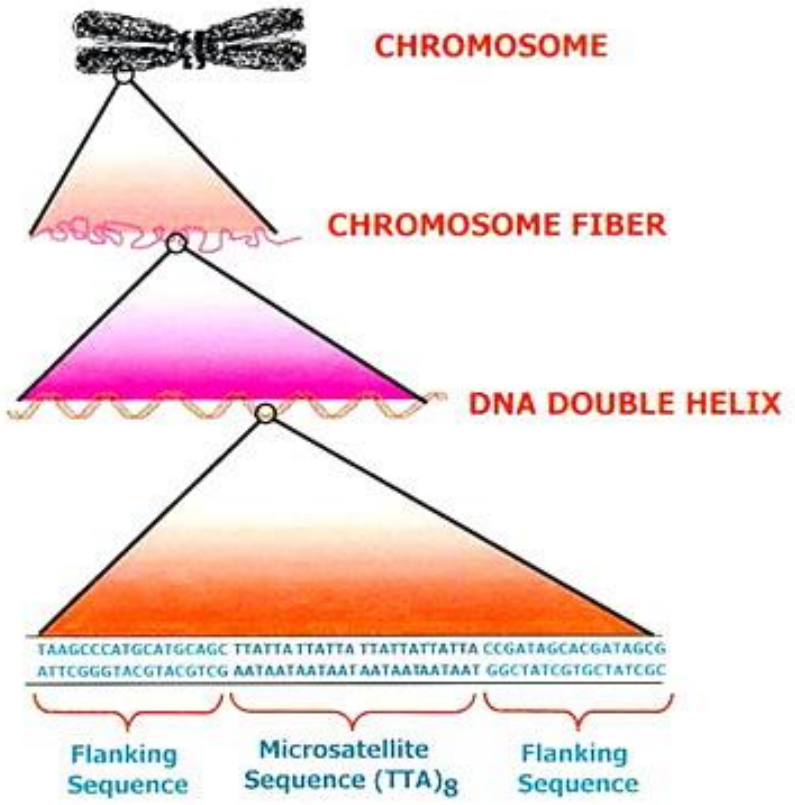
รวดเร็วและเกิด polymorphism จำนวนมากโดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่น้อย อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังมีข้อด้อยคือการวิเคราะห์ยังคงทำได้ยากเนื่องจากมีจำนวนของแถบดีเอ็นเอปรากฏมากจากการรันเจลซึ่งมีทั้งแถบดีเอ็นเอที่เป็น polymorphic fragments รวมอยู่กับ unrelated fragment (Li and Quiros, 2001) อีกทั้งยังมีค่าใช้จ่ายที่สูงและต้องการดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง

SNPs คือการเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ไปหนึ่งตัว โดยมักเกิดแบบ transition (เปลี่ยนจากเบสในกลุ่ม purine ด้วยกัน) มากกว่าแบบ transversion (เปลี่ยนจากเบสในกลุ่ม purine เป็น pyrimidine) หรืออาจเกิดจากการหายไป (deletion) หรือเพิ่มขึ้น (insertion) ของนิวคลีโอไทด์ สามารถตรวจสอบได้โดยการทำ PCR, microchip array และเทคนิคทาง fluorescence ในการทำประมงมักมีการนำ SNPs ไปใช้ในการศึกษาจีโนมิกและการตรวจวินิจฉัยโรค เนื่องจากมีการทำ chips สำหรับวิเคราะห์ SNPs ออกมาอย่างแพร่หลาย

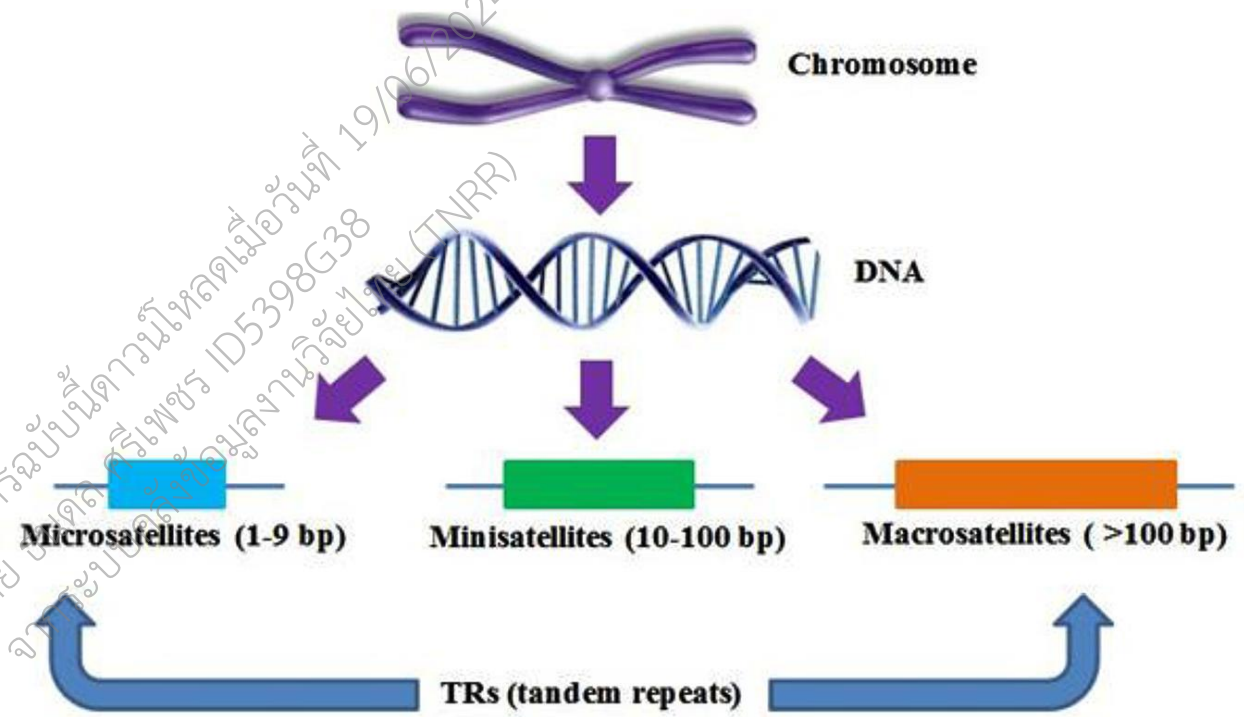
ไมโครแซทเทลไลท์ หรือ simple sequence repeat (SSR) คือการเกิดการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 2) ได้ถึงหลักร้อยหรือหลักพันซ้ำ (O'Reilly and Wright 1995) พบมากในสิ่งมีชีวิตพวกยูคารีโอต ได้แก่ คน สัตว์ และพืช และจะพบมากในส่วนของโครโมโซมที่ไม่ใช่ส่วนของยีน (intergenic space) (กนกพรและวไลลักษณ์) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการซ้ำกันจำนวน 1 ถึง 9 คู่เบสจะเรียกว่าไมโครแซทเทลไลท์ หากมีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 10 ถึง 100 คู่เบสจะเรียกว่ามินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) และหากมีการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 100 คู่เบสจะเรียกว่าแมคโครแซทเทลไลท์ (macrosatellite) (รูปที่ 3) จำนวนและความยาวของไมโครแซทเทลไลท์จะขึ้นอยู่กับชนิดของจำนวนซ้ำ ได้แก่ 1 ซ้ำ (mononucleotide) 2 ซ้ำ (dinucleotide) 3 ซ้ำ (trinucleotide) 4 ซ้ำ (tetranucleotide) 5 ซ้ำ (pentanucleotide) และ 6 ซ้ำ hexanucleotide (Merritt et al. 2015) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งประเภทของไมโครแซทเทลไลท์ออกเป็น 3 ประเภท; ประเภทที่หนึ่งคือ perfect repeats คือการเกิดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ 1 ซ้ำ ถึง 6 ซ้ำอย่างเดียวโดยตลอด เช่น (AT)20 ประเภทที่สองคือ imperfect repeats คือการเกิดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ 1 ซ้ำ ถึง 6 ซ้ำผสมกันและมีจำนวนซ้ำแตกต่างกันชัดเจน เช่น (AT)12 GC(AT)8 ประเภทที่สามคือ composite คือการเกิดการซ้ำของลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ 1 ซ้ำ ถึง 6 ซ้ำผสมกันโดยมีจำนวนการซ้ำใกล้เคียงกันหรือเท่ากัน เช่น (AT)7(GC)6 (Saeed et al. 2016)

ไมโครแซทเทลไลท์จัดเป็นเครื่องหมายนิวเคลียร์ดีเอ็นเอที่นิยมนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากการมีความแปรปรวนอย่างสูงในระดับรายตัวและภายในกลุ่มประชากร

เอกสารฉบับนี้ได้รับการดาวน์โหลดโดยวันที่ 19/08/2024
โดย วันดล ศรีแสง D5908G08
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)



รูปที่ 2 ลักษณะของไมโครแซทเทลไลท์ (https://woodrow.org/)



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย นายณัฐ ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 3 ชนิดของการเกิดการซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (tandem repeats; TRs) (Saeed et al. 2016)

2. การศึกษา Microsatellites ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสเตเชียน

ไมโครแซทเทลไลท์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายมากในการศึกษากลุ่มประชากรของสัตว์จำพวกปลาและครัสเตเชียน มีรายงานการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งหลายชนิด เช่นในปี 1999 Xu และคณะ ทำการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ประเภท imperfect repeats มีการพบมากที่สุด โดยชนิดที่มีการกระจายตัวมากที่สุดคือชนิด dinucleotide ตามด้วยชนิด tri- tetra- และ hexanucleotide จำนวน 67%, 20%, 9% และ 3% ตามลำดับโดยในชนิด dinucleotide เบส $(AT)_n$ มีการกระจายตัวมากที่สุด สอดคล้องกับ Tassanakajon และคณะ ปี 1998 อย่างไรก็ตามยังมีการตรวจพบไมโครแซทเทลไลท์ชนิด octanucleotide $(ATTTATTC)_5$ นอกจากนี้ในปี 2007 Garcia และ Acacia ได้ทำการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ชนิด dinucleotide มีการกระจายตัวมากที่สุด ตามด้วย tri-, tetra-, penta- และ hexanucleotide โดย $(CT)_n$ พบการกระจายตัวมากที่สุด ตามด้วย $(GT)_n$ และ $(AT)_n$ สอดคล้องกับรายงานของ Meehan และคณะ ในปี 2003 ที่ทำการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ของกุ้งขาว รวมไปถึง Thoren และคณะ ในปี 1995 ซึ่งทำการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในสัตว์จำพวกแมลงกลุ่ม hymenopteran แต่แตกต่างจาก Cruz และคณะในปี 2002 ซึ่งพบว่าจำนวนซ้ำของ $(TA)_n$ มีการตรวจพบมากที่สุด รองลงมาคือ $(CT)_n$, $(GT)_n$ และ $(AT)_n$ ตามลำดับ ในปี 2003 Robainas และคณะ ทำการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้ง pink shrimp (*Farfantenaeus notialis*) พบไมโครแซทเทลไลท์ส่วนใหญ่เป็นแบบ perfect repeats โดยมีไมโครแซทเทลไลท์ชนิด dinucleotide มีการกระจายตัวมากที่สุด ตามด้วย tri- และ tetranucleotide โดยมี $(CT)_n$ กระจายตัวมากสูด ตามด้วย $(GT)_n$ และ $(AT)_n$ ตามลำดับ

ในปี 2003 Maggioni และคณะ ทำการศึกษาโครงสร้างประชากรของกุ้งขาว *L. scchmitti* ในประเทศบราซิล พบ 6 ไมโครแซทเทลไลท์ในบริเวณ 8 พื้นที่ทางภูมิศาสตร์ แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างประชากรของกุ้งชนิดนี้มีปัจจัยเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมซึ่งกระจายตัวอยู่ตามแต่ละภูมิศาสตร์และบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง นอกจากนี้ในปี 2012 Chiang และคณะ ได้ทำการพัฒนา microsatellite array เพื่อศึกษากุ้ง *Metapenaeus barbata* ที่เก็บจากไต้หวันและจีน พบว่ามี 8 dinucleotide SSR และมีจำนวน 2-4 อัลลีล บ่งบอกได้ว่าไมโครแซทเทลไลท์ที่พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาประชากรของกุ้งได้ นอกจากนั้นได้มีทำการศึกษาและสร้าง ShrimpMap สำหรับศึกษาความสัมพันธุ์ของกุ้งขาว *L. vannamei* ปลอดเชื้อโดยอาศัยไมโครแซทเทลไลท์เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษา (Alcivar-Warren et al. 2007) ในโครงการ United States Marine Shrimp Farming Program (USMSFP)

การวิจัยนี้จึงศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งแชบ๊วยจากข้อมูลการศึกษา transcriptome ของกุ้งแชบ๊วยเพื่อการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลนำมาใช้ประโยชน์ เช่น ในการจำแนกความเป็นพ่อแม่ลูก หรือใช้ในการจำแนกกุ้งแชบ๊วยออกจากกุ้งชนิดอื่นหรือ การจำแนกเพศกุ้ง

เอกสารนี้ได้รับการเผยแพร่ครั้งแรกที่ 19/06/2024
โดย สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย D5308G68
การนำไปใช้ประโยชน์ต้องอยู่ภายใต้ข้อตกลงการใช้งานของสมาคมฯ (TNRS)

2. วิธีการทดลอง (Materials & Methods)

2.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

จับแม่กุ้งที่ได้รับการผสมมาจากในทะเลมา 5 ตัว แล้วจึงนำมาเลี้ยงแยกแต่ละตัวเพื่อให้ฟักลูกกุ้งในแต่ละครอกแยกกัน จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากขาว่ายน้ำ (Pleopods) คู่ที่ 5 ของแม่พันธุ์ทั้ง 5 ตัว และสุ่มจำนวนลูกกุ้งมาจำนวน 25 ตัวต่อหนึ่งแม่มาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ นำลูกกุ้งแชบ๊วยมาทำให้สลบโดยนำไปแช่ในน้ำแข็งนานประมาณ 15 นาที จากนั้นจึงนำมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้วิธีการสกัดตามชุดสกัด QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดนาโนโดยใช้เครื่อง NanoDrop Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วนำไปแยกดีเอ็นเอบน 0.8% agarose gel เพื่อตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพของจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเบื้องต้นได้ส่มตรวจตัวอย่างที่ใช้ในการทำการทดลองว่าเป็นแม่และลูกกุ้งที่แท้จริงก่อนมาใช้ในตรวจสอบหาความแตกต่างของไมโครแซทเทลไลท์ชนิดต่างๆ

การตรวจสอบโดยได้ใช้หลักการที่ดีเอ็นเอของแม่จะถ่ายทอดผ่านดีเอ็นของไมโตคอนเดรียซึ่งที่นิยมใช้คือยีนของ mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) ดั้งนั้นจึงทำการสุ่มเลือกกุ้งแชบ๊วยF1 ของแม่ M1 นำมาตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) โดยใช้ไพรเมอร์ MITO MR

2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกุ้งแชบ๊วยโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

คัดเลือก**ไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากข้อมูลทรานสคริปโตมกุ้งแชบ๊วย**โดยการใช้โปรแกรม MISA ในการค้นหาไมโครแซทเทลไลท์จากนั้นทำการสุ่มเลือกไมโครแซทเทลไลท์มาเพื่อทำการศึกษาถึงความสามารถในการตรวจสอบความแตกต่างในกุ้งแชบ๊วยแต่ละตัว จากนั้นทำการออกแบบไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 29 คู่ (ตารางที่ 1) แล้วนำไปทดสอบกับดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากแม่กุ้งแชบ๊วย M1-M5 โดยทำการทดลองดังนี้

การศึกษาไมโครแซทเทลไลท์จากดีเอ็นเอตัวอย่างที่สกัดได้จากกุ้งแชบ๊วย โดยมีองค์ประกอบดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ จำนวน 2 ไมโครลิตร, 10 μM ของไพรเมอร์ forward และ reverse อย่างละ 0.8 ไมโครลิตร, 5U/μL ของ Taq DNA polymerase จำนวน 0.4 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ deionized ให้เป็น 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปใส่เครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะอุณหภูมิเป็น 94°C เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 30 รอบของ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, 50-56°C (ตารางที่ 1) เป็นเวลา 30 วินาที, 72°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 1 รอบ ของอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 7 นาที แล้วจึงตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของไมโครแซทเทลไลท์โดยการรันบน 8% Polyacrylamide gel (non-denaturing)

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในที่เปิดเผยแล้ว ณ วันที่ 17/06/2024
โดย ธนพล คงพิพัฒน์ 0539853 สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (TNDR)

2.3 การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในลูกกุ้งแชบ๊วยที่ทราบความเป็นแม่

เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่นำมาทำการศึกษา จึงทำการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้ (ตารางที่ 1) กับลูกกุ้ง (F1) ที่ได้จากฟาร์มเพาะเลี้ยงโดยการสุ่มลูกกุ้งมาจำนวน 25 ตัวต่อหนึ่งรุ่น โดยทำการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอของแม่กุ้งไว้เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบของไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากลูกกุ้ง เพื่อเป็นการยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่นำมาทำการศึกษา จึงทำการทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ FmM, FmN และ FmI ซึ่งพบว่าสามารถใช้บอกความแตกต่างของแม่กุ้งทั้ง 5 ตัวได้ จึงนำมาทดสอบกับลูกกุ้ง F1, F2, F3, F4 และ F5 โดยเบื้องต้นได้ทำการศึกษาลูกกุ้งไปเพียง 9 ตัวต่อหนึ่งแม่เพื่อศึกษาแบบแผนของ PCR product ของไมโครแซทเทลไลท์ FmM, FmN และ FmI และเพิ่มเป็น 25 ตัว แยกศึกษาการแยกลูกกุ้งจาก M1-M5

2.4 การทดสอบหาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งแชบ๊วยแยกเพศกุ้งแชบ๊วย

ไมโครแซทเทลไลท์ในการแยกเพศกุ้งแชบ๊วยได้คัดจากยีนที่ทีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศของกุ้งและไมโครแซทเทลไลท์จาก transcriptome กุ้ง นอกจากนั้นได้ทดลองใช้ ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้แยกเพศกุ้งก้ามกราม (Min See et al., 2009) แสดงในตารางที่ 2 นำมาทดสอบเบื้องต้นกับกุ้งเพศเมียและกุ้งเพศผู้อย่างน้อยเพศละ 7 ตัว เมื่อได้ไมโครแซทเทลไลท์ที่คาดว่าแยกเพศได้จึงทดสอบเพิ่มเติมต่อไป

การเพิ่มจำนวนลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกุ้งแชบ๊วยดำเนินการเช่นเดียวกับหัวข้อ 2.2 และอุณหภูมิสำหรับการเกาะกับ primer ของแต่ละ ไมโครแซทเทลไลท์ในการแยกเพศกุ้งแชบ๊วยได้คัดจากยีนที่ทีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศของกุ้งและ ไมโครแซทเทลไลท์แสดงในตารางที่ 2

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2021
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ตารางที่ 1 Microsatellite primers used to study relationship between female broodstock and offsprings

Primer name	Repetitive bases	F-primer	R-primer	Annealing temperature (°C)	Expected size (bp)
Fm2	(AGA)6	CGCATGACACTGGACAGACT	CGAGTTCGCTCACGACAATA	55	300-306
Fm4	(GAA)9	CGGTAGACCCATTTTACCGA	ATCTAGAAAACCGTTGCCGA	54	182-194
Fm7	(AG)12	TTCGACAGATAGACAGAGCCAA	CTCTCTCTCGCGCTTTTTGT	55	226-286
Fm10	(AGT)8	GGCAGTGCTTGAAATAGTCAGA	ATTCCTTCGACTCCTGCTTC	55	290-298
Fm242	(ACACAC)3	CACACGAGTTGATTGTCTGCT	CACGTTGTGTGTGCAGTGAG	55	316
FmA	(A)17	TTCTTCTACAAAGAGATGCCTCG	TTACATGTGAAGAAGTCTGGCAA	54	158
FmB	(CA)10	GATAAGTACAATGGAAGAGGGCA	AGATTTTAATGAGCATGGGTTTG	54	160
FmC	(CCT)8	CAAGGGTACTGTCAAGCTCTTTT	GATCGAGTTCGAGGAGAAGAAG	54	159
FmD	(TAAA)6	CACTTAGGGTGTGTTGTGGAGAG	TGTTAGCTGACCCAGTAGTGACA	57	160
FmE	(GTCAT)4	CGGGAAGCCTCATACCTCTATAA	CATTTCAGACCAGGCAGTGTAGT	56	160
FmF	(AAATAA)4	TACATTGCATTTATAGATGGGGG	TTGTCTAAAAGAGGACAGTGCAA	54	160
FmG	(AGCAGT)4	TTCTAGTAGCAGTAGCAGCAGCA	TCTTTTCTGGCTTCATTTCTGTC	55	144
FmH	(CCAGAG)4	CAGCCCCTAAAAGACCTAGAAAA	TTCATCTTTTCTCTGTTTCCCTG	54	126
FmI	(CCTGCT)4	TCAGGTTTCAGTTTTGGAACATC	TGAAAGTGAAGGTAGCAGACACA	54	**145**
FmJ	(TA)6	TCACCTTGTTAAACTGCATCAAA	ACAAAATTAAAAGAGGGCCTAAAAA	52	238
FmK	(ATTTC)4	TCTCTTTCCATGTGTCAATCCTT	ACGTGACTACAACCTGGGAATAA	54	101
FmL	(TAA)16	GGCTTTTTCGTGACATTGGT	CACACACTGCACACATGGAA	55	160
FmM	(CATA)16	CACATATCTTAGTCTCTGTCTCCA	CTGATTTATGGTACGGAACAAGC	54	**153**
FmN	(TAA)19	CACAAAAGATATGAGGAATATTGAAAA	AAGGGGAATTTACTTTCTGGTCA	53	**139**
FmO	(TCG)23	CACTAATTCTACTGCTCCTCCTCC	GTCTTCCTTCATCCTTCCCCT	55	160
FmP	(CA)33	AAATGCACACATACACAAACACA	GGGTTTCGGAAATAAAGGACTAA	54	130
FmQ	(CCCT)6	TAAACCATTTTCCTTCGTGTTGT	CTAAATTCCTGTGAAAGACAGGC	54	143
FmR	(GAGGG)4	ACAAACACACGCACTACGACTC	CAATGGATATGACAGTGGATGTG	54	125
FmS	(TTA)7	GAAGTGAAATGCAAATGAATCGT	TTCCCTATTCTCAACCTTCTTCC	55	125
FmT	(GGGA)5	TAGGTAGAGAGATGGGTAAGGGG	ATTGGATGCTACTGGCACATACT	54	108
FmU	(TTTC)6	TATTTAGATTAGGGGGAAGAGCG	TGTTTCAAGAAAAGGAAAGACGA	54	145
FmV	(CTG)5	GAGCTATGTGAACGTCGAAACTG	CCTGTCAAGTCTTCTACACGGAG	54	129
FmW	(AC)7	ATCTCCCAAACTTACCATTCCTG	CGAGGTCAAGAATTCCAAGAAG	54	141
FmX	(CG)7	GTCTCGTTTTTCTCTTTTCGCTT	GCAATCACACACCCCTCC	54	148

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สร้างขึ้นโดย ธนดล สุขพิทักษ์ ID 3960038 เมื่อวันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (ThaiRD)

ตารางที่ 2 Microsatellite primers used to study differentiation between female and male

Primer name	Repetitive bases	F-primer	R-Primer	annealing temperature (°C)	Expected size
Sex-lethal	$(T)_{12}$	GTTATTCATTGAAAGAGCTCCCC	TAAACAACAACAGCAACAACAGC	59	152
CHH-CA (Crustacean hyperglycemic hormone)	$(CA)_6$	CAAATGTCTGGCCGTATCTAAGT	GTGTGTGTGTGTACGAGTGTGTG		144
Ecdysteroid-GCA (Ecdysteroid receptor E75)	$(GCA)_{14}$	CTGCACCTTATTACGTTCCTCAG	GACGTCTGCTGATGCTGGT		159
Ecdysteroid-TA (Ecdysteroid receptor E75)	$(TA)_6$	AACCACTAAAAGCATAAATAACTCAAG	CATATGTGAAACGGAAGTGGAGT		141
Unigene2131_Wnt16	$(AG)_7$	GCTATCCAAGTACTCCAGAAGCC	CATGCTTACTCTCTGGTTGATTTC	55	145
Unigene5366_Dsx	$(T)_{11}$	GGGGGTTATATGCCATTGT	ACATTTCAACTACGCATGG	53	118
Unigene2174_Beta-catenin	$(GT)_6$	CATGCATGCGTGTGTGAATA	TGGCAATATGTAAGCTATTC	55	157
Fushi 1-GA (Fushi tarazu-factor 1)	$(GA)_9$	AGGACACAAGAAAAGAAATGCAA	ATTAGAATCATCACTTTCGCTGC	53	156
THr-T (Thyroid hormone receptor beta-A)	$(T)_{13}$	ATGAATCGTTTCCACTGTGATTT	ATTTAATACCGTTACCCCCTTTG		147
Ecdysone-TG (Ecdysone receptor)	$(TG)_{12}$	AACATTTTGTGTATGGTTCAGCA	CATCCCACTCATACTAATGCACTC	57	142
Primer 4a	$(TAG)_2(GCA)_2$	TATCAGCAGCAGCAGAGAAG	GTCTGTTTGTGCAGGTGGAG	49	251-377
primer 5a	$(TA)_4(CT)_{28}$	CCTCTTGTGTGTGTGTGTGG	CCTTAAATTGTGTGTGTGTGAC	48	309-449
primer 17c	$(TTC)_2$	AGGATGAATGCAGGTGGAAC	CAAAACAAGACGTCCCCTTC	60	226-258
primer 17d	$(GGC)_2$	ATTTGCGGAAGGATGTGTTC	TATGCTTCCGGCTCGTATG	46	169-221
primer 109a	$(TTG)_2(ATTT)_2$	GGCATTCCGTTGTTGTTG	CGCTCTTGTTGTTTCTTCTC	50	169-323

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานโดยเฉพาะ ID5608G30 ตั้งแต่วันที่ 19/06/2021 โดย ธนิดา ศรีเพชร สาธารณะ ห้องสมุดกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล (THRR)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง (Results and Discussion)

3.1. การสุ่มตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ในลูกรุ่น F1 โดยการ sequencing

จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ในลูกกุ้งแชบ๊วยรุ่น F1 แบบสุ่ม โดยทำการสุ่มเลือกลูกกุ้งเบื้องต้นมา 6 ตัวจาก 25 ตัว ได้แก่ ลูกกุ้ง F1.10, F1.11, F1.12, F1.14, F1.18 และ F1.20 เพื่อตรวจสอบความเหมือนกันของยีน COI เมื่อเทียบกับแม่ (รูปที่ 1) ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าลูกกุ้งทั้ง 6 ตัวมีความเหมือนกันของยีน COI เมื่อเทียบกับแม่กุ้ง M1 ในส่วนอนุรักษ์ ของCOI gene อาจมีความแตกต่างบางตำแหน่งซึ่งอาจเกิดจากความคลาดเคลื่อนของการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนด้าน 3’ ซึ่งเป็นส่วนปลายของการอ่านผลลำดับนิวคลีโอไทด์เนื่องจากเป็นการอ่านแบบ direct sequencing จาก PCR product ซึ่งด้านปลายอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ (รูปที่ 2) อย่างไรก็ดี อย่างไรก็ดีการเหมือนกันในส่วนในส่วนอนุรักษ์ ของ COI gene จะบ่งชี้ได้ว่าเป็นแม่และลูกกัน

3.2. **การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในลูกกุ้งแชบ๊วยที่ทราบความเป็นแม่ และความสัมพันธุ์กับลูกกุ้ง**

ตรวจสอบแบบแผนของไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งแชบ๊วยในแม่กุ้ง M1-M5 เพื่อตรวจสอบแบบแผนที่แตกต่างกันของแม่กุ้ง M1-M5 และมีแถบขนาดที่คาดหวังของไมโครแซทเทลไลท์ที่จำเพาะนั้นเพื่อแสดงความสัมพันธุ์ระหว่างแม่และลูก การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเบื้องต้นโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ไพรเมอร์ต่างๆ ในตารางที่ 1 ผลจากการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเบื้องต้น พบว่าไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ Fm I, Fm M และ Fm N สามารถใช้บอกความแตกต่างของแม่กุ้งทั้ง 5 ตัวได้ แสดงในรูป 3 และตารางที่ 3 ดังนั้น จึงได้นำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างและความสัมพันธ์ของลูกกุ้งในแต่ละคอกแสดงในรูป 5 โดย PCR product ของ **Fm I primer** เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของแม่กุ้ง M1 และลูกกุ้ง F1 พบแถบหลักที่คาดว่ามาจาก M1 แสดงโดยลูกศรสีเหลือง และพบแบบแผนของลูกกุ้ง 2 แบบ แสดงโดยลูกศรสีชมพู เมื่อใช้ **Fm I primer** เมื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของแม่กุ้ง M2 และลูกกุ้ง F2, แม่กุ้ง M3 และลูกกุ้ง F3, แม่กุ้ง M4 และลูกกุ้ง F4 และ แม่กุ้ง M5 และลูกกุ้ง F5 พบแถบหลักที่คาดว่ามาจากแม่กุ้ง M2, M3, M4และ M5 แสดงโดยลูกศรสีเหลือง และพบแบบแผนของลูกกุ้ง 3 แบบ ของแต่ละคอกแสดงโดยลูกศรสีชมพู

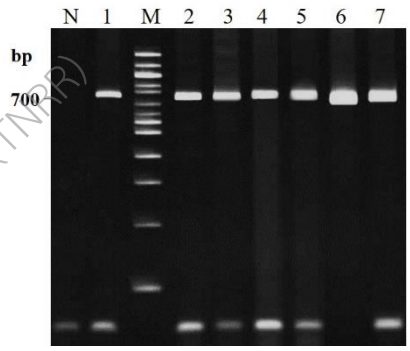
นอกจากนั้นเมื่อใช้ FmM primer และ FmN ในการเพิ่มจำนวนลูกกุ้ง F1 ของแม่กุ้ง M1-M5 พบแถบหลักที่คาดว่ามาจากแม่กุ้ง M1, M2, M3, M4และ M5 แสดงโดยลูกศรสีเหลือง และพบแบบแผนของลูกกุ้ง 2-5 แบบเมื่อเพิ่มจำนวนด้วย FmM primer แสดงโดยลูกศรสีชมพู ในขณะที่พบ 2-3 แบบแผนเมื่อเพิ่มจำนวนด้วย FmN primer เมื่อเปรียบเทียบแบบเผน PCR product ลูกกุ้งของ M1-M5 คอกละ 25 ตัว พบว่า FmM primer สามารถแยกลูกกุ้งคอกM1-M5 ออกจากกันได้ ยังไม่สามารถหามาร์คเกอร์ของพ่อกุ้งได้ การสรุปชนิดของ microsatellitesที่ใช้สามารถจำแนกความสัมพันธ์ของแม่กุ้งและลูกกุ้งแสดงใน **ตารางที่ 3**

เอกสารรับรองโดยสำนักงานวิจัยแห่งชาติ วันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร (ID:53...RG3...)
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (NRPR)

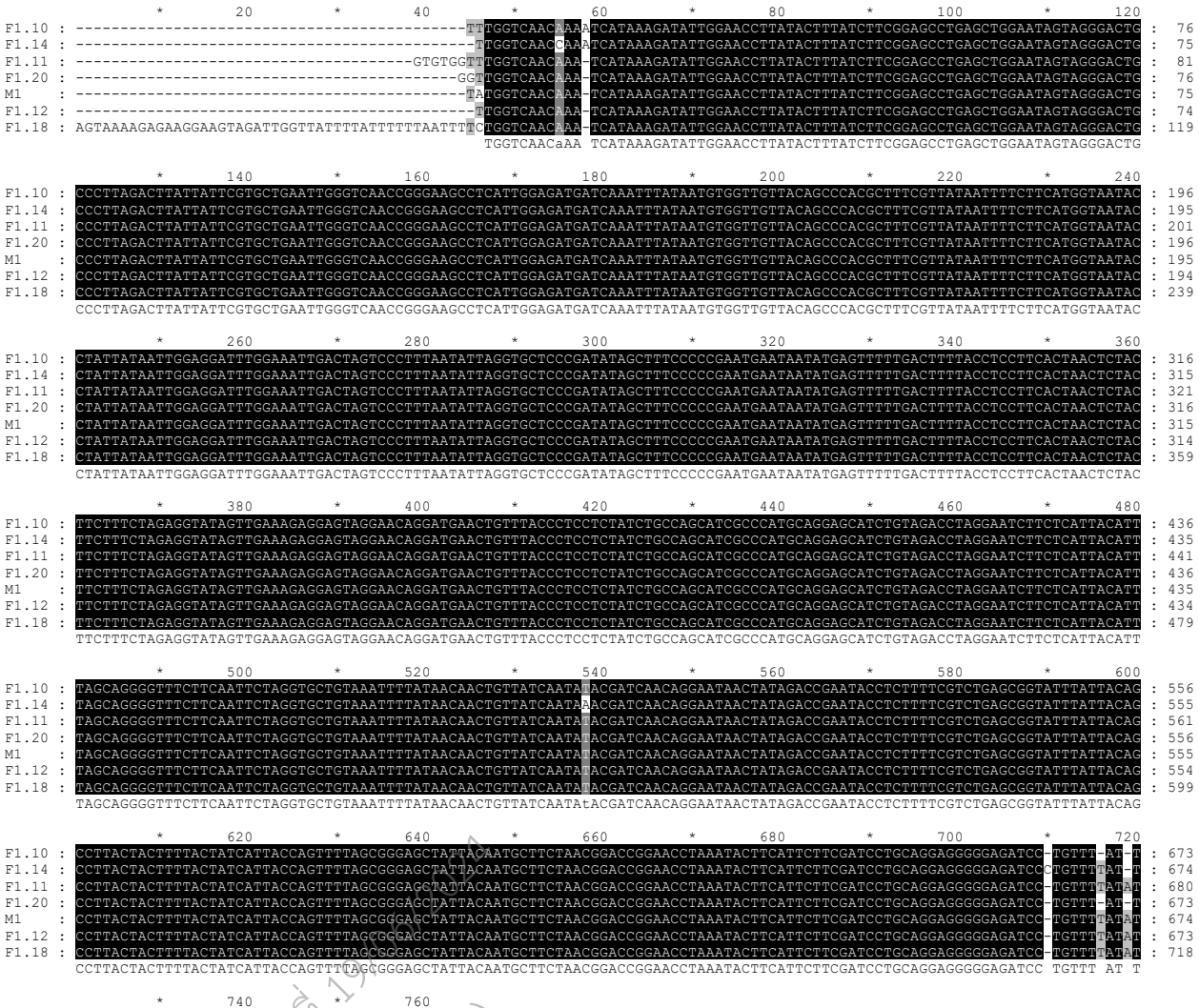
3.3 การทดสอบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ในสำหรับการแยกเพศลูกกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษา transcriptome ของ testis และ ovary ของกุ้งแชบ๊วย ไมโครแซทเทลไลท์ในกุ้งแชบ๊วยแยกเพศกุ้งแชบ๊วยได้คัดจากยีนที่ทีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศของกุ้ง ในตารางที่ 2 จึงนำมาทดสอบกับนำมาทดสอบเบื้องต้นกับกุ้งเพศเมียและกุ้งเพศผู้จากแหล่งต่างๆและพบว่า 4a microsatellite มีแบบแผนที่จำเพาะซึ่งมีแถบดีเอ็นเอเรียงชิดกัน 4 แถบและมีขนาดเท่ากันประมาณ 300 คู่เบส ในเพศเมียที่แตกต่างจากเพศผู้ แสดงในรูปที่ 9 นอกจากนั้นได้ทดลองใช้ FmI, FmMและ FmN microsatellite ในการแยกกุ้งเพศเมียและกุ้งเพศผู้ พบว่า FmM microsatellite ได้นำไปทดสอบโดยใช้ลูกกุ้งจากแม่M1 พบว่ามีศักยภาพพอที่แยกลูกกุ้งเพศเมียและกุ้งเพศผู้จากคอกเดียวกันได้ แสดงในรูปที่ 10 และเมื่อนำไปทดสอบกับตัวอย่างจากจังหวัดสตูลและสงขลาเมื่อแยกตามลำดับของลูกศรที่กำกับไว้ 1-4 แยกเพศกุ้งออกจากกันได้ และตำแหน่งทีใช้ในการแยกจะเปลี่ยนไปตามแหล่งที่มาของตัวอย่าง มี 1 ตัวอย่างเพศเมียจากสงขลาที่แยกได้ไม่ชัดเจนแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายวงกลม แสดงในรูปที่ 11 ดังนั้นจึงควรนำไปทดสอบกับตัวอย่างจำนวนมากขึ้นเพื่อทดสอบให้แน่ชัดต่อไป และตัวอย่างที่ไม่ชัดเจนควรใช้ 2 ชนิดยprimers ในการช่วยตรวจสอบ การสรุปชนิดของmicrosatellitesที่ใช้แยกเพศเมียออกจากเพศผู้ที่ได้ แสดงในตารางที่ 5

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
สืบค้นระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

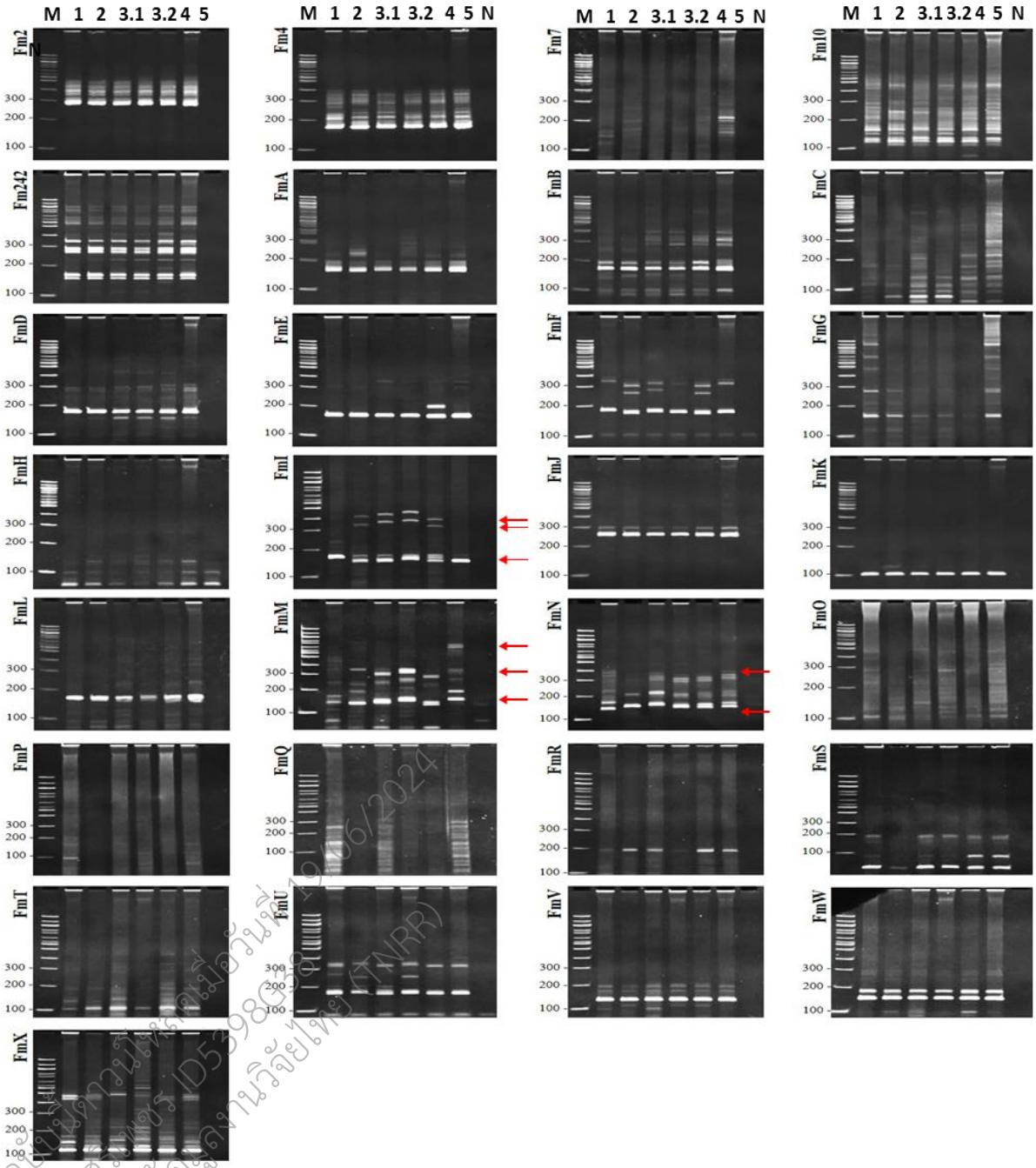


รูปที่ 4 PCR product (710 bp) of COI gene from M1 female broodstock and offspring of M1 amplified by MITO MR , lane 1= M1, Lane 2-6 = offspring of M1, M=100 bp marker, N=no template control.



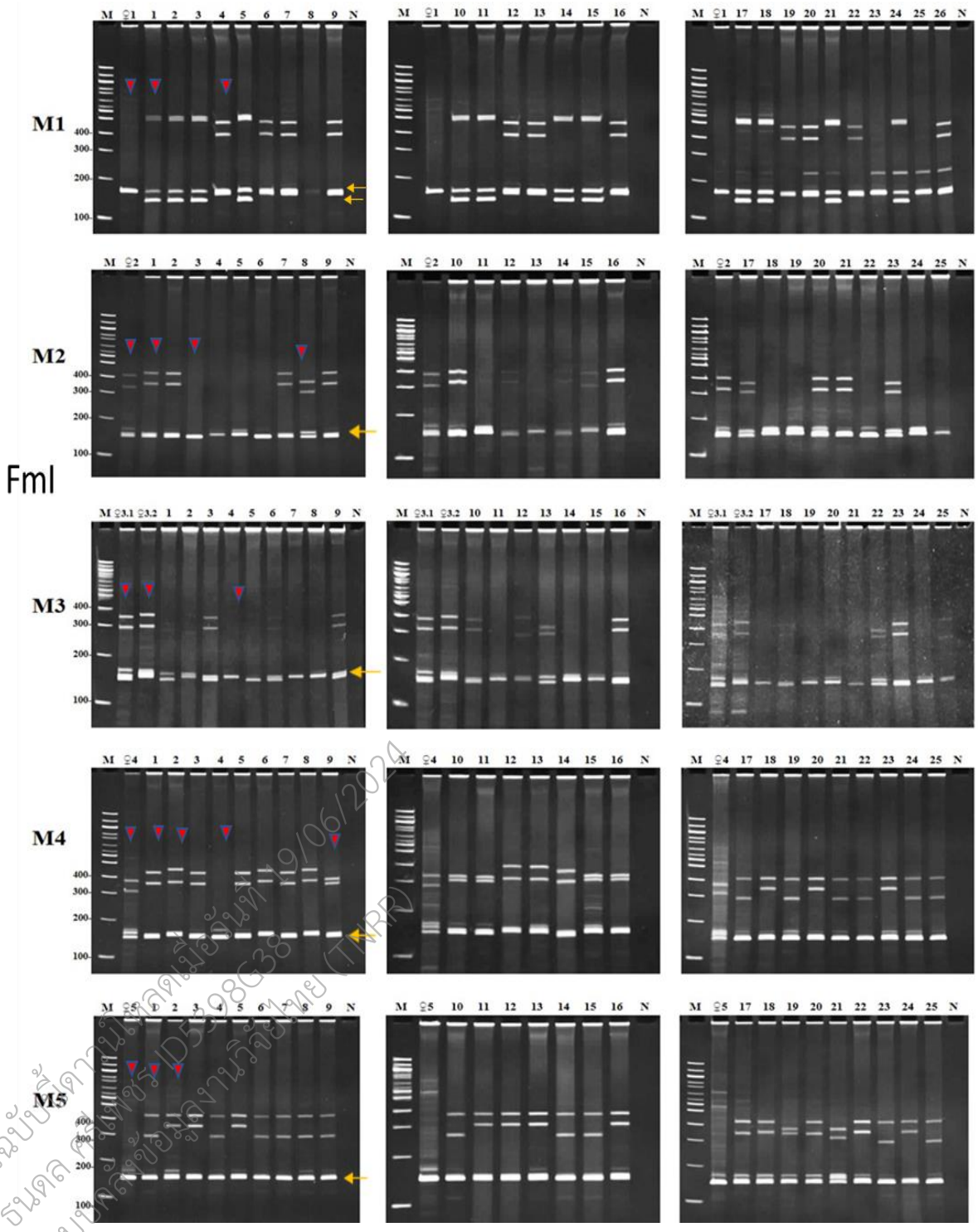
รูปที่ 5 Nucleotide sequence of COI gene from female bloodstock M1 and its offspring (F1.10, F1.11, F1.12, F1.14, F1.18, และ F1.20)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับทุนจากโครงการ
โดย ธนิต ศรีเพชร ID53
อาจระบบคลังข้อมูลงานวิจัยแห่งชาติ



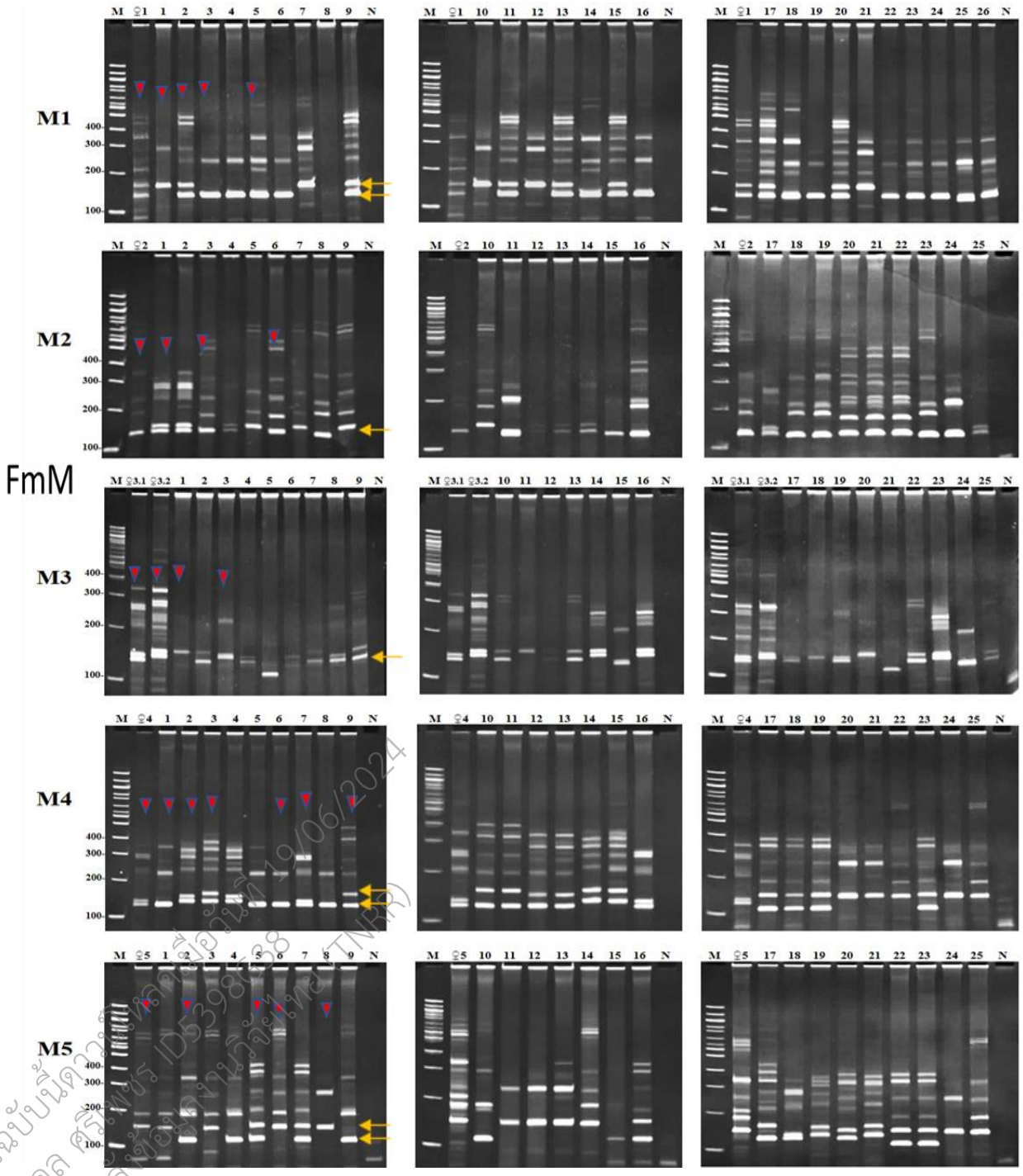
เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการรับรองจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ใช้ธนาคาร ศ.ดร.เพชร ID5398 19/06/2024 ภาควิชาชีววิทยาประมง บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KUNRR)

รูปที่ 6 PCR product pattern of genomic DNA from broodstock female shrimp M1-M5 amplified by Fm2–Fmx microsatellite primer



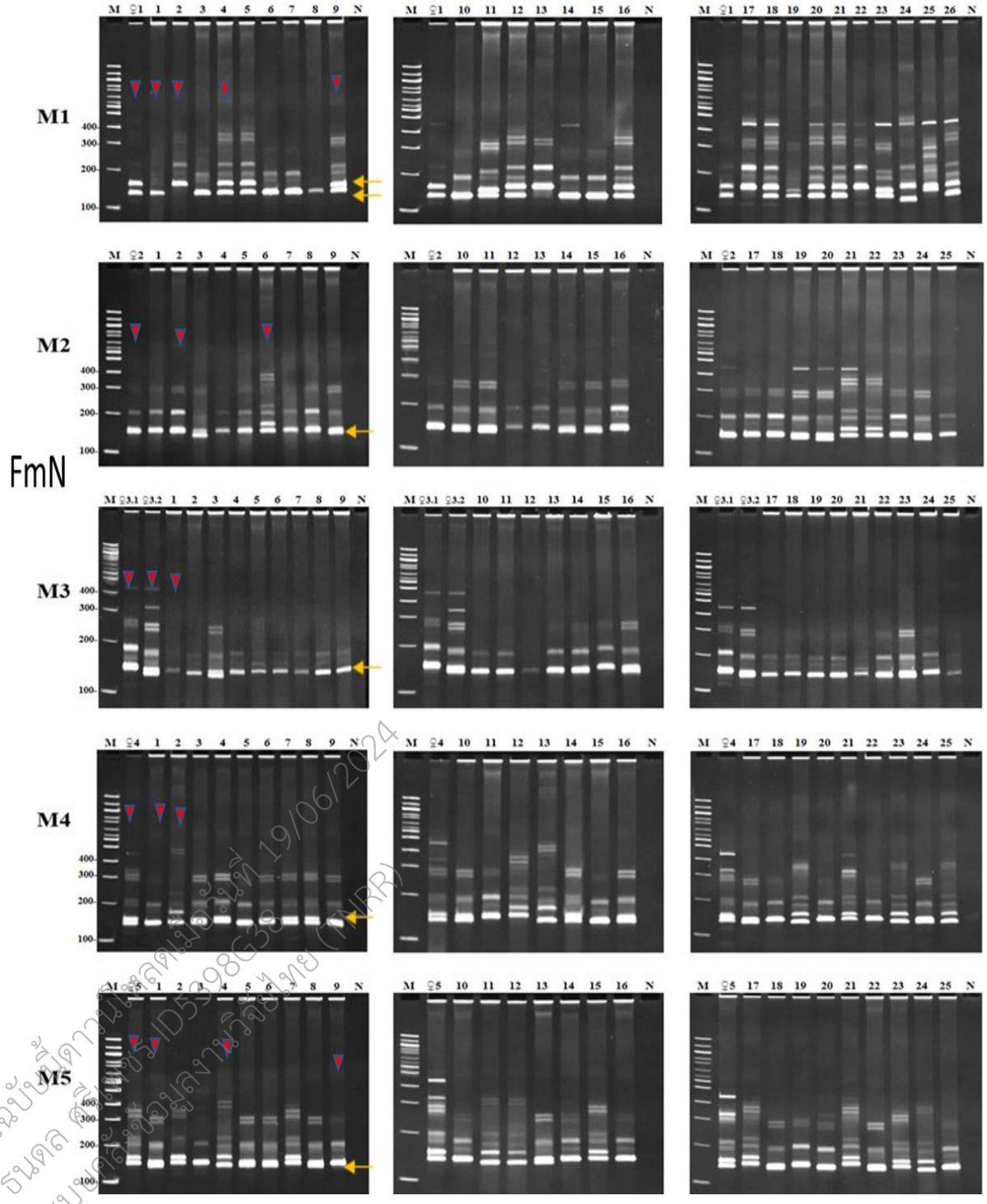
เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
โดย ธนพล ศรีพิพัฒน์ ID 5898638 เมื่อ 19/06/2024
สงวนลิขสิทธิ์ตามนโยบายของงานวิจัยฯ

รูปที่ 7-1 PCR product pattern of genomic DNA from 1st generation (F1) of female shrimp M1-M5 amplified by FmI microsatellite primer, yellow arrow indicted significant band from their broodstock, pink arrow indicated pattern among F1 in each family.



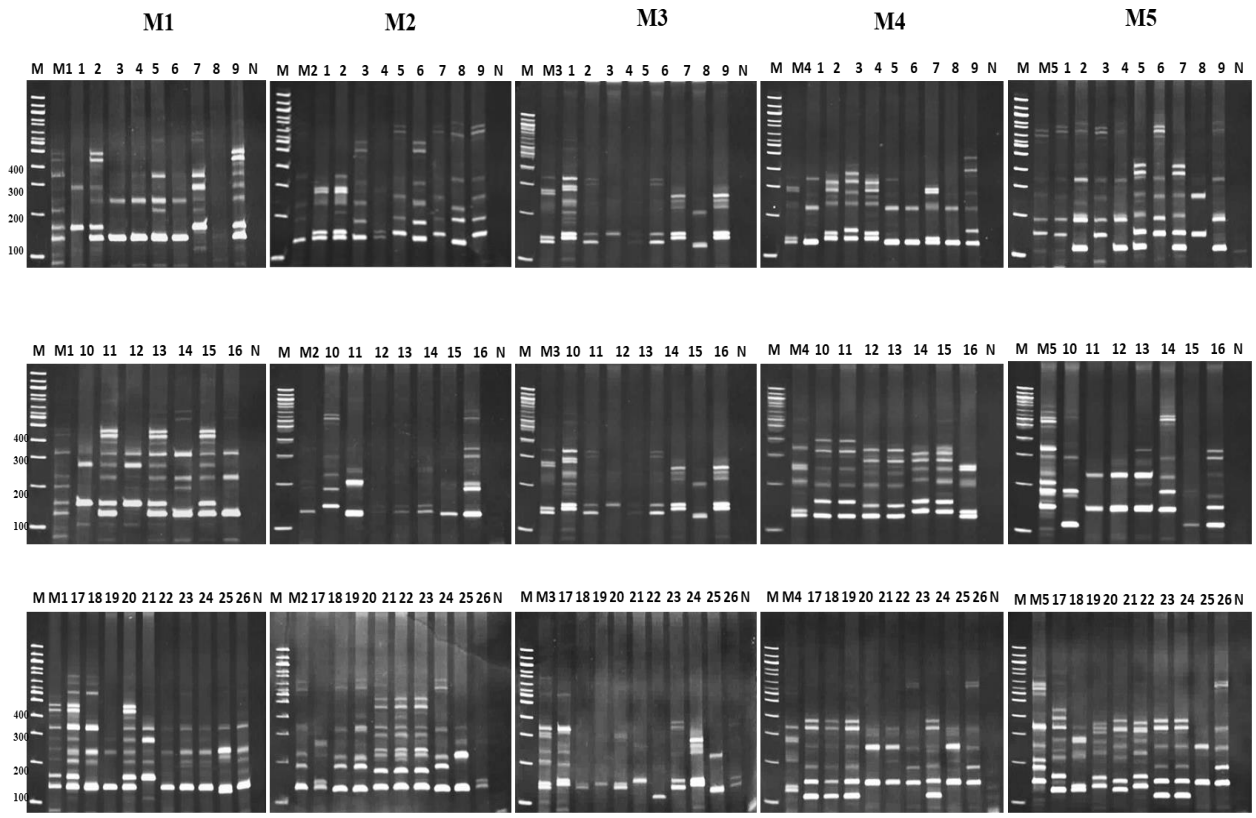
เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองความถูกต้องโดย ธนดล ศรีพนา ID5398138 เมื่อวันที่ 19/06/2024 ผ่านระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 7-2 PCR product pattern of genomic DNA from 1st generation (F1) of female shrimp M1-M5 amplified by FmM microsatellite primer, yellow arrow indicted significant band from their broodstock, pink arrow indicated pattern among F1 in each family.



เอกสารฉบับนี้ได้รับการยืนยันตัวตนแล้ว ณ วันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศิริพันธุ์ ID5398G3
จากระบบฐานข้อมูลงานวิจัยไทย (THRR)

รูปที่ 7-3PCR product pattern of genomic DNA from 1st generation (F1) of female shrimp M1-M5 amplified by FmM microsatellite primer, yellow arrow indicted significant band from their broodstock, pink arrow indicated pattern among F1 in each family.



รูปที่ 8 Comparison of PCR product pattern of genomic DNA from 25 offspring (F1) of female shrimp M1-M5 amplified by FmM microsatellite primer, upper row = offspring PCR product No 1-9, middle row = offspring PCR product No 10-16, bottom row = offspring PCR product No.17-25/26.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

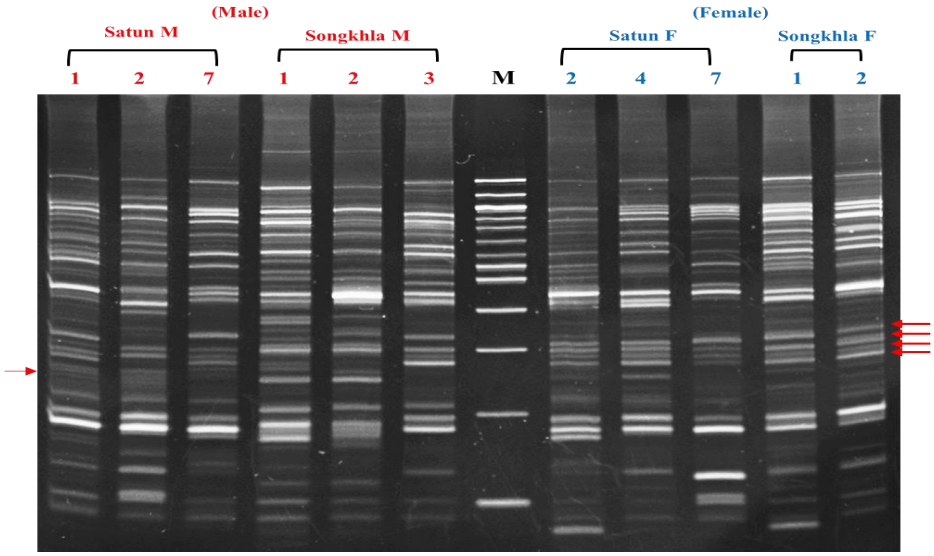
ตารางที่ 3 Microsatellite primers used to determine broodstock M1-M5

Primer name	Yes/No	Primer name	Yes/No
Fm7 $(AG)_{12}$	N	**Fm M (CATA)16**	Y
Fm10 $(AGT)_8$	N	**Fm N (TAA)19**	Y
Fm E $(GTCAT)_4$	N	Fm O (TCG)23	N
GT242 $(ACACAC)_3$	N	Fm P (CA)33	N
FmB $(CA)_{10}$	N	Fm Q (CCCT)6	N
FmD $(TAAA)_6$	N	Fm R (GAGGG)4	N
FmF $(AAATAA)_4$	N	Fm S (TTA)7	N
FmG $(AGCAGT)_4$	N	Fm T (GGGA)5	N
FmI $(CCTGCT)_4$	Y	Fm U (TTTC)6	N
FmJ (TA)6	N	Fm V (CTG)5	N
FmK (ATTTC)4	N	Fm W (AC)7	N
Fm L (TAA)16	N	Fm X (CG)10	N

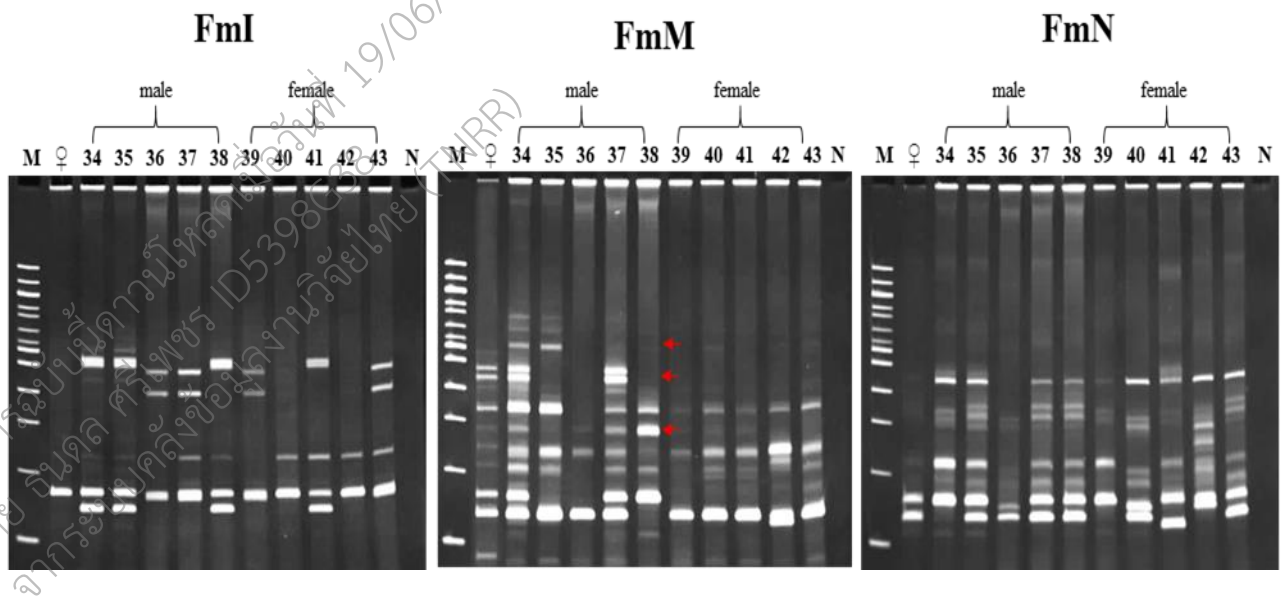
ตารางที่ 4 Microsatellite primers used to determine female and male

Primer name	Yes/No		Yes/No
Sex-lethal T(1*12)	Y	Unigene5366_Dsx (T)11	N
CHH-CA (Crustacean hyperglycemic hormone) CA(2*6)	N	Unigene2174_Beta-catenin (GT)6	N
CHH-AC (Crustacean hyperglycemic hormone) AC(2*8)	N	Fushi 1-GA (Fushi tarazu-factor 1) GA(2*9)	N
Ecdysteroid-GCA (Ecdysteroid receptor E75) GCA(3*14)	N	THr-T (Thyroid hormone receptor beta-A) T(1*13)	N
Ecdysteroid-TA (Ecdysteroid receptor E75) TA(2*6)	N	Ecdysone-TG (Ecdysone receptor) TG(2*12)	N
Unigene2131_Wnt16(AG)7	N	Female primer 4a	Y
Male primer 5a	N	Female primer 17c	N
Female primer 17d	N	Female primer 109a	N

เอกสารนี้ได้รับการรับรองเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธีรวัฒน์ ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

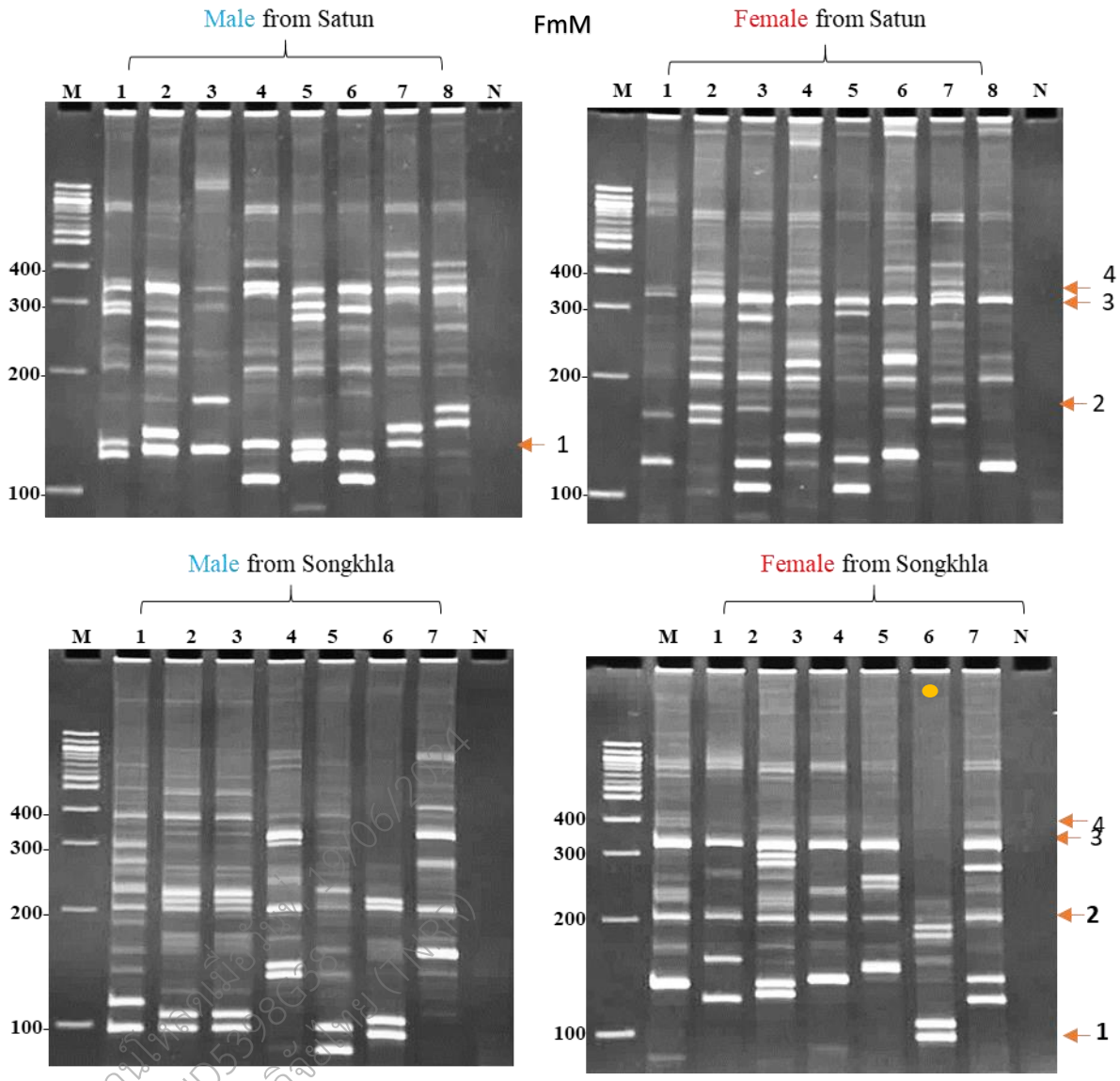


รูปที่ 9 PCR product pattern of genomic DNA from male and female amplified by 4a microsatellite primer, Satun M, Satun F (male and female from Satun), songkhla M, Songkhla F ((male and female from Songkhla), M= 100bp marker, red arrows indicated the bands which were different between male and female.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการอนุมัติ 19/06/2024
โดย รัฐนันท์ ศรีพงษ์ ID5398030
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THRR)

รูปที่ 10 PCR product pattern of genomic DNA from male and female progeny from broodstock M1 amplified by FmI, FmM and FmN microsatellite primer, M= 100bp marker.



รูปที่ 11 PCR product pattern of genomic DNA from male and female from Songkhla and Satun amplified by FmM microsatellite primer, M= 100bp marker, 1, 2,3, 4; markers to identify female respectively.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการยืนยันตัวตนโดย ID5398C53 เมื่อ 19/06/2014 โดย ปิยะนาถ ศรีเพชร สถาบันวิจัยข้อมูลงานวิจัยแห่งชาติ (TNRR)

Table 5 Sex identification using 4a, FmM and FmN microsatellites, pos; positive, un; unidentified.

Sample location	Sex (numbers)	microsatellites			
		4a		FmM	
		pos	un	pos	un
Satun	Male (8)	6	2	8	0
	Female (8)	7	1	8	0
Songkhla	male (7)	7	0	7	0
	Female (16), (8)	14	2	7	1

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

การดำเนินงานวิจัยเปรียบเทียบแผนการดำเนินงานที่เสนอไว้ (ระบุวิธีการดำเนินงานวิจัยที่สำคัญโดยสรุป และแสดงแผนการดำเนินงานรายกิจกรรมและระยะเวลาที่ใช้ เปรียบเทียบการดำเนินงานจริง)

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์**

กิจกรรมการดำเนินงานวิจัย	ระยะเวลาดำเนินงาน (เดือน)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
การเตรียมตัวอย่างและสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ												
ตรวจหาไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้จากทรานสคริปโตมกุ้งแชบ๊วย												
การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในรุ่นลูก F1 เปรียบเทียบกับพ่อแม่												
การวิเคราะห์ข้อมูล												
สรุปผลและเขียนผลงานตีพิมพ์												

แผนการดำเนินงาน

ผลการดำเนินงาน

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

4.สรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR (Output/Outcome/Impact)

โครงการวิจัย**ย่อยที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์**

4.1 ผลผลิต

รายการ	**รายละเอียด**
1) องค์ความรู้	Markers ที่ใช้ติดตามพันธุกรรมกุ้ง
2) บทความวิชาการ	Draft Manuscript เตรียมส่งตีพิมพ์
3) การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ	-

5.2 ผลลัพธ์ *(โปรดระบุผลลัพธ์จากผลผลิตภายใต้โครงการ)*

รายการ	**รายละเอียด**
1) นักศึกษาปริญญาโท	-
1) นักศึกษาปริญญาเอก	-
2) กระบวนการ	-

4.3 ผลกระทบ *(โปรดระบุผลกระทบได้จากผลลัพธ์ภายใต้โครงการ)*

รายการ	**รายละเอียด**
การจ้างงาน	ผู้ช่วยวิจัยวุฒิปริญญาโท
การพัฒนาบุคลากร	นักศึกษาปริญญาตรีได้ทำโครงงาน นักวิจัยมีความสามารถทาง Molecular biology มากขึ้น

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดโดย ธนดล ศรีเพชร ID 5398638 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR) เมื่อวันที่ 19/06/2024

5. เอกสารอ้างอิง Reference

Acín-Pérez, R., Bayona-Bafaluy, M. P., Bueno, M., Machicado, C., Fernández-Silva, P., Pérez-Martos, A., Montoya, J., López-Pérez, M. J., Sancho, J., & Enríquez, J. A. (2003). An intragenic suppressor in the cytochrome c oxidase I gene of mouse mitochondrial DNA. *Human Molecular Genetics*, *12*(3), 329–339. https://doi.org/10.1093/hmg/ddg021

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H. A., & Caskey, C. T. (1991). DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats. *American Journal of Human Genetics*, *49*, 746–756. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683171/pdf/ajhg00081-0054.pdf

Fernandes, T. J. R., Amaral, J. S., & Mafra, I. (2020). DNA barcode markers applied to seafood authentication: an updated review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–32. https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1811200

Folmer,, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, *3*(5), 294–299. https://doi.org/10.1071/ZO9660275

González-Castellano, I., González-López, J., González-Tizón, A. M., & Martínez-Lage, A. (2020). Genetic diversity and population structure of the rockpool shrimp Palaemon elegans based on microsatellites: evidence for a cryptic species and differentiation across the Atlantic–Mediterranean transition. *Scientific Reports*, *10*(1), 10784. https://doi.org/10.1038/s41598-020-67824-7

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *270*(1512), 313–321. https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218

Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biology*, *2*(10), e312. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312

Hellberg, R. S., Pollack, S. J., & Hanner, R. H. (2016). Seafood Species Identification Using DNA Sequencing. In A. M. Naaum & R. H. Hanner (Ed.), *Seafood Authenticity and Traceability* (pp. 113–132). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801592-6.00006-1

Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, *44*, 397–401.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการอนุมัติ ณ วันที่ 19/06/2024 โดย ธนดล ศรีเพชร ID53BG3 จากระบบหลังบ้านของ (TNRR)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1715430/pdf/ajhg00113-0101.pdf

Min See, L., Tan, S.G., Hassan, R., Siraj, S.S. and Bhassu, S., 2009. Development of microsatellite markers from an enriched genomic library for the genetic analysis of the Malaysian giant freshwater prawn, Macrobrachium rosenbergii. Biochemical genetics, 47(9), pp.722-726.

Purushothaman, P., Chakraborty, R. D., Gidda, M., & Ganesan, K. (2020). Investigation of genetic diversity and stock structure of *Aristeus alcocki* Ramadan, 1938 (Decapoda: Aristeidae) populations in the Indian coast with microsatellite markers. *Fisheries Research*, *227*, 105550. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2020.105550

Scarano, D., & Rao, R. (2014). DNA markers for food products authentication. *Diversity*, *6*(3), 579–596. https://doi.org/10.3390/d6030579

Song, N., Li, P., Zhang, X., & Gao, T. (2020). Genetic diversity status and conservation priority of hatchery-produced offspring populations of *Fenneropenaeus chinensis* by microsatellite DNA. *Marine and Freshwater Research*, *71*(12), 1592–1601. https://doi.org/10.1071/MF19235

Sznajder, Ł.J., Thomas, J.D., Carrell, E.M., Reid, T., McFarland, K.N., Cleary, J.D., Oliveira, R., Nutter, C.A., Bhatt, K., Sobczak, K. and Ashizawa, T., 2018. Intron retention induced by microsatellite expansions as a disease biomarker. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(16), pp.4234-4239.

Tautz, D. (1989). Hypervariabflity of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, *17*(16), 6463–6471. https://doi.org/10.1093/nar/17.16.6463

Volckaert, F.A.M., Hellemans, B. and Pouyaud, L., 1999. Nine polymorphic microsatellite markers in the SE Asian catfishes *Pangasius hypophthalmus* and *Clarias batrachus*. Animal genetics, 30(5), pp.383-384.

Zhao, Y., Zhu, X., Li, Z., Xu, W., Dong, J., Wei, H., Li, Y., & Li, X. (2019). Genetic diversity and structure of Chinese grass shrimp, *Palaemonetes sinensis*, inferred from transcriptome-derived microsatellite markers. *BMC Genetics*, *20*(1), 1–9. https://doi.org/10.1186/s12863-019-0779-z

เอกสารฉบับนี้ได้รับการอนุมัติโดย ธนาคาร ศรีเพชร ID 5358G3 วันที่ 19/06/2024 จากระบบกลางของหน่วยงานภายนอก (FNRF)

6. รายงานการเงิน

แบบวิจัย 5/งบแผ่นดิน

รายงานสรุปแสดงรายการค่าใช้จ่ายเงินอุดหนุนการวิจัย
จากเงินงบประมาณแผ่นดิน

ชื่อโครงการย่อยที่ 3 (ภาษาไทย) **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์**
ชุดโครงการ การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
(ภาษาอังกฤษ) Germ Cell Transplant Technology in aquaculture
ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2564 จำนวน 561,330 บาท (ห้าแสนหกหมื่นหนึ่งพันสามร้อยสามสิบบาทถ้วน) ได้ใช้จ่ายเงินทั้งโครงการไปแล้วทั้งสิ้น จำนวน 561,339.88 บาท (ห้าแสนหกหมื่นหนึ่งพันสามร้อยสามสิบเก้าบาทแปดสิบแปดสตางค์) (รวมเงินงวดสุดท้ายที่ยังไม่ได้เบิกจากคณะ/หน่วยงานด้วย) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

หมวดค่าใช้จ่าย	บาท	สต.
1. หมวดค่าจ้างชั่วคราว 1. ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัยปริญญาโท เดือนละ 19,000 บาท จำนวน 12 เดือน	228000	00
2. หมวดค่าวัสดุ วัสดุและสารเคมี เช่น สารเคมีสกัดดีเอ็นเอ การทำ PCR ตัวอย่างกุ้ง สารเตรียม spermatogonia หลอดทดลองพลาสติก และอื่นๆ	272,327	74
3. ค่าใช้สอย การทำจ้างวิเคราะห์ RNA sequence ค่าน้ำมันรถ ค่าตอบแทนคนขับรถไปเอาตัวอย่างกุ้ง ค่าใช้สอยอื่นๆ เช่น น้ำยาล้างเครื่องแก้ว กระดาษเช็ดมือ ปากกาเขียนหลอดทดลอง ถุงพลาสติก และอุปกรณ์อื่นที่จำเป็นสำหรับการทดลอง	60,955	00
รวมเงิน ห้าแสนหกหมื่นหนึ่งพันสามร้อยสามสิบเก้าบาทแปดสิบแปดสตางค์	561,330	88

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวข้างต้นเป็นความจริงทุกประการ

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไลวรรณ โชติเกียรติ)
หัวหน้าโครงการ
วันที่...../...../.....

ลงชื่อ.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สหัช จันทนาอรพินท์)
หัวหน้าสาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
วันที่...../...../.....

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398538
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

7. มาตรฐานการวิจัย มีการใช้สัตว์ทดลอง มีการวิจัยเกี่ยวข้องกับความปลอดภัยทางชีวภาพ มีการใช้ห้องปฏิบัติการที่เกี่ยวของกับสารเคมี

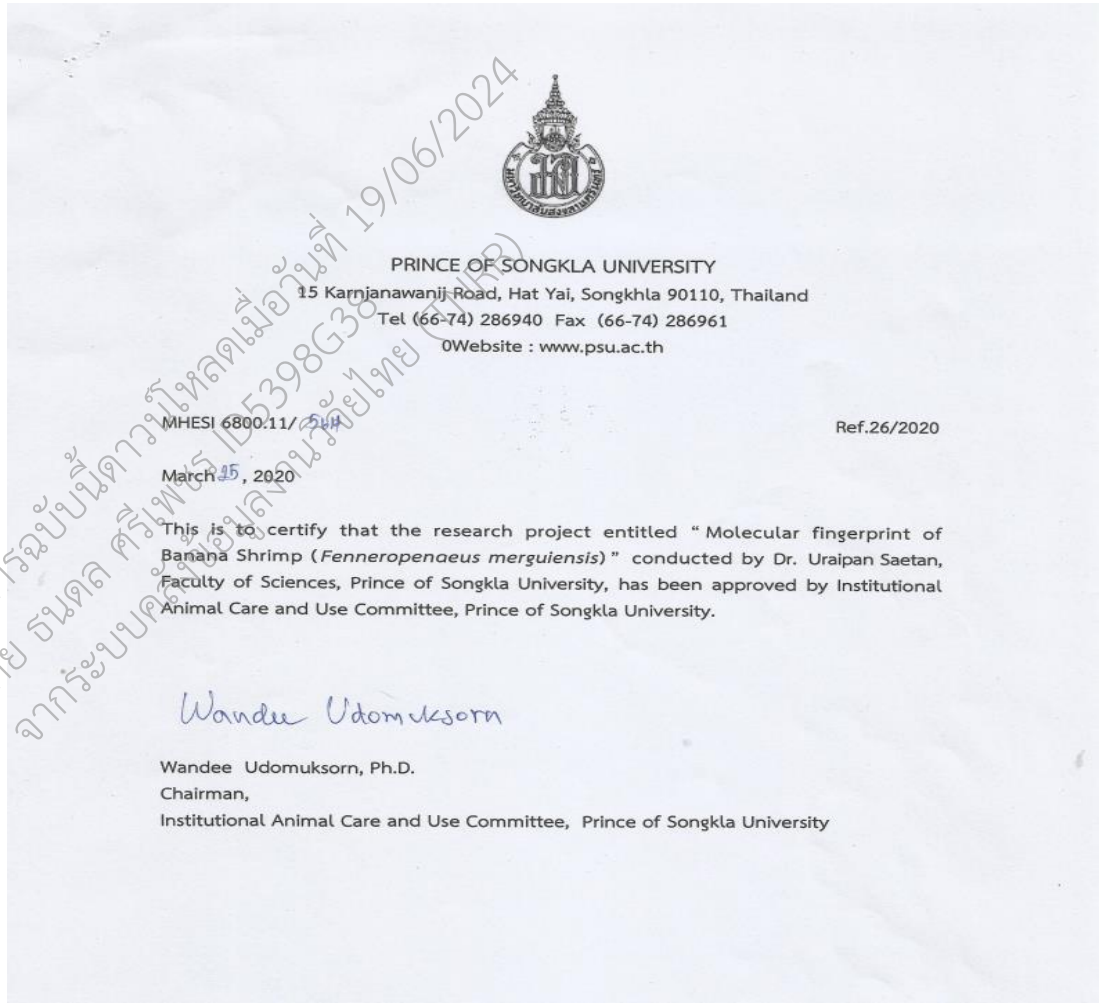
เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.: เอกสารประกอบสรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR ได้ให้รายละเอียดใน**<u>วิธีการดำเนินงานและในสรุปผลผลิต ผลลัพธ์ และผลกระทบจากงานวิจัยที่สอดคล้องกับ OKR (Output/Outcome/Impact) แล้ว</u>**

ภาคผนวก ข.: มาตรฐานงานวิจัย

1.จริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลองของโครงการ



PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY
15 Karnjanawanij Road, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand
Tel (66-74) 286940 Fax (66-74) 286961
0Website : www.psu.ac.th

MHESI 6800.11/ 514 Ref.26/2020

March 15, 2020

This is to certify that the research project entitled " Molecular fingerprint of Banana Shrimp (*Fenneropenaeus merguiensis*) " conducted by Dr. Uraipan Saetan, Faculty of Sciences, Prince of Songkla University, has been approved by Institutional Animal Care and Use Committee, Prince of Songkla University.

Wandee Udomuksorn

Wandee Udomuksorn, Ph.D.
Chairman,
Institutional Animal Care and Use Committee, Prince of Songkla University

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังปัญญาของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CUIR)

รายชื่อห้องปฏิบัติการที่เข้าร่วมใช้ระบบ ESPReL ของคณะวิทยาศาสตร์

ภาควิชา	ที่	ที่	รายชื่อห้องปฏิบัติการ	CODE	ESPReL เลขทะเบียน	หัวหน้าห้องปฏิบัติการ	พื้นที่ (ตร.ม.)	เสนอชื่อตัวแทน (แต่งตั้งกรรมการ)
วิทยาศาสตร์	33	1	ห้องปฏิบัติการเตรียมตัวอย่างวัสดุ	PSU_Sci 17	2-0260-0114-6	น.ส.นุชรีย์ ชมเชย	72	1. น.ส.นุชรีย์ ชมเชย
และเทคโนโลยีวัสดุ	34	2	ห้องปฏิบัติการเซรามิกส์	PSU_Sci 18	2-0260-0115-4	น.ส.นุชรีย์ ชมเชย	72	2. นางเพชรดาพัชญ์ บุญสุข
	35	3	ห้องปฏิบัติการทดสอบ	PSU_Sci 19	2-0260-0116-2	น.ส.นุชรีย์ ชมเชย	54	
	36	4	ห้องปฏิบัติการเคมี	PSU_Sci 20	2-0260-0117-1	น.ส.นุชรีย์ ชมเชย	36	
	37	5	ห้องปฏิบัติการและวิจัย Membrane	PSU_Sci 21	2-0260-0118-9	น.ส.นุชรีย์ ชมเชย	104.5	
	38	6	ห้องปฏิบัติการวิจัยพอลิเมอร์ 1	PSU_Sci 35	2-0260-0078-6	รศ.ดร.วรากรณ์ ดันรัตนกุล	18	
	39	7	ห้องปฏิบัติการพาง วท.พอลิเมอร์	PSU_Sci 36	2-0260-0079-4	ผศ.ดร.แก้วตา แก้วศาพิพย์	144	
	40	8	ห้องปฏิบัติการ วท. 310	PSU_Sci 37	2-0260-0080-8	ผศ.ดร.วัฒิตา ชินมา	48	
	41	9	ห้องปฏิบัติการพาง วท.พอลิเมอร์	PSU_Sci 50	2-0260-0081-6	ผศ.ดร.จิราภรณ์ ไชยบัญฑิษฐ์	96	
	42	10	ห้องปฏิบัติการและวิจัย Advanced Ceramics	PSU_Sci 14	2-0260-0082-4	ผศ.ดร.พรสุดา บ่มไล่	114	
	43	11	ห้องปฏิบัติการพอลิเมอร์	PSU_Sci 8	2-0260-0092-1	ดร.ชวนพิศ ชาวดง	100	
	44	13	ห้องปฏิบัติการขึ้นรูปยาง	PSU_Sci 51	2-0260-0086-7	ดร.นิตินาถ แซ่ตั้ง	150	
วิทยาศาสตร์ประยุกต์	45	1	ห้องปฏิบัติการบรรพณุวิทยา	PSU_Sci 38	2-0260-0067-1	ดร.วงศ์กฎ ภู่ณิรัตน์	25	1. น.ส.เสาวลักษณ์ รัตนะสิงห์
	46	2	ห้องปฏิบัติการเคมีประยุกต์	PSU_Sci 6	2-0260-0093-0	ผศ.ดร.วรากร ลิ่มบุตร	80	
	47	3	ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์	PSU_Sci 7	2-0260-0094-8	ผศ.ดร.ภูวดล ณนะเกียรติโกร	48	
	48	4	ห้องปฏิบัติการโภชนศาสตร์สัตว์น้ำประยุกต์	PSU_Sci 70	2-0260-0085-9	ผศ.ดร.ภาคุณ ทองประจุแก้ว	24	
เทคโนโลยีชีวภาพฯ	49	1	ห้องปฏิบัติการวิจัย ผศ.ดร.วราพร วรรณนา	PSU_Sci 71	2-0260-0099-9	ผศ.ดร.วราพร วรรณนา	50	1. นางสาวปัญชลิกา เดพะมาก
	50	2	ห้องปฏิบัติการวิจัย ศ.ดร.อมรรัตน์ พงศ์ตรารา	PSU_Sci 72	2-0260-0100-6	ศ.ดร.อมรรัตน์ พงศ์ตรารา	50	2. นางสาวพณณล ปิ่นแก้ว
	51	3	ห้องปฏิบัติการวิจัย รศ.ดร.วิไลวรรณ โพติเกียรติ	PSU_Sci 73	2-0260-0101-4	รศ.ดร.วิไลวรรณ โพติเกียรติ / ดร. อุไรพรรณ แซ่ตัน		
	52	4	ห้องปฏิบัติการวิจัย ดร.มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ	PSU_Sci 74	2-0260-0102-2	ดร.มลวดี วงศ์ลาภสุวรรณ	50	
	53	5	ห้องปฏิบัติการวิจัย ดร.จุฑารัตน์ เอี่ยวฤดุยากร	PSU_Sci 75	2-0260-0103-1	ดร.จุฑารัตน์ เอี่ยวฤดุยากร	50	
	54	6	ห้องปฏิบัติการวิจัย รศ.ดร.สมพร ต้นสกุล	PSU_Sci 76	2-0260-0104-9	รศ.ดร.สมพร ต้นสกุล	50	
	55	4	ห้องปฏิบัติการวิจัย ดร.อลิษา หนักแก้ว	PSU_Sci 77	2-0260-0105-7	ดร.อลิษา หนักแก้ว	50	
	56	8	ห้องปฏิบัติการเรียนปฏิบัติการกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลฯ	PSU_Sci 78	2-0260-0106-5	นางสาวปัญชลิกา เดพะมาก	96	
	57	9	ห้องปฏิบัติการ S.U.Genomic Laboratory	PSU_Sci 9	2-0260-0095-6	ดร.สุชีรา ฉนนิมิตร	80	
	58	10	ห้องปฏิบัติการชีวสารสนเทศ	PSU_Sci 15	2-0260-0061-1	ผศ.ดร.อนันตชา สังข์เกตุ	52	
เภสัชวิทยา	59	1	ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยาโมเลกุล	PSU_Sci 11	2-0260-0022-1	ดร.วันดี อุดมอักษร	96	1. นางนิรชา ยันเยี่ยม
ฟิสิกส์	60	1	ห้องปฏิบัติการธรณีฟิสิกส์	PSU_Sci 16	2-0260-0058-1	ผศ.ดร.สวัสดิ์ ยอดขยัน	200	1. .....
	61	2	ห้องปฏิบัติการชีวฟิสิกส์โปรีโอคอนเฟอร์ โปโอโฟโตนิกส์และชีวฟิสิกส์เชิงคำนวณ	PSU_Sci 12	2-0260-0096-4	รศ.ดร.ปณต อารรังกูร	233.5	
	62	3	ห้องปฏิบัติการฟิสิกส์วัสดุ	PSU_Sci 13	2-0260-0097-2	รศ.ดร.นันทกาญจน์ มุรสิด	208	

เอกสารฉบับนี้ได้รับการรับรองความถูกต้องแล้ว โดย ธนดล ศรีพัฒน์ รหัส 6510230980 เมื่อ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายงานประจำปี

(รอบ 12 เดือน)

“การใช้โพรไบโอติกในการอนุบาลและเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการฝากเซลล์สืบพันธุ์”

“Probiotic application to neser the nursery and aquaculture of germ cell transplantation”

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพร วรรณนา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

ประจำปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ SCI6505113d

ชุดโครงการวิจัย “การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ”
ชื่อโครงการย่อยที่ 4 “การใช้โพรไบโอติกในการอนุบาลและเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการฝากเซลล์สืบพันธุ์”

คณะผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วราพร วรรณนา
หน่วยงานต้นสังกัด (คณะ/ภาควิชาหรือหน่วยงาน)
สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ. หาดใหญ่ จ. สงขลา

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุนส่งเสริม ววน.) และ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2564-2565 สัญญาเลขที่ SCI6505113d ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้ข้อเสอแนะต่าง ๆ และขอขอบคุณหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพโมเลกุลและชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทาวิจัย สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้ร่วมงานวิจัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทาวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาประสิทธิภาพของ *P. pentosaceus* MR001 ในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยการทดลองเสริมอาหารกุ้งด้วย *P. pentosaceus* MR001 พบว่ากุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก MR001 มีอัตราการเจริญเติบโตและมีกิจกรรมของเอนไซม์ ($p < 0.05$) เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* นอกจากนี้กุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก เมื่อศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของลำไส้พบว่าลำไส้มีความสูงของเยื่อบุผิวของลำไส้เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันพบว่ายีน ProPO, LvToll และ TLR มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึงกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกและติดเชื้อ *V. paraheamolyticus* ยังมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า *P. pentosaceus* MR001 มีศักยภาพพัฒนาเป็นอาหารเสริมในการเพาะเลี้ยงกุ้ง

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Abstract

In this study, the probiotic potential in shrimp aquaculture of *Pediococcus pentosaceus* MR001 was investigated by means of feeding trial. In the feeding trial, dietary supplementation with *P. pentosaceus* MR001 significantly increased weight gain and digestive enzyme activity ($p < 0.05$) in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The intestinal histology showed that shrimp given the probiotic diet had healthier guts than the control group. Also, the immune gene expression (ProPO, LvToll and TLR) and the survival rate in the treatment group were significantly increased when compared with the control group. Our findings suggest that insights in the functional characteristics of *P. pentosaceus* strain MR001 could provide opportunities for applications of such strain in shrimp diet supplementation.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทสรุปผู้บริหาร

บทนำ

โครงการนี้ได้นำโพรไบโอติก (probiotic) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มาใช้ในพัฒนาการอนุบาลลูกกุ้งและการเลี้ยงกุ้ง โดยมีหลักคิดเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตอื่นได้แก่เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะทำให้เกิดผลที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของคนและสัตว์ มีงานวิจัยมากมายที่ศึกษาประสิทธิภาพของการใช้โพรไบโอติกเพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาและกุ้ง ทั้งด้านการเจริญเติบโต การควบคุมโรค การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน การรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Kumar et al., 2016; Li et al., 2018) ดังนั้นการนำโพรไบโอติกไปใช้ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง และได้ผลิตภัณฑ์สัตว์ที่ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โพรไบโอติกที่นิยมใช้กันมากในการเพาะเลี้ยงกุ้งคือ Bacillus spp. และ Lactobacillus spp. (Kumar et al., 2016; Vine et al., 2006; Kesarcodi-Watson et al., 2008) โดยประสิทธิภาพของโพรไบโอติกจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยอันได้แก่ ชนิดของโพรไบโอติก ปริมาณที่ใช้ ระยะเวลาความถี่ที่ให้โพรไบโอติก และวิธีการใช้หรือให้โพรไบโอติก (Lakshmi et al., 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจะได้นำเชื้อโพรไบโอติกพร้อมใช้ ที่แยกได้จากกุ้งและทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพ ทั้งเพิ่มการเจริญเติบโตและสร้างภูมิคุ้มกันกับกุ้งขาว เพื่อนำมาใช้ในการการอนุบาลและเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยที่เกิดจากการอุ้มบุญในห้องปฏิบัติการจำลอง

วัตถุประสงค์

คัดเลือกโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการเจริญเติบโตและต้านทานเชื้อโรคจากกุ้ง

สรุป

คัดเลือกไพรไบโอติกเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการโดยศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ พบว่า *P. pentosaceus* MR001 มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะความเป็นกรดและสภาวะที่มีเกลือน้ำดีได้ดี รวมถึงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และเมื่อนำไพรไบโอติก *P. pentosaceus* MR001 ไปทดสอบเสริมลงในอาหารกุ้งที่ความเข้มข้นของไพรไบโอติกที่ความเข้มข้นคือ 10^7 cfu/g 10^8 cfu/g และ 10^9 cfu/g เป็นเวลา 21 วัน พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก ที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/g มีอัตราการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับโพรไบโอติก (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ยังพบค่า FCR ต่ำในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า *P. pentosaceus* MR001 สามารถใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพและช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตของกุ้ง มีรายงานมากมายพบว่าการเสริมโพรไบโอติกให้กับกุ้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญเติบโตในกุ้งอย่างมีนัยสำคัญ (Wang e2007; Zokaeifar et al., 2012; Chai et al., 2016; Won et al., 2020)

เอกสารนี้ถูกดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ผู้ใช้งานชื่อ ID5398G38
การนำไปใช้ประโยชน์ต้องอยู่ภายใต้ข้อตกลงการใช้งานของ ThaiJO
ห้องสมุดวิจัยไทย (TNRR)

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งภายหลังจากการได้รับโพรไบโอติก

	Control	Probiotic 10^7	Probiotic 10^8	Probiotic 10^9
Initial weight (g)	4.106 ± 0.70	4.59 ± 0.36	4.31 ± 0.32	3.59 ± 0.21
Final weight (g)	4.73 ± 0.81	5.21 ± 0.41	5.06 ± 0.39	4.3 ± 0.19
Weight Gain	13.66 ± 1.89^{a}	13.29 ± 1.99^{a}	15.53 ± 0.56^{ab}	17.56 ± 1.40^{b}
Feed efficiency	1.30 ± 0.18^{a}	1.27 ± 0.19^{a}	1.48 ± 0.05^{ab}	1.67 ± 0.13^{b}
FCR	0.79 ± 0.12^{ab}	0.81 ± 0.11^{a}	0.68 ± 0.02^{ab}	0.60 ± 0.05^{b}
SGR	0.61 ± 0.08^{a}	0.59 ± 0.08^{a}	0.69 ± 0.02^{ab}	0.77 ± 0.06^{b}

จากผลการทดลองข้างต้น ประสิทธิภาพการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง อาจเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเกิดจากการเสริมโพรไบโอติก *P. pentosaceus* ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารของกุ้งเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของความสามารถของสิ่งมีชีวิตในการเผาผลาญสารอาหารที่ได้รับ โดยในการศึกษาได้นำลำไส้ของกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก 14 วัน มาวิเคราะห์กิจกรรมย่อยอาหารในลำไส้ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ อะไมเลส ทริปซิน และไลเปส มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงในกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินและเซลลูเลส (ตารางที่ 2) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับหลายการทดลองที่ได้มีการให้โพรไบโอติก Pediococcus spp. แล้วมีรายงานกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงขึ้นในกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีโพรไบโอติก (Castex et al., 2010; Won et al., 2020) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *P. pentosaceus* ช่วยเพิ่มการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันซึ่งอาจอธิบายการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นที่พบในกุ้งที่เสริมด้วยโพรไบโอติก

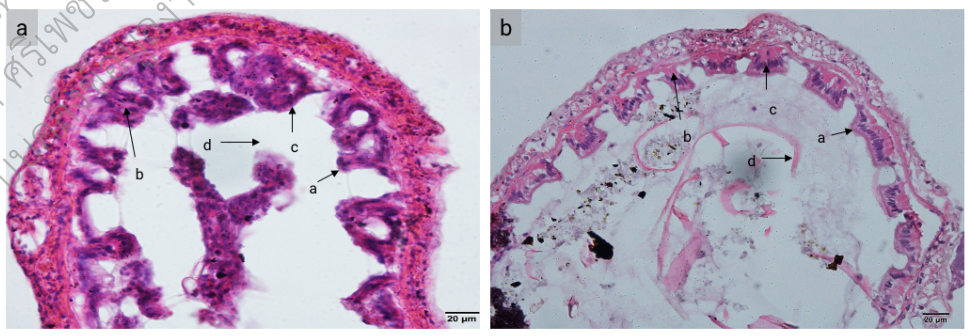
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการสงวนลิขสิทธิ์ของวารสารหลักสูตรเมื่อวันที่ 19/06/2024 โดย ธนพัต ศิริพัฒน์ ID 6306638 จากระบบคลังข้อสอบ (THERA)

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยอาหารของกุ้งภายหลังจากการได้รับโพรไบโอติก

Digestive enzymes	Control	Probiotic
Trypsin (U mg protein^{-1})	0.89±0.18	1.66±0.46*
Chymotrypsin (mU mg protein^{-1})	10.94±2.91	13.84±5.29
Activity ratio of trypsin to chymotrypsin (T/C ratio)	69.70±19.68	148.26±54.71
Amylase (U mg protein^{-1})	780.09±94.37	1660.92±435.10*
Cellulase (U mg protein^{-1})	13.37±1.75	15.71±2.15
Lipase (U mg protein^{-1})	392.20±118.68	1117.16±172.33*
Total Protein	11.04±1.30	18.98±4.39*

นอกจากนี้พบว่าความสูงของเยื่อบุผิวของลำไส้เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ให้อาหารโพรไบโอติก ความสูงและ/หรือความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นของ microvilli เซลล์เยื่อบุผิวลำไส้และเอนเทอโรไซต์ได้แสดงให้เห็นว่ามีพื้นที่ผิวที่ดูดซับได้กว้างขวางและความสามารถในการดูดซับสารอาหาร (Duen et al., 2017; Daniels et al. 2010)

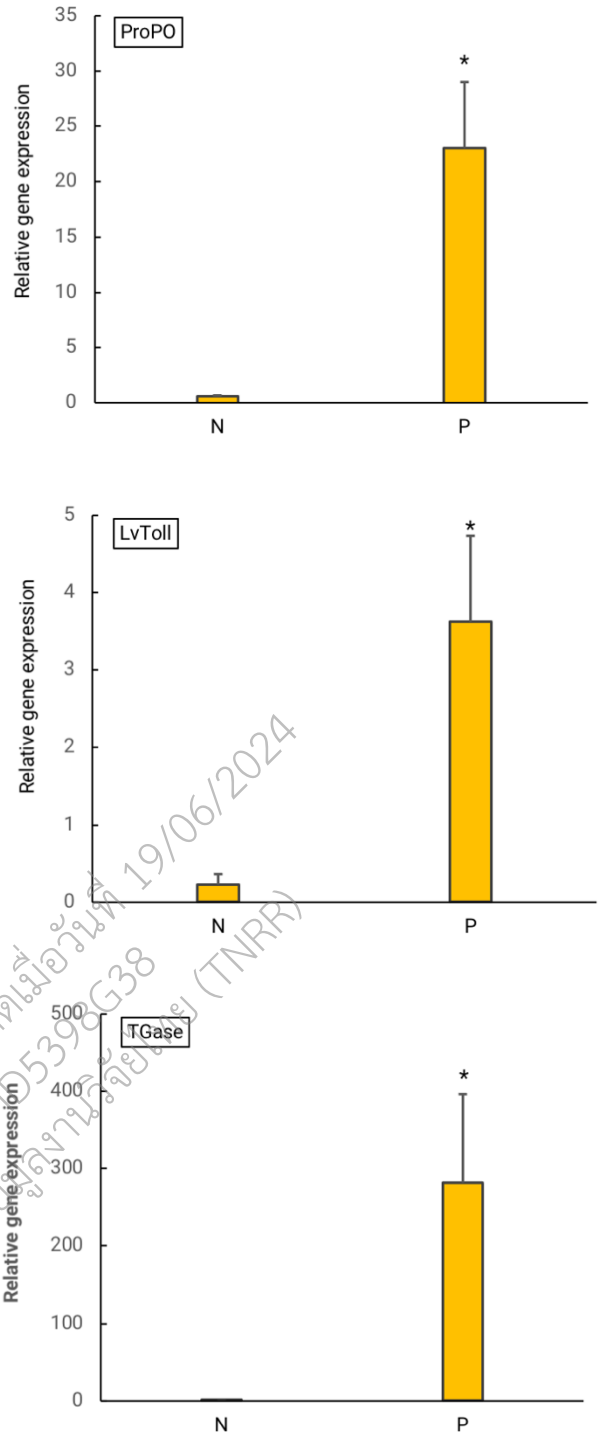
เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีโพชร ID5390638
จากระบบ [illegible] จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (THAIRR)



รูปที่ 1 ลักษณะพยาธิสภาพของลำไส้กุ้ง (a) ลำไส้กุ้งที่ได้รับโพรไบโอติก (b) ลำไส้กุ้งที่ได้รับอาหารปกติ

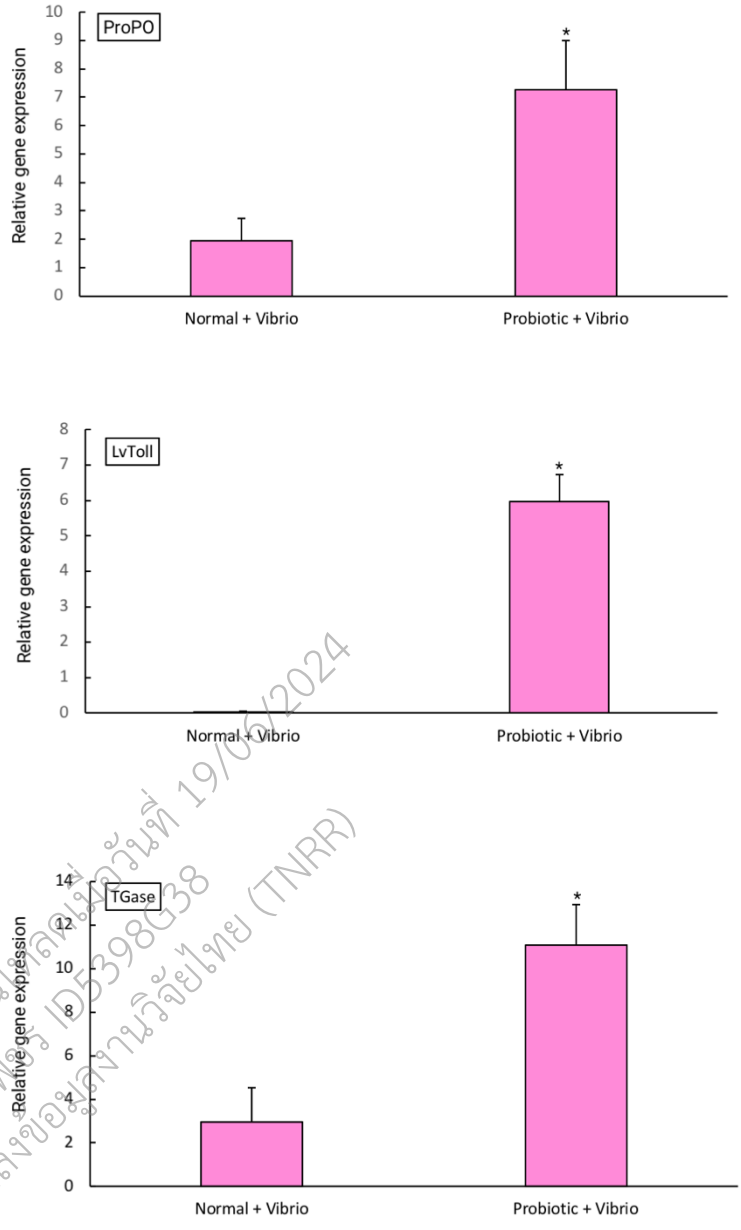
เพื่อศึกษาผลของโพรไบโอติกช่วยกระตุ้นหรือเสริมภูมิคุ้มกันในกุ้งหรือไม่ ผู้วิจัยจึงศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ ProPO LvToll และ TGase ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกและในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติกและติดเชื้อแบคทีเรีย (*V. paraheamolyticus*) ผลจากการทดลองพบว่า กุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก มีการแสดงออกของยีน ProPO LvToll และ TGase ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 1 และ 2 โดยเอนไซม์ proPO เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบ prophenoloxidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง proPO จะทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟีนอลเปลี่ยนไปเป็นควิโนนและส่งผลให้เกิดการผลิตเมลานิน ซึ่งช่วยในการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ proPO ในกุ้งกลุ่มที่ให้อาหารโพรไบโอติกอาจช่วยเพิ่มการต้านทานต่อเชื้อโรค (Won et al., 2020) และการที่ยีน LvToll มีการแสดงเพิ่มขึ้นในกุ้งกลุ่มที่รับโพรไบโอติก อาจเพิ่มการจดจำเชื้อโรคและเพิ่มการตอบสนองต่อโรค พบการทดลองที่คล้ายกันนี้ในกุ้งขาวที่ได้รับ Bacillus spp. (Sánchez-Ortiz et al., 2016) สำหรับยีน TGase ที่มีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับกุ้ง ทั้งนี้มีรายงานของ Fagutao et al. (2012) พบว่าการไม่มียีน TGase จะทำให้กุ้งอ่อนแอต่อการติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัส ซึ่งบ่งชี้ว่า TGase เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

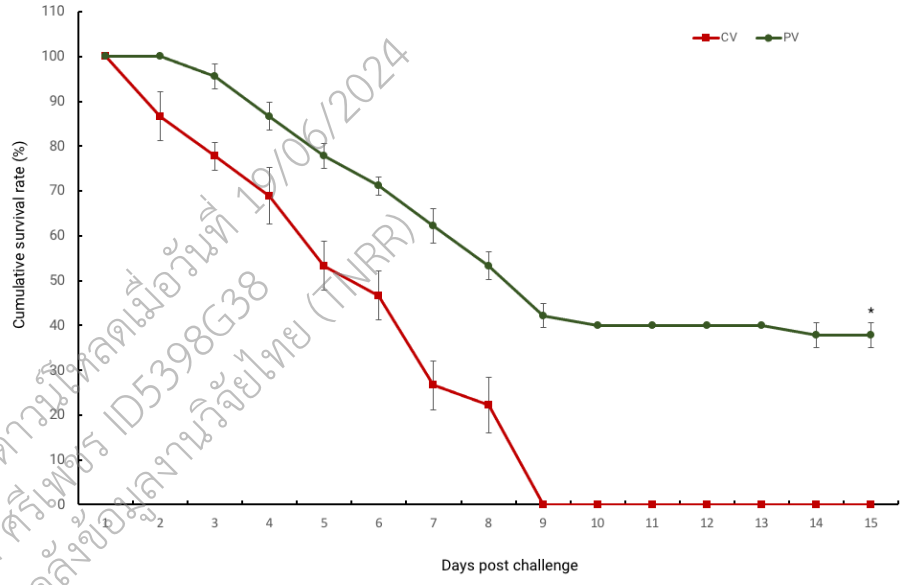
รูปที่ 2 การเปรียบเทียบแสดงออกยีน ProPO LvToll และ TGase ในกุ้งกลุ่มควบคุม (N) และกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก (P)



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398038
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 3 การเปรียบเทียบแสดงออกยีน ProPO LvToll และ TGase ในกุ้งที่ติดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งกลุ่มควบคุม (Normal + Vibrio) และกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก (Probiotic + Vibrio)

จากผลการทดลองที่ผ่านพบว่าโพรไบโอติก สามารถช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันคือ ProPO LvToll และ TGase เพื่อศึกษาผลโพรไบโอติกต่อการป้องกันเชื้อแบคทีเรีย โดยนำกุ้งขาวขนาดประมาณ 3-5 กรัม มาเลี้ยงโดยให้กินอาหารที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก เป็นเวลา 30 วัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กุ้งที่กินอาหารสำเร็จรูปและได้รับเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* และกุ้งที่กินอาหารผสมโพรไบโอติกและได้รับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ผลการทดลองพบว่ากุ้งกลุ่มที่หลังจากผ่านไป 10 วันพบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 10^9 cfu/g มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ($p< 0.05$) โดยมีอัตราการรอดชีวิตคิดเป็น 40% และเมื่อเวลาผ่านไป 15 วันจะเห็นได้กุ้งมีอัตราการรอดชีวิตคงที่ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอาหารผสมโพรไบโอติกสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตในกุ้งหลังจากการติดเชื้อ *V. paraheamolyticus* การที่กุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกมีอัตราการตายที่ช้ากว่ากุ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกอาจเป็นเพราะโพรไบโอติกไปช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับกุ้ง ทำให้กุ้งสามารถต้านทานต่อแบคทีเรียได้นานกว่า ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยอื่น ๆ ที่พบว่า *P. pentosaceus* ช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของกุ้งที่ติดเชื้อ Vibrio spp. (Adel et al., 2017; Won et al., 2020)



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
สถาบันคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (THRR)

รูปที่ 4 อัตราการรอดชีวิตของกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก *P. pentosaceus* เมื่อกุ้งติดเชื้อแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus*

ภาคผนวก

7.1 แนบสำเนาบทความที่ได้รับการตีพิมพ์แล้ว (Reprint)

ตีพิมพ์ในวารสาร Scientific Reports, ฐานข้อมูล ISI (เอกสารแนบท้าย)

7.2 ผลงานวิจัยที่ยังไม่ได้ตีพิมพ์แต่อยู่ในวัตถุประสงค์ของโครงการ

ศึกษาผลของโพรไบโอติกในการต้านทานเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว

วิธีการทดลอง

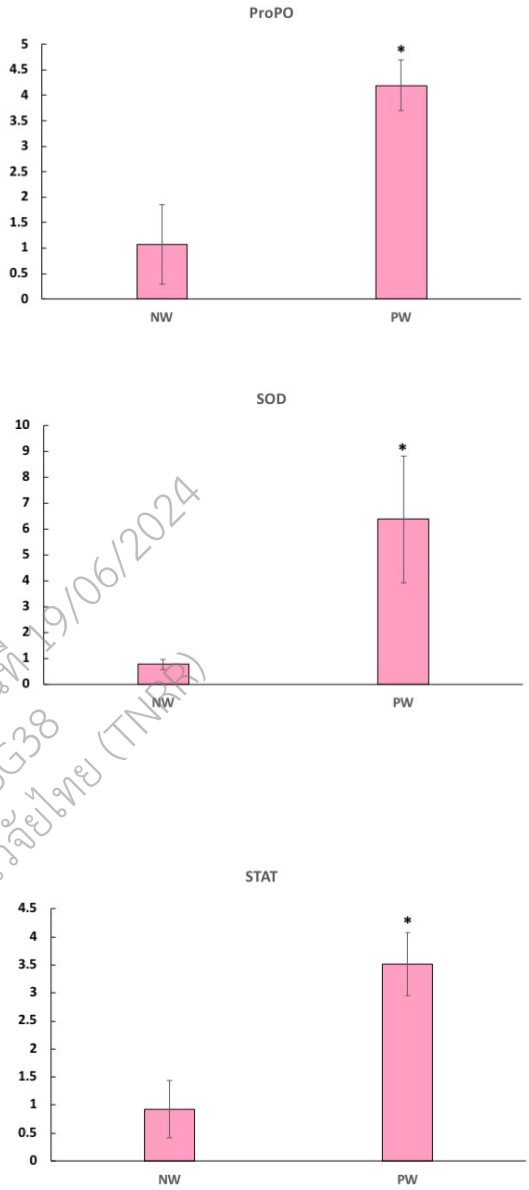
ศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อกุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยนำกุ้งขาวขนาดประมาณ 5-10 กรัม มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กุ้งที่กินอาหารสำเร็จรูปและฉีด WSSV และกุ้งที่กินอาหารสำเร็จรูปที่ผสมโพรไบโอติกและฉีด WSSV โดยใช้กุ้งกลุ่มละ 15 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ และให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน หลังจากให้อาหารตามกลุ่มการทดลองเป็นเวลา 30 วัน แล้วจึงทำให้กุ้งติดเชื้อ WSSV หลังจากติดเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บ heamocyte ของกุ้งแต่ละกลุ่ม และทำการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ TRizol^{R} LS Reagent ตามวิธีของบริษัท Invitrogen จากนั้นนำ cDNA ที่เตรียมได้มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังต่อไปนี้ Prophenoloxidase (ProPO) superoxidasedismutase (SOD) และ STAT โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับแต่ละยีน ติดตามผล PCR ด้วยสารเรืองแสง SYBR Green โดย ใช้เครื่อง PCR รุ่น MX3000P^{TM} (STRATAGENE®) วิเคราะห์ผลด้วย MX3005P Software ทำการเปรียบเทียบระดับการ แสดงออกยีนในแต่ละเนื้อเยื่อกับยีน actin ซึ่งเป็นยีนควบคุม ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS V.16 โดย $p<0.05$

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ภัทรดนัย ศรีเพชร ID5398038
สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก (TNRR)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการทดลองพบว่า กุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก มีการแสดงออกของยีน ProPO SOD และ STAT ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 5 โดยเอนไซม์ proPO เป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบ prophenoloxidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง proPO จะทำหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันของฟีนอลเปลี่ยนไปเป็นควิโนนและส่งผลให้เกิดการผลิตเมลานิน ซึ่งช่วยในการตอบสนองต่อการติดเชื้อก่อโรคได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ proPO ในกุ้งกลุ่มที่ให้อาหารโพรไบโอติกอาจช่วยเพิ่มการต้านทานต่อเชื้อโรค (Won et al., 2020) ขณะเดียวกันเอนไซม์ SOD เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาที่ทำลายอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (O2-) เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดออกซิเดชันนั้น (Campa-Córdova, 2002) มีการแสดงเพิ่มขึ้นในกุ้งกลุ่มที่รับโพรไบโอติก ก็เป็นส่วนหนึ่งของการต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัว

แดงดวงขาวในการทำลายเซลล์ นอกจากนี้ยีน STAT ที่มีบทบาทสำคัญในวิถีการส่งสัญญาณของระบบภูมิคุ้มกัน JAK–STAT ระหว่างที่มีการติดเชื้อไวรัส (Wen et al., 2014) ดังนั้น การที่ยีนนี้มีการเพิ่มสูงขึ้นแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกจะช่วยกระตุ้นการส่งสัญญาณในวิถีดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติก MR001 นอกจากจะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันในการต้านทานเชื้อแบคทีเรีย V. parahaemolyticus แล้วยังช่วยกระตุ้นการแสดงออกยีนในระบบภูมิคุ้มกันระหว่างที่กุ้งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวอีกด้วย



เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รูปที่ 3 การเปรียบเทียบแสดงออกยีน ProPO SOD และ STAT ในกุ้งที่ติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ในกุ้งกลุ่มควบคุม (NW) และกุ้งกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมโพรไบโอติก (PW)

เอกสารอ้างอิง

Campa-Córdova, A. I., Hernández-Saavedra, N. Y., & Ascencio, F. (2002). Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (Litopenaeus vannamei). Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP, 133(4), 557–565.

Wen R, Li F, Li S, Xiang J. (2014). Function of shrimp STAT during WSSV infection. Fish Shellfish Immunol. 38(2):354-60.

Won, S., Hamidoghli, A., Choi, W., Bae, J., Jang, W. J., Lee, S., and Bai, S. C. 2020. Evaluation of Potential Probiotics Bacillus subtilis WB60, Pediococcus pentosaceus, and Lactococcus lactis on Growth Performance, Immune Response, Gut Histology and Immune-Related Genes in Whiteleg Shrimp, Litopenaeus vannamei. Microorganisms 8(2):281.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับวิจัยต่อไป

1. ศึกษาหาวิธีการหรือปริมาณที่เหมาะสมในการให้ MR001 รวมถึงการใช้ probiotic ร่วมกับ prebiotic เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อโรค และประยุกต์ใช้ในอนาคต
2. ศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในลำไส้ของกุ้งที่ได้รับโพรไบโอติกและติดเชื้อก่อโรค

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

scientific reports

Check for updates

OPEN

Evaluation of probiotic characteristics and whole genome analysis of *Pediococcus pentosaceus* MR001 for use as probiotic bacteria in shrimp aquaculture

Warapond Wanna[1,2]✉, Komwit Surachat[4,5], Panmile Kaitimonchai[1] & Amornrat Phongdara[2,3]

The development of non-antibiotic and environmentally friendly agents is a key consideration for health management in shrimp aquaculture. In this study, the probiotic potential in shrimp aquaculture of *Pediococcus pentosaceus* MR001, isolated from *Macrobrachium rosenbergii*, was investigated by means of feeding trial and genetic characterization. In the feeding trial, dietary supplementation with *P. pentosaceus* MR001 significantly increased weight gain and digestive enzyme activity ($p < 0.05$) in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. The intestinal histology showed that shrimp given the probiotic diet had healthier guts than the control group. Also, the immune gene expression and the survival rate in the treatment group were significantly increased when compared with the control group. The genetic characteristics of *P. pentosaceus* strain MR001 were explored by performing whole-genome sequencing (WGS) using the HiSeq 2500 platform and PacBio system, revealing the complete circular genome of 1,804,896 bp. We also identified 1789 coding genes and subsequently characterized genes related to the biosynthesis of bacteriocins, stress resistance, and bile tolerance. Our findings suggest that insights in the functional and genetic characteristics of *P. pentosaceus* strain MR001 could provide opportunities for applications of such strain in shrimp diet supplementation.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดมาจากแหล่งข้อมูลวิทยานิพนธ์ โดย ธนพล ศรีเพชร เมื่อวันที่ 29 มิถุนายน 2564 จากระบบคลังข้อมูลวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (PSU)

Epidemics are increasingly recognized in many countries as one of the most important constraints on cultivated shrimp production. The development of non-antibiotic and environmentally friendly agents is a key factor for health management in aquaculture[1]. To reduce the use of antibiotics while maintaining or even increasing production efficiency, many farmers feed probiotics in place of antibiotics to their aquatic animals. Probiotics are live microorganisms that play an important role in the microbial balance of the host organisms. They can reduce pathogenic microbes, stimulate growth rate, and improve animal health[1]. Nevertheless, it is essential that the effects of probiotics are thoroughly investigated prior to any aquaculture applications. A variety of effects are dependent on the probiotic itself, the dosage employed, the treatment duration and the route and frequency of delivery[2]. The most common probiotics used in aquaculture include lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Enterococcus* sp., and yeast (*Saccharomyces cerevisiae*)[3–6]. *Pediococcus pentosaceus* is often used in starter cultures for fermenting meat and vegetable products in the food industry[7,8]. Additionally, studies have shown that *P. pentosaceus* can enhance innate immunity, physiological health and resistance to pathogens in fish[4] and shrimp[9,10]. Despite these findings, little is known about its genetic information and functions, compared with another closely related species *P. acidilactici*, which is widely used in aquaculture[11,12].

Some complete genome sequences of *P. pentosaceus* have been made available, but the strains investigated were isolated from food and the human intestine. Hence, this study focuses on the strain of *P. pentosaceus* MR001, isolated from *Macrobrachium rosenbergii*, which showed probiotic properties in vitro. The dietary supplementation

[1]Division of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90110, Thailand. [2]Center for Genomics and Bioinformatics Research, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand. [3]Faculty of Medical Technology, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand. [4]Division of Computational Science, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand. [5]Molecular Evolution and Computational Biology Research Unit, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai 90110, Songkhla, Thailand. ✉email: w.warapond@gmail.com

	Total plate count (log_{10} CFU/ml)		
	0 h	3 h	6 h
pH 3	6.73 ± 0.34	6.62 ± 0.41	4.98 ± 1.52
pH 7	7.35 ± 0.06	7.31 ± 0.13	8.08 ± 0.21

Table 1. Total plate counts for *P. pentosaceus* MR001 on MRS agar at pH 3 and 7 (control) over 3 h intervals. Values are mean ± standard deviation (n = 3).

		Total plate count (log_{10} CFU/ml)
NaCl	1%	9.23 ± 0.04
	2%	9.58 ± 0.03
	3%	8.99 ± 0.13
	4%	8.89 ± 0.10
	5%	8.68 ± 0.21
	6%	7.86 ± 0.09
Bile salt	0.6%	7.52 ± 0.13
	0.8%	6.20 ± 0.03
	1%	5.87 ± 0.06

Table 2. Effect of NaCl and bile salt on the growth of *P. pentosaceus* MR001. Values are mean ± standard deviation (n = 3).

was evaluated, and the whole genome was characterized in order to further evaluate the potential of this strain as a probiotic dietary supplement in marine aquaculture.

Results

Isolation and characterization of *P. pentosaceus MR001*. Twelve LAB were isolated from giant freshwater prawn gut and showed antagonistic ability against *V. harveyi*. Two isolates (no.4 and no.8) that have the best inhibition and high hydrophobicity (> 80%) were identified (Supporting Fig. 1, Supporting Table 1). Molecular analysis of the isolates was tested using 16sRNA which showed that two isolates were identified as the *Pediococcus pentosaceus*. Isolate no. 4 was defined as MR001 and retained for further analysis.

P. pentosaceus MR001 is Gram-positive, and coccus-shaped. The MR001 recorded a viable count, 4–6 log10 CFU/mL at pH 3 (Table 1). It tolerates up to 6% NaCl in MRS broth (7.86 ± 0.09 log10 CFU/ml) (Table 2). One important property to be called MR001 as a probiotic is the ability to tolerate ingredients in the gastrointestinal tract like bile salt. For this experiment different concentrations of bile salt in MRS broth (0.6–1%) were prepared. The results showed that *P. pentosaceus* can tolerate bile salt in all those concentrations, up to 1% bile salt as shown in Table 2. MR001 also exhibited antibacterial activity against shrimp pathogens including *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* (Fig. 1).

The auto-aggregation and co-aggregation properties of MR001 are shown in Table 3. The probiotic strains showed auto-aggregation values, ranging between 40 and 75% at 2–24 h incubation time. In addition, MR001 showed the high co-aggregation abilities with *V. harveyi* (70%) and *V. parahaemolyticus* (83%) at 24 h.

Growth performance of *L. vannamei*. Post-larvae of *L. vannamei* were divided into four groups. One group was given a control diet, and the rest were given diets containing the probiotic supplement at different concentrations. The results of growth performance and feed utilization are presented in Table 4. Shrimp treated with the probiotic bacteria at 10^9 CFU/g exhibited significantly higher degrees of weight gain, a faster specific growth rate, and lower feed conversion ratio (FCR), compared with the control group ($p < 0.05$). However, no significant differences were observed between the groups that received probiotic supplementation at 10^7 CFU/g and at 10^8 CFU/g. Therefore, the group with probiotic supplementation at 10^9 CFU/g was selected to further analyze the potential probiotic activity of *P. pentosaceus* MR001 in later experiments.

Digestive enzyme activity. The digestive enzyme activity of *L. vannamei* was evaluated after a three-week feeding trial. The activities of trypsin, amylase and lipase were significantly enhanced in the 10^9 CFU/g probiotic group, compared to the control group ($p < 0.05$). However, no differences were detected in chymotrypsin and cellulase activities (Table 5).

Intestinal histology. At the end of the three-week feeding trial, the intestinal tissue of shrimp that received probiotic dietary supplementation at 10^9 CFU/g was collected and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Compared with the commercial feed group, the tissue of the probiotic group showed more closely connected and longer epithelium (Fig. 2, Table 6).

เอกสารฉบับนี้ได้รับการตรวจสอบจากระบบคลังข้อมูลวิจัย ID 5963 วันที่ 10/7/2024 โดย ธนพล ศรีเพชร จากระบบคลังข้อมูลวิจัย TNRR

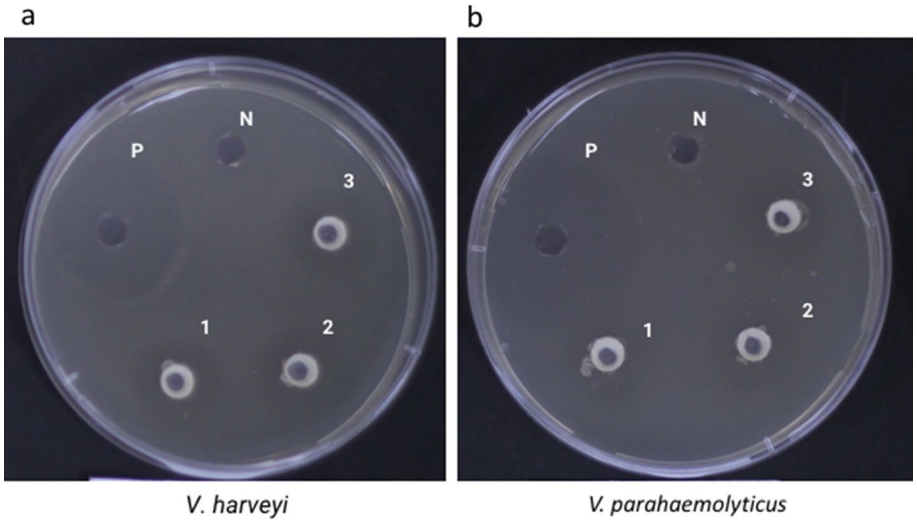


Figure 1. Inhibition zones produced by antimicrobial activity of *P. pentosaceus* MR001 on (**a**) *V. harveyi* and (**b**) *V. parahaemolyticus* were shown. P: positive control (100 µg/ml tetracycline), N: negative control (MRS broth), 1–3: culture supernatant.

	% of auto-aggregation		
	2 h	6 h	24 h
MR001	40.40 ± 1.07	72.03 ± 0.48	75.00 ± 0.97
	% of co-aggregation		
	2 h	6 h	24 h
V. parahaemolyticus	12.74 ± 0.21	50.81 ± 0.04	83.04 ± 0.13
V. harveyi	20.11 ± 0.13	53.47 ± 0.06	70.71 ± 0.08

Table 3. Auto-aggregation and co-aggregation abilities of *P. pentosaceus* MR001. Values are mean ± standard deviation (n = 3).

	Control	Probiotic 10^7	Probiotic 10^8	Probiotic 10^9
Initial weight (g)	4.106 ± 0.70	4.59 ± 0.36	4.31 ± 0.32	3.59 ± 0.21
Final weight (g)	4.73 ± 0.81	5.21 ± 0.41	5.06 ± 0.39	4.3 ± 0.19
Weight gain	13.66 ± 1.89^{a}	13.29 ± 1.99^{a}	15.53 ± 0.56^{ab}	17.56 ± 1.40^{b}
Feed efficiency	1.30 ± 0.18^{a}	1.27 ± 0.19^{a}	1.48 ± 0.05^{ab}	1.67 ± 0.13^{b}
FCR	0.79 ± 0.12^{ab}	0.81 ± 0.11^{a}	0.68 ± 0.02^{ab}	0.60 ± 0.05^{b}
SGR	0.61 ± 0.08^{a}	0.59 ± 0.08^{a}	0.69 ± 0.02^{ab}	0.77 ± 0.06^{b}

Table 4. Growth performance and feed utilization of *P. pentosaceus* MR001-treated *L. vannamei*. Different letters indicate significant comparison ($p < 0.05$).

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับการเผยแพร่ผ่านระบบคลังข้อมูลวิจัยและนวัตกรรม (TNRR) โดย ธนดล ศรีเพชร IP:202.28.6.38 วันที่ 13/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลวิจัยและนวัตกรรม (TNRR)

Cumulative survival rate of *L. vannamei* after *V. parahaemolyticus* infection. The survival rate of the shrimp receiving the probiotic bacteria at 10^9 CFU/g was determined after an infection challenge with *V. parahaemolyticus* (PV group). The PV group showed a higher survival rate than the infection-challenged group that received the commercial diet without probiotic (CV group), with the difference being 40% on day 10 post-infection. After 10 days-post challenge, the percent of survival rate reached a plateau (Fig. 3).

Immune-related gene expression. To investigate the effects of experimental diet on the immunity of *L. vannamei*, immune-related gene expression in the hemocytes was studied. Three immune-related genes (*proPO*, *LvToll*, and *TGase*) were significantly upregulated in the probiotic treatment group compared to the control group (Fig. 4). In addition, Fig. 5 shows that after 48 h of *V. parahaemolyticus* challenge, the expression levels of *proPO*, *Lvtoll,* and *TGase* in probiotic feeding group were higher than that of the control group (commercial diet + vibrio).

Digestive enzymes	Control	Probiotic
Trypsin (U mg protein^{-1})	0.89 ± 0.18	1.66 ± 0.46*
Chymotrypsin (mU mg protein^{-1})	10.94 ± 2.91	13.84 ± 5.29
Activity ratio of trypsin to chymotrypsin (T/C ratio)	69.70 ± 19.68	148.26 ± 54.71
Amylase (U mg protein^{-1})	780.09 ± 94.37	1660.92 ± 435.10*
Cellulase (U mg protein^{-1})	13.37 ± 1.75	15.71 ± 2.15
Lipase (U mg protein^{-1})	392.20 ± 118.68	1117.16 ± 172.33*
Total protein	11.04 ± 1.30	18.98 ± 4.39*

Table 5. Activity of digestive enzymes in the GIT of *L. vannamei* after the feeding experiment. Asterisks show a significant difference between groups ($p < 0.05$).

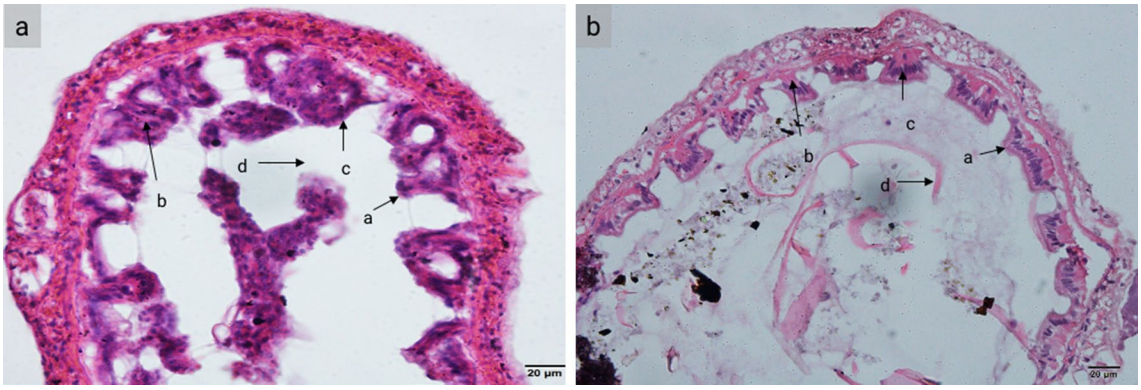


Figure 2. Histological sections of shrimp intestinal tissue (×400). Shrimp had received (**a**) a diet supplemented with *P. pentosaceus* MR001 and (**b**) a basal diet. Abbreviations: a, brush border; b, epithelium; c, nuclei and d, lumen.

Muscular layer	Diets	
	No Probiotic	Probiotic
Thickness (µm)	25.18 ± 2.04	42.55 ± 7.46*
Villi height (µm)	21.48 ± 1.81	49.12 ± 6.81*

Table 6. Intestinal histology of shrimp fed a diet supplement with the MR001 probiotic for 3 weeks. Asterisks show a significant difference between groups ($p < 0.05$).

เอกสารฉบับนี้ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร ... 19/06/2024
โดย ธนพล ศรีเพชร ID5909G58
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยของ (TNRR)

Genome features of *P. pentosaceus* MR001. The genome of *P. pentosaceus* was sequenced using a hybrid next-generation sequencing (NGS) platform (Illumina Hiseq 2500 and PacBio RS II). De novo assembly generated a single complete genome. The full genome of *P. pentosaceus* MR001 consists of 1,804,896 nucleotides in one contig. The complete genome sequence then was annotated with the Rapid Annotations using Subsystem Technology (RAST) server version 2.0. The GC content of MR001 was 37.2%. In the main chromosome, 1,789 protein-coding genes were predicted. These genes were identified in 280 subsystems (Fig. 6a). This MR001 genome has 51 tRNAs and 15 rRNAs. Unlike *P. pentosaceus* wikim20 which had three circular plasmids, *P. pentosaceus* MR001 did not have any circular ones. The properties of the genome are shown in Table 7. *P. pentosaceus* MR001 was highly conserved when compared with *P. pentosaceus* ATCC25745, SRCM100194, and wikim20 (99% identity with 85–87% query coverage) (Supporting Table 2).

Comparative genome analysis. A comparative genomics assay of MR001 with the three closest organisms revealed five unique regions that might produce their specific probiotic activity (Fig. 6b). Thirty three proteins encoded by *P. pentosaceus* MR001 genes were not detected or had sequence similarities of less than 50% in the comparative analysis with the three known strains, *P. pentosa*ceus ATCC25745, SRCM100194 and wikim20. Among these proteins, 239 hypothetical proteins with no clear functions were not further analyzed; the other 33 proteins are listed in Supporting Table 3.

We also identified orthologous proteins among the strains closest to *P. pentosaceus* MR001. Using a reciprocal all versus all BLAST search against ATCC25745, SRCM100194 and wikim20, we found that 1512 proteins formed the core set among these species. Based on the prediction of orthologous proteins, a four-set Venn diagram of the pan-genome among the species was included in Fig. 6c. *P. pentosaceus* MR001 contained a relatively higher

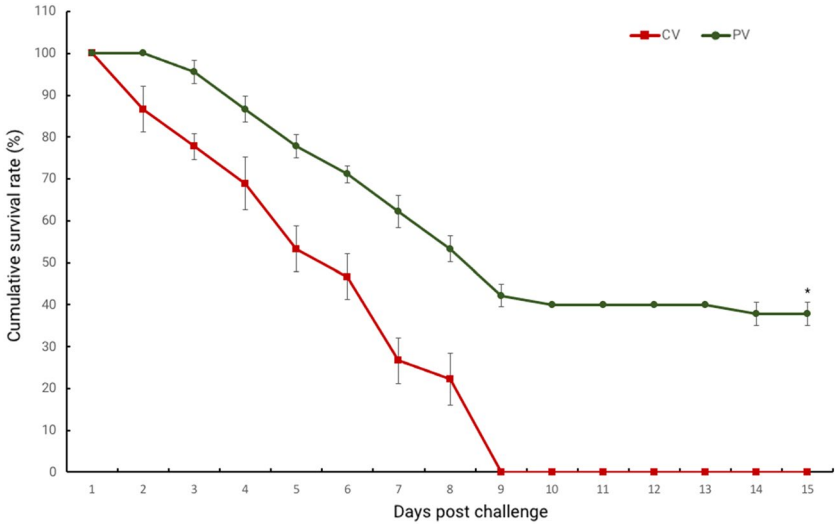


Figure 3. The survival rate of *P. pentosaceus* MR001-treated *L. vannamei* challenged with *V. parahaemolyticus*. Error bars indicate standard deviations (n = 3). Asterisks indicate significant difference comparisons ($p < 0.05$).

number of 186 unique proteins than other species. The unique proteins were identified using BLASTP search against NR databases.

Phylogenetic tree. A neighbor-joining tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain MR001 showed the phylogenetic relationships among the species of the genus *Pediococcus*. *P. pentosaceus* formed a distinct branch separate from the groups of other members of the genus (Fig. 7a). Sequence analyses of *pheS*, *recA*, *tuF* and *gryA* housekeeping genes were carried out to definitively identify MR001, *P. pentosaceus* wikim20, *P. pentosaceus* SRCM100194 and *P. pentosaceus* SRCM100892. The results showed that the combination of the above housekeeping genes provided good phylogenetic relationships among the four strains. *P. pentosaceus* wikim20 was the closest evolutionary relative of strain MR001 (Fig. 7b).

Genome analysis of *P. pentosaceus* MR001 exhibit as probiotic. We performed genomic data analysis to obtain a comprehensive view of relevant probiotic potency for the ability of probiotic strains in shrimp aquaculture. In *P. pentosaceus* MR001, we found that sortase A which recognizes the LPXTG motif in bacterial cell wall protein and catalyzes a cell wall sorting reaction and may play an important role in cell wall adherence.

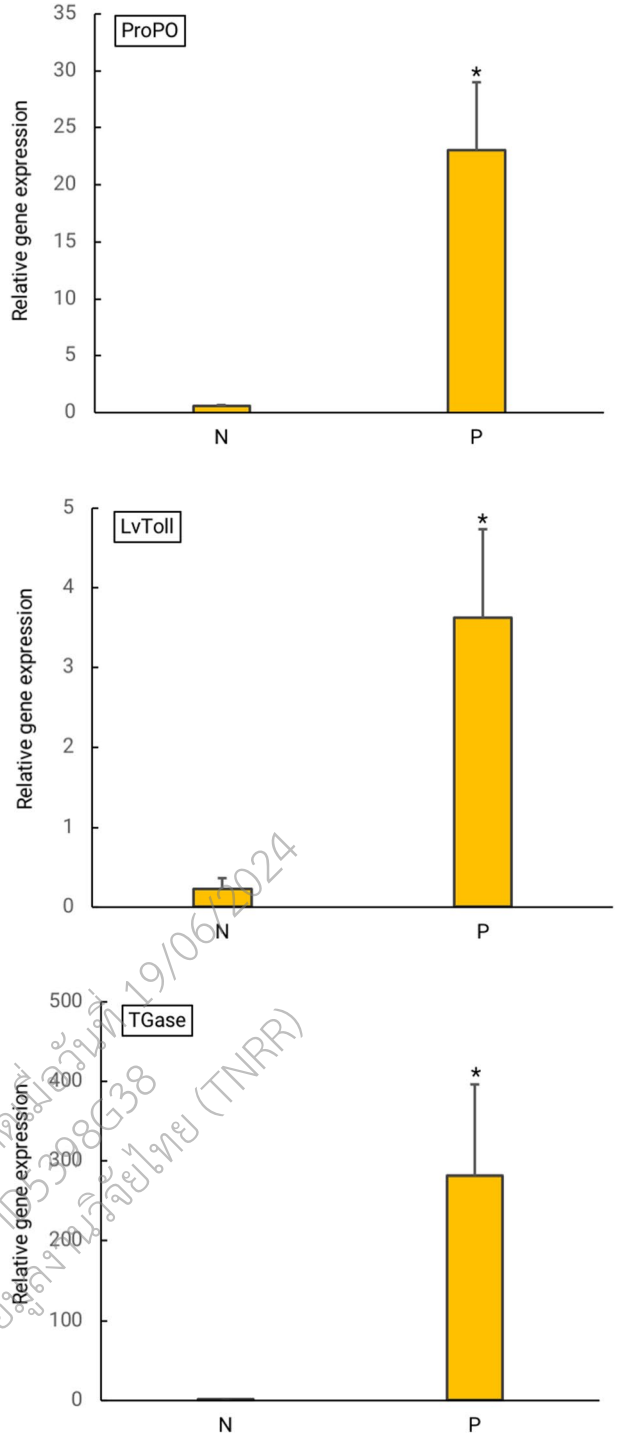
In addition, *P. pentosaceus* MR001 has a gene that encodes choloylglycine hydrolase—an enzyme that participates in bile acid synthesis and gives microorganisms a bile salt resistance property. The existence of this gene is normally used as one of the criteria for probiotic strain selection. The *P. pentosaceus* MR001 genome also carried various coding proteins, including the chaperones DnaK and DnaJ, and the heat shock protein GrpE. Also, the coding sequence linked to antibiotic and toxic compound resistance was identified.

This genome showed unique coding sequences that include (1) copper chaperone, (2) copper translocating P-type ATPase and a negative transcriptional regulator-copper transport operon for copper homeostasis, (3) DNA gyrase subunits A and B, (4) topoisomerase IV subunits A and B, 5) the efflux pump Lde for resistance to fluoroquinolones, (6) the transcriptional regulator MerR family, (7) a DNA binding heavy metal response regulator, and (8) cadmium-transporting ATPase for cobalt-zinc cadmium resistance. In addition, colicin V, a peptide antibiotic that kills sensitive cells by disrupting their membrane potentials[13,14], was found in *P. pentosaceus* MR001 strains. We also found protein-coding genes involved in oxidative stress tolerance. These include (1) ferroxidase which aids iron homeostasis, (2) the iron-binding ferritin-like antioxidant protein which can prevent DNA damage by reducing the formation of hydroxyl radicals[15], (3) the peroxide stress regulator PerR which is a ferric uptake repressor-like protein involved in adaptation to oxidative stress and iron homeostasis, and (4) glutaredoxin which catalyzes glutathione-dependent disulfide reductions[16]. Increased oxidative stress has been shown to be related to various diseases in shrimp[17]. The results suggest that *P. pentosaceus* MR001 might effective at protecting cells against oxidative stress.

Bacteriocin identification. In the preliminary investigation, *P. pentosaceus* MR001 exhibits an antagonist activity against *Vibrio* spp. We analyzed bacteriocins from the *P. pentosaceus* genome by performing a BLAST search against the bacteriocin database of Lactobacilli. The BLASTX parameters used for the identification included an E-value cutoff-point at 1e−4, and identity percentage at 30%. From the results, entrolysin A belonging to class III bacteriocin was identified with 54.84% identity (E-value = 2e−17).

Gene expression of *sortase A* and *entrolysin A*. For determining the *sortase A* and *entrolysin A* gene were transcribed in *P. pentosaceus* MR001, We analyzed the transcription of these two genes by RT-PCR. We found that the full length of *sortase A* is 690 bp. This sequences is 98–100% identity with sortase A from *P.*

เอกสารนี้เป็นสำเนาวิทยานิพนธ์ที่ได้รับการเผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ
โดย ธนพล ศรีเพชร ID 6170155 เมื่อ 19/08/2021
จากระบบคลังข้อมูลวิทยานิพนธ์ (CUIR)



เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนดล ศรีเพชร ID 6598G38 จากระบบคลังข้อสอบกลางแห่งประเทศไทย (TNRR) 19/06/2024

Figure 4. The relative expression levels of three immune-related genes (*proPO*, *LvToll* and *TGase*) between the probiotic treatment group (P) and the control group (N). Error bars indicate standard deviations (n = 3). Asterisks show a significant differences between the control group and probiotic treatment group ($p < 0.05$).

pentosaceus isolated from other organisms and approximately 75–58% with *P. acidilactici*. Whereas a partial of *entrolysin A* gene was amplified and sequenced (Supporting Fig. 2). The sequence length of *entrolysin A* is 246 bp.

Discussion

The development of non-antibiotic and environmentally friendly agents is a key factor for health management in aquaculture[1]. The application of probiotics in shrimp's diet is beneficial to growth, immune response, and disease resistance. In this study, the genome analysis of *P. pentosaceus* MR001were performed to confirm the probiotic and antibiotic properties of the strain.

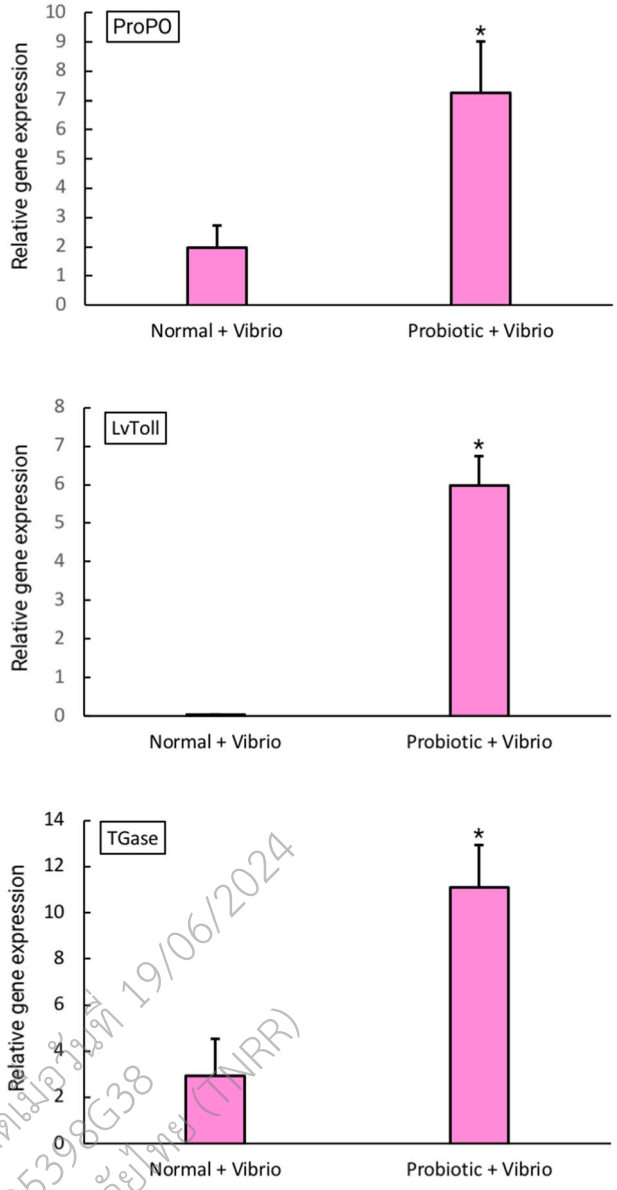
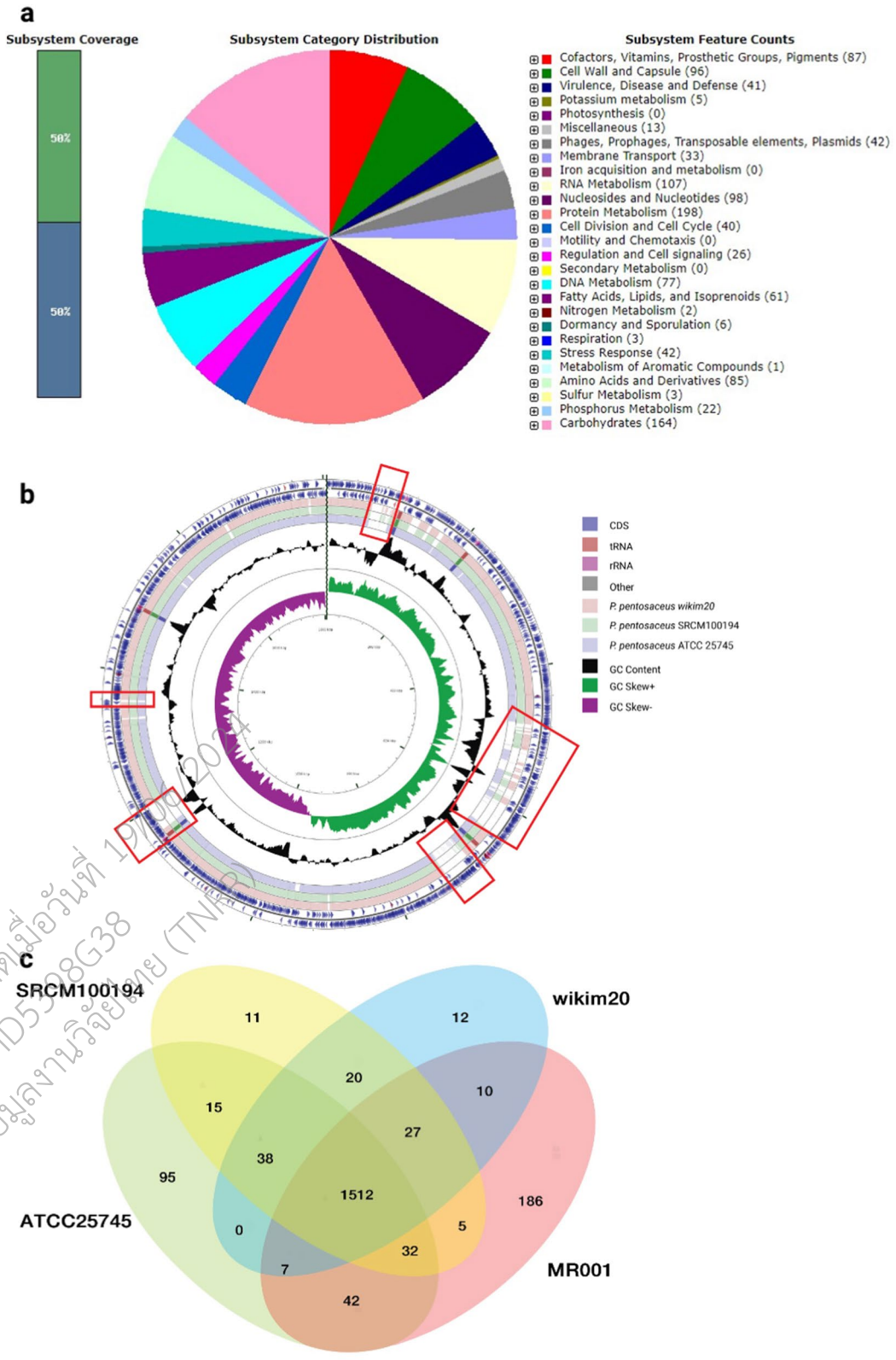


Figure 5. The relative expression levels of the three immune-related genes including *proPO*, *LvToll* and *TGase* from shrimp fed a diet supplemented with MR001 and challenged with *V. parahaemolyticus*. Error bars indicate standard deviations (n = 3). Asterisks show a significant differences between the control group (normal + vibrio) and probiotic treatment group (probiotic + vibrio) ($p < 0.05$).

เอกสารฉบับนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลวิจัยไทย (TNRR)

Growth performance is an important factor in shrimp aquaculture. We show that dietary supplementation with *P. pentosaceus* MR001 significantly improved the weight gain and growth rate of *L.vannamei*. Compared to the control group, the lower value of FCR observed in the group that received an MR001-supplemented diet suggests that *P. pentosaceus* MR001 could improve the feed utilization and growth performance of shrimp. Our findings are consistent with other studies that probiotic supplementation significantly increased growth performance and nutritional utilization in shrimp[18–21].

The enhanced growth performance of shrimp in this work might have been due to increased digestive enzyme activity induced by *P. pentosaceus*. The shrimp digestive system is activated particularly in the larval and early post-larval stages when the probiotics would have the greatest effect[22]. The digestive enzyme activities of shrimp are important indicators of the organism's ability to metabolize given nutrients. Trypsin amylase and lipase activity were significantly increased in the probiotic group compared with the control group ($p < 0.05$). A few studies of shrimp supplemented with probiotic *Pediococcus* spp.[18,23] demonstrated similar responses to our results. The higher level of enzyme activity obtained with diets containing probiotics may help to improve the digestion of protein, starch and fat, which might in turn explain the better growth observed in the probiotic-supplemented shrimp. Carbohydrate and protein macronutrients can influence the activities of digestive enzyme, especially trypsin, in shrimp[24]. Therefore, the specific activity of trypsin and the T/C ratio have been used as indicators for



เอกสารฉบับนี้ได้รับการนำเสนอเมื่อวันที่ 10 ม.ค. 2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5308G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Figure 6. The annotation and comparison of *P. pentosaceus* MR001: (**a**) The distribution of the genes associated with the 25 COG functional categories/subsystems. (**b**) Comparative genomics against top 3 most closely related organisms. (**c**) A Venn diagram showing numbers of genes in common among the four species.

Attribute	Value
Size (bp)	1,804,896
GC content (%)	37.2
L50	1
Number of Contigs	1
Number of Subsystems	280
Number of Coding Sequences	1789
Number of rRNA	15
Number of tRNA	51

Table 7. Genomic nucleotide content and gene counts of *P. pentosaceus* MR001.

growth and feed conversion efficiency in aquatic animals[25]. In this study, the T/C ratio appeared to be higher in the groups that received probiotic diets, although insignificant. It is possible that the T/C indicator would have shown significant differences either in larger treatment groups or with prolonged treatment[25]. Suggested by Won et al.[18], improved growth performance through probiotic supplementation may be due to enhanced gastrointestinal performance[26,27] and immune response[28,29].

The intestine, regarded as the digestion and absorption center, produces the most sensitive tissue response to environmental stress in aquatic animals[30,31]. In this study, the intestine epithelium height increased in the probiotic feeding group. Increased height and/or density of intestinal epithelial cell microvilli and enterocytes has been demonstrated to provide a vast absorptive surface area and nutrient absorptive ability[31,32].

The crustacean immune system eliminates pathogens very efficiently through humoral and cellular immune processes. The shrimp immune system works without a memory basis by activating a response using hemocytes that attack foreign cells during infection[33]. Immunostimulation is an alternative strategy and a vital method of alerting a shrimp's defense system to increase resistance to various pathogens. It also indirectly enhances growth performance[19,31]. In this study, the expression of three immune-related genes was investigated using real-time PCR in order to evaluate the immune status of shrimp after supplementation with probiotics. The relative expression levels of the immune genes *proPO*, *LvToll* and *TGase* in hemocytes were significantly higher in *P. pentosaceus* MR001-supplemented shrimp than in control shrimp ($p < 0.05$).

proPO enzyme is a key component of the prophenoloxidase-activating system which plays an important role in the invertebrate immune system. Active proPO induces the oxidation of phenol to quinone and prompts the production of melanin, allowing a rapid response to pathogen infection. The upregulation of *proPO* in the probiotic feeding group may have enhanced resistance against pathogens. Similar results were found in other studies where greater upregulation of *proPO* was detected when pathogen-challenged shrimp were fed with probiotic diets[18,29].

The Toll-like receptor (TLR) family is a highly conserved group of proteins that participate in innate immune responses[34]. In shrimp, Toll receptors are important pathogen recognition receptors (PRRs), playing a vital role in defending against viral and bacterial challenge[35]. From this study, we inferred that upregulation of *LvToll* receptor genes may increase pathogen recognition and increase disease response. A similar result was found in *L. vannamei* given mixed *Bacillus* spp.[36].

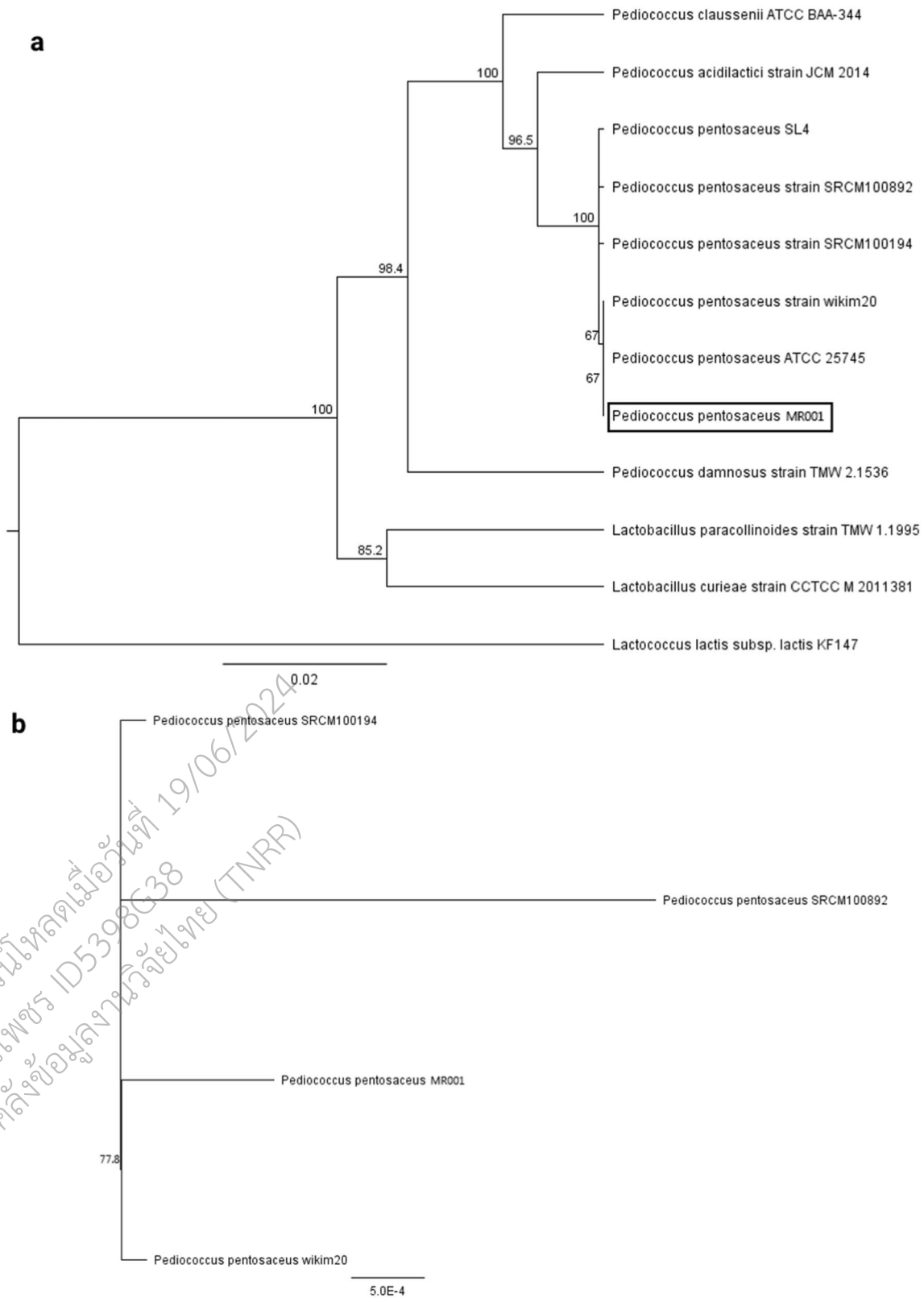
The enzyme transglutaminase (TGase) is known to be involved in blood coagulation, a conserved defense mechanism among invertebrates[37]. In shrimp, an effective and efficient blood coagulation system increases the chances of survival, particularly in cases of injury[38]. Fagutao et al.[38], reported that the absence of TGase rendered shrimp susceptible to both bacterial and viral infections, suggesting that TGase is an essential component of the immune system of shrimp.

It has been known that *V. parahaemolyticus* infection causes serious disease in *L. vannamei*. Our results show that shrimp treated with *P. pentosaceus* MR001 exhibited stronger disease resistance against *V. parahaemolyticus* than those in the control group. As noted in previous reports[10,18], the mortality rate of shrimp infected with *Vibrio* spp. was lower in the *P. pentosaceus* treatment groups than in the control groups. In agreement with gene expression analysis, the relative expression levels of the immune-related genes (*proPO*, *LvToll* and *Tgase*) in hemocytes were also significantly upregulated in *P. pentosaceus* MR001-supplemented shrimp after 48 h post *V. parahaemolyticus* infection than in control group ($p < 0.05$). Our data imply that *P. pentosaceus* MR001 could enhance systemic innate immunity during the *Vibrio* challenge by stimulating immune gene production.

The genomic data analysis of *P. pentosaceus* strains showed a genome size and GC content of 1.8 Mbp and 37.2%, respectively. A total of 1789 sequences were assigned to putative functions, and the remainder could be classified as hypothetical proteins. Many of these functional proteins were potentially related to probiotic properties.

The ability to adhere to the gastrointestinal tract/mucosa is an important property of most probiotics[39,40]. In vitro analysis, MR001 showed strong auto-aggregative ability and high hydrophobicity (> 80%). Probiotic bacteria, especially LAB with aggregation ability and hydrophobic cell surface are more capable of adhering to intestinal epithelium[41]. Additionally, MR001 possessed strong co-aggregation with both shrimp pathogenes. The co-aggregation ability could play a significant role in inhibiting the growth of pathogenic strains in the GIT and can help prevent colonization by invading foodborne pathogens[42,43].

เอกสารฉบับนี้ได้รับการคุ้มครองลิขสิทธิ์ โดย ธนพล ศรีเพชร ID 6310210015 จากระบบคลังข้อมูลวิจัย (CURR)



เอกสารฉบับนี้ได้รับการโหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398638
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Figure 7. The phylogenetic tree of *P. pentosaceus* MR001 and its related species. (**a**) The multiple alignment of the 16S rRNA nucleotides was generated using MUSCLE. The phylogenetic tree was constructed with Geneious 9.1.2 using the neighbor-joining method with a bootstrap value of 1,000. (**b**) The phylogenetic tree highlighting the evolutionary relationships of the four strains of *P. pentosaceus* was based on concatenated nucleotide sequences of the *pheS*, *recA*, *tuF* and *gryA* genes (approximately 5800 bp).

Sortase A is one of the proteins encoded by *P. pentosaceus* MR001 and predicted to influence the adhesive potential of *P. pentosaceus*. Sortase A recognizes the sequence motif LPXTG in the cell wall proteins[44]. This protein has also been found in other probiotic bacteria such as *Lactobacillus plantarum*[45] *Lactobacillus rhamnosus*[46] and *Bifidobacterium bifidum*[47]. The genomes of most Gram-positive bacteria encoded two or more sortase enzymes in order to fulfilled different functions[44].

Upon ingestion by the host and during transit through the gastrointestinal tract (GIT), probiotics encounter various environmental conditions. Firstly, they need to survive the harsh conditions of the stomach. Our analysis of this genome revealed bacterial responses to acid and bile, and other stress resistance mechanisms. This finding was in agreement with in vitro analysis of MR001, when it was able to tolerate a wide range of salt and bile salt concentrations and can expose the acidic condition (pH 3). Many other stressful conditions, such as oxidative stress, can also be encountered in the GIT. A number of stress proteins that regulate the adaptation of this strain to GIT stress were found in this study, in particular, the chaperones that are known to intervene in response to numerous stresses. These proteins are involved in important tasks such as protein folding, renaturation, protection of denatured proteins, and removal of damaged proteins[48]. Important molecular chaperones include DnaK, the well-known heat shock protein related to acid adaptation[49], which was found in this study. Using a microarray analysis, Pfeiler et al.[50] found that *dnaK* and *grpE* were upregulated in *L. acidophilus* NCFM after exposure to bile[50]. Heat shock proteins appear to be especially pivotal for long-term acid stress resistance.

Due to in antibacterial assay, we found that MR001 can inhibit shrimp pathogens. Thus, the bacteriocins were analysed in genome of MR001. Bacteriocins are a group of potent antimicrobial peptides. Most bacteria, including LAB, can produce at least one bacteriocin[51]. The production of bacteriocins depends on the microbial strain and culture condition[52]. Some bacteriocins are used as alternatives to antibiotics and were deployed in the food industry and medicine[53–55]. In this study, entrolysin A, a type III bacteriocin, was found in genome by in silico analysis. Entrolysin A is a cell wall-degrading bacteriocin first reported to be produced by *Enterococcus faecalis* isolated from fish[56]. It can inhibit the growth of various Gram-positive bacteria such as enterococci, pediococci, and lactococci. Our findings are in agreement with that of Jiang et al.[57], who comparatively studied the genomes of 65 *P. pentosaceus* strains isolated from food, humans, and animals. They found four kinds of bacteriocins in these strains; two of which, enterolysin A and Bac, had not been previously reported in this species.

In this study, entrolysin A was amplified to confirm that it is transcribed in the MR001 strain. However, just a small part of this gene could be amplified. This phenomenon may have been caused by the integration of some mobile DNA such as prophages, mobile genetic elements, and insertion elements. In the comparative genome analysis, among 33 proteins, two insertion sequences (IS) were found (IS6 and IS1182), revealing the mechanism of MR001 adaptation for survival via integration of these elements to its genome[58]. Additionally, four sugar transport proteins were detected only in MR001; three were PTS system fructose-specific EIIABC components (FruA) and one a PTS system oligo-beta mannoside-specific EIIC component (gmuC). In bacteria, to carry out its catalytic function in sugar transport and phosphorylation, the phosphotransferase system (PTS) uses the phosphoenolpyruvate (PEP) as an energy source and phosphoryl donor. The phosphoryl group of PEP is usually transferred via four distinct proteins to the transported sugar that is bound to the respective membrane components of the PTS[59]. In general the regulatory roles of protein components of the PTS for the control of carbohydrate metabolism have been reported. Notably, the PTS also fulfils numerous roles in the regulation of biofilm formation, stress response, gut colonization, chemotaxis, and virulence[60–64]. Various types of sugar transport systems may designed to specific probiotic-prebiotic in the future.

Conclusion

This study showed that the use of *P. pentosaceus* MR001 as a dietary probiotic for the white shrimp, *L. vannamei*, significantly improved growth performance, feed utilization, digestive enzyme activities, and disease resistance against vibriosis. A probiotic supplement of *P. pentosaceus* MR001 at 10^9 CFU/g in the diet of white shrimp is recommended. Our elucidation of the genome sequence of *P. pentosaceus* MR001 allows for a deeper understanding of the strain's probiotic potential, facilitating the future development of food additives for marine aquaculture.

Materials and methods

Candidate probiotic isolation. Guts of 3 animals were removed from *Macrobrachium rosenbergii*. Each gut was dissected aseptically and homogenized in an eppendorf tube with 200 µL of sterile saline solution with 0.85% NaCl. Homogenates were serially diluted (10^{-1}–10^{-5}) with 0.85% NaCl, and 1 mL of diluted homogenate was poured on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar plates and incubated at 30 °C for 24 h. All isolates were examined against *V. harveyi* using the agar well diffusion assay to test the antagonistic ability using method below. Colonies producing inhibition zones were isolated and future tested for the hydrophobicity using the microbial adhesion to solvents (*p*-xylene) following with slight modification was used to determine cell surface properties[43]. The isolates that showed the highest antibacterial activity against pathogenic *V. harveyi* and high hydrophobicity were characterized by Gram staining and catalase test.

Total DNA of isolate was extracted from a colony using a PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amplification of 16S ribosomal DNA was performed by single PCR using the universal primers 27f. and 1492r (Supporting Table 4).

In vitro characterization of *P. pentosaceus* MR001. *Antibacterial activity.* The isolates were re-examined against *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* using the agar well diffusion assay to confirm the antagonistic ability. All isolates were grown in MRS broth at 30 °C for 24 h. After incubation, the supernatant was collected by centrifugation (10,000 rpm; 1 min) and re-suspended into 100 µl of MRS medium. The target Vibrio strains were grown overnight in 10 ml of Trypticase Soy Broth (TSB) at 30 °C, and 1 ml (10^8 CFU/mL) of each Vibrio was

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดมาจากระบบคลังข้อมูลวิจัย (NRIIS) โดย ธนพล ศรีเพชร เมื่อวันที่ 30/12/2024 จากระบบคลังข้อมูลวิจัย (NRIIS)

mixed with 20 ml of melted TSA supplemented with 2% NaCl. Wells (6 mm) were then punched into the agar and 100 µl of isolates supernatants were added. Plates were incubated at 30 °C and observed for clearing zones around the wells after 24 h. Sterile MRS broth was used as the negative control and 100 µg/ml of tretacycline was used as the positive control (P).

Acid resistance. Isolated strains were cultivated in MRS broth until the OD600 reached 1.2. One ml of culture was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4 °C and cell pellet was resuspended in MRS broth where the pH was adjusted to 3 and 7 (control), respectively, by 1 N HCl. Cell suspensions were incubated for 3 h at 37 °C and then viable cells were counted by standard plate counting. Measurements were done in triplicates and the mean values were shown.

Bile and NaCl tolerance. The bile tolerance of *Pediococcus pentosaceus* was determined using a modified version of a previously method[65]. Briefly, bile salt tolerance test was determined by inoculating *P. pentosaceus* MR001 into various MRS broth containing 0.6%, 0.8% and 1.0% bile salts (Sigma-Aldrich). The suspension was incubated for 6 h at 30°C. After incubation, the suspensions were serially diluted in sterile PBS. 100 µL of the suspension was flooded in MRS agar with triplicate and incubated for 24–48 h at 37°C and the viable colony that appears was counted using colony counter.

To determine NaCl tolerance, *P. pentosaceus* MR001 was grown in MRS broth supplemented with different concentrations of NaCl (1–6%). 0.1 mL of overnight culture was inoculated into 10 mL of MRS broth with various percentage of NaCl. After 3 h of incubation at 37 °C, MR001 was sub-cultured in MRS agar and was incubated at 37 °C for 24 to 48 h. The NaCl tolerance of MR001 was calculated by counting viable cells on plates.

Auto-aggregation and co-aggregation assay. The specific cell–cell interactions were determined using auto-aggregation assay[66] and co-aggregation assay[65] with slightly modified methods. *P. pentosaceus* was cultured at 30 °C for 20 h in MRS medium. The bacterial cells were harvested at 5000 g for 10 min at room temperature, washed with PBS and resuspended in PBS to 10^8 CFU/ml. For the auto-aggregation assay, 4 ml of each bacterial suspension were vortexed for 10 s and incubated at 37 °C for 2 h, 6 h and 24 h. The absorbance of the supernatant was measured at 600 nm. The auto-aggregation percentage was expressed as: $1 - (A_t/A_0) \times 100$, where A_0 represents the absorbance at t = 0, and A_t represents the absorbance at incubation time.

For the co-aggregation assay, *Vibrio spp.* were cultured in TSA medium + 1.5%NaCl at 37 °C for 16 h. Equal volumes of cell suspensions (10^8 CFU/ml) were mixed, vortexed for 10 s and incubated at 30 °C and 37 °C for 4 h without agitation. The absorbance (A 600 nm) of the mixture was determined during incubation at 2 h, 6 h and 24 h. The percentage of co-aggregation was calculated following the formula $[(A_{vibio} + A_{pediococcus})/2 - (A_{mix})/(A_{vibio} + A_{pediococcus})/2] \times 100$, where A_{vibio} and $A_{pediococcus}$ represent the A600 of individual bacterial suspensions and A_{mix} represents the absorbance of their mixture after incubation for different times.

Samples for feeding experiments. Healthy specimens of *L. vannamei* were provided by Kanjana Farm in Nakhon Si Thammarat province, Thailand. They were placed in an indoor cement pond and cultured for one week in filtered, aerated seawater (salinity 30%, pH 8.5). Shrimp (average weight 4–5 g) were selected for experiment and randomly divided into four groups with three replicates for growth rate experiments and two groups with three replicates for survival rate experiments.

Preparation of shrimp feed supplemented with *P. pentosaceus* MR001. *P. pentosaceus* MR001 was cultured and incubated at 30°C for 20 h in MRS broth (HIMEDIA) on a shaker at 200 rpm to a final concentration of about 10^{10} CFU/ml. The probiotic was harvested by centrifugation and washed twice with sterile saline and mixed with commercial shrimp feed in the ratio of 1 ml of probiotic to 1 g of shrimp feed. The probiotic concentrations of the final suspensions in the commercial feed were 1×10^7, 10^8 and 10^9 CFU/g. After feed preparation, MR001 concentrations in the diet were confirmed by a plating technique in which a sample of each feed was serially diluted in MRS broth. New batches of feed were produced every week to keep up *P. pentosaceus* MR001 viability.

Determination of *L. vannamei* growth rate. The shrimp were divided into four treatment groups (three tanks per treatment, 15 shrimp per tank). All shrimp in each tank were initially fed twice a day, each time with a diet weighing 10% of their total body weight. At the beginning of the experiment, five specimens were randomly collected from each group to measure their initial body weight (W_0). After three weeks of treatment with the probiotic supplement, five specimens were selected at random from each group to measure their final body weight (Wt). The weight gain rate of each group was calculated following the formula [Weight gain $(\%) = 100 \times (Wt - W_0)/W_0$]. Other biological performance criteria such as specific growth rate (SRG), feed efficiency, and feed convention ration (FCR) were also determined.

Determination of intestinal digestive enzyme activity. Sampling was conducted at day 14 of probiotic supplementation. Five shrimp were randomly selected from each group. Shrimp gastrointestinal tracts were removed and homogenized in ice-cold deionized water (1:3) using a micro-homogenizer. The homogenate was centrifuged at 15,000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant was kept at -20 ℃ until used. Total protein was evaluated using a BSA standard curve as described by Lowry et al.[67]. The activity of the total protein was measured by a spectrophotometer at 750 nm. Trypsin and chymotrypsin were determined based on the method of Rungruangsak–Torrissen et al.[68]. The enzymes were incubated at 50 ℃ for 10 min by methods developed by Gam-

เอกสารฉบับนี้ได้รับการนำเข้าสู่ระบบคลังข้อมูลวิจัยจากระบบ IR ของ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ โดย ธนพล ศรีเพชร (19/06/2021 09:08:08)

boa-Delgado et al.[24]. The activity of these two enzymes was measured spectrophotometrically at 410 nm, and the comparison was made with the linear response concentration range of a p-nitroanilide standard. Amylase[69] and cellulase[70] activity were determined using a starch solution and carboxymethylcellulose (CMC) as respective substrates, respectively. The optimal condition of incubation was 55 ℃ for 10 min, following the method of Xue et al.[70]. Both enzymes were then evaluated spectrophotometrically at 540 nm and compared with maltose and glucose standard curves, respectively. Lipase activity was measured in triplicate by the method of Stuckmann & Winker[71]. Lipase was detected spectrophotometrically at 410 nm based on the cleavage of p-nitrophenyl palmitate (p-NPP; Sigma). The optimal condition used was at pH 8 and 60 ℃.

Intestinal Histology. Shrimp intestinal tissue was fixed in 4% neutral buffered formaldehyde and then dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin. Tissue blocks were sectioned 4 µm thick and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Villi heights were then evaluated and observed under a light microscope. At least 5 fields were observed in each samples.

Survivability test. To determine the effect of *P. pentosaceus* MR001 on the survival rate of *L. vannamei* post-larvae, the shrimp were divided into two groups (control group and probiotic group; 15 shrimp per group). At the end of the three-week feeding trial, shrimp fed with MR001 supplemented and non-supplemented diets were exposed to pathogenic *V. parahaemolyticus* at a level of 10^5 CFU/ml (LD50) by adding the bacteria to the water for 24 h. During the first 24 h post-infection, water was not renewed to ensure the infection. All groups were fed a basal diet and kept under observation for 10 days. At the end of the feeding trial, post-larvae survival rates and the numbers of dead shrimp per each replicate were calculated and recorded. The survival rate (SR) of each group was calculated as SR (%) = [final number/initial number] × 100.

Immune-related gene expression analysis. At the end of three week feeding trial, five shrimp per experimental diet from each tank were collected (3 tanks per experimental diet) for RNA extraction. In addition, to determine immune-gene expression after pathogen infection, shrimp feeding with each diet were injected with *V. parahaemolyticus*. Then 24 h after *V. parahaemolyticus* challenge, shrimp were sampled for determination of immune-related genes expression. RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) following the standard protocol and RNA with an absorbance ratios (A260/A280) greater than 1.8 was used for the next step in which cDNA was synthesized from 1 µg RNA with a Viva cDNA Synthesis Kit (Vivantis Technologies Sdn. Bhd.). The transcriptional expression levels of *proPO*, *LvToll* and *TGase* genes were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) using the SensiFAST SYBR NO-ROX kit in accordance with the manufacturer's protocol (Bioline). RT-qPCR was performed in the following order: denaturation at 95 ℃ for 5 min and then 40 cycles of 95 ℃ for 30 s, 55–58 ℃ (depending on each primer) for 30 s, and 72 ℃ for 30 s. A dissociation curve analysis was performed at the end of qPCR to confirm the specificity of the PCR products. The *EF1* gene of *L. vannamei* was used as an internal control to verify the successful reverse transcription and to calibrate cDNA template. Primer sequences were presented in Supporting Table 4.

Statistical analysis. The data were analyzed using IBM SPSS version 24. One-way analysis of variance was used to determine significant variations between the treatments. The differences between means were evaluated and compared by post hoc multiple comparison test (Least Significant Difference, LSD). All results were regarded as significant when $p < 0.05$. Data were reported as means ± standard deviations.

Genomic DNA isolation and genome sequencing. DNA extraction was performed with a PureLink genomic DNA mini kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. The isolated DNA concentration was quantified using the Qubit fluorometer (Life Technologies, USA). DNA integrity was checked using gel electrophoresis in1% agarose gel. NGS of genomic DNA from *P. pentosaceus* MR001 was conducted using the TruSeq DNA PCR-Free kit library on the HiSeq 2500 platform. Total read bases were 973.6 Mbp with 9,639,394 total reads. The GC content was 37.05%, and Q30 was 92.91%. After filtering, the total number of bases, reads, GC (%) and Q30 (%) were 853.7 Mbp, 8,568,054 reads, 37.01% and 97.84%, respectively. Third-generation DNA sequencing was performed with the PacBio RS II technology using a PacBio P6C4 chemistry sequencing kit. One single-molecule real-time (SMRT) cell yielded 128,058 subreads (1,123,882,312 bp) with an average read length of approximately 8.76 kbp.

Genome assembly. We used the software called Canu to assembly high-noise single-molecule sequencing from PACBIO. The default parameter of the software was set to use with the *P. pentosaceus* MR001 with setting the genome size around 2 Mbp. The first result from the software returned 1,836,985 on genome size and 37.2%GC. There is no sign of any plasmid in this strain. Then, we use the Circlator to identify and trim overhangs and orients the start position at an appropriate gene by using assembly contigs and the corrected reads prepared by Canu version 2.1[72] with default parameters of the software. The contig length was trimmed to 1,804,890 bp. Finally, we corrected the PACBIO assembly with Illumina reads. The Illumina reads were aligned to the draft assembly using BWA[73], BWA-mem , and SAMTOOLS version 1.7[74] Then, Pilon version 1.24[75] was used to automatically improve draft assemblies and find variation among strains, including large event detection. The result was still the same result from circularization. There was no any change in the result. The assembly workflow is illustrated in Fig. 8.

เอกสารฉบับนี้ได้รับการตรวจสอบความถูกต้องโดย ธนดล ศรีเพชร เมื่อวันที่ 19/06/2564 จากระบบคลังข้อมูลวิจัยและนวัตกรรม (UNIR)

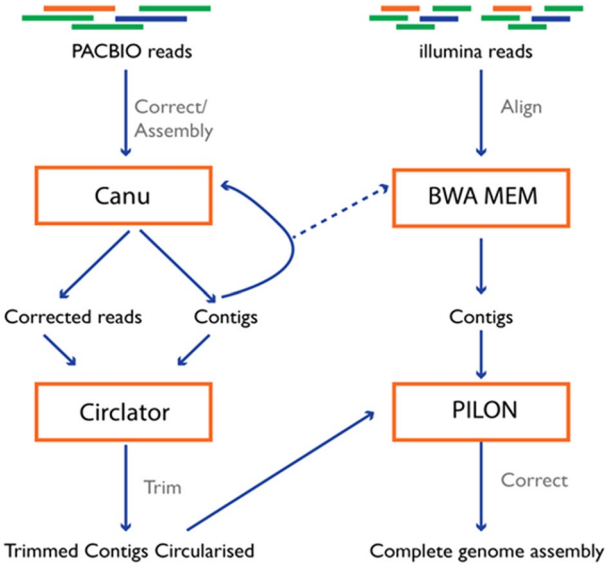


Figure 8. Genome Assembly Workflow.

Genome annotation. Glimmer 3[76] and Genemark software[77–79] were used to identify genes in the genome. Functional annotation was achieved using RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology)[80,81]. tRNA was predicted by tRNAscan-SE 1.21[82–84] and rRNA genes were predicted by RNAmmer 1.2[85]. All the predicted proteins were used in the BLASTP search against the NCBI non-redundant (nr) protein database to find homologs. Prophage regions were predicted using the PHAge Search Tool (PHAST) webserver[86]. Regions of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) were searched using the CRISPRFinder server[87].

Genome comparisons and visualization. The microbial nucleotide BLAST database was queried to find the closest relatives of *P. pentosaceus* MR001 for comparison. *P. pentosaceus* wikim20 (NZ_CP015918.1), *P. pentosaceus* SRCM100194 (NZ_CP021927.1), *P. pentosaceus* ATCC 25,745 (NC_008525.1), *P. pentosaceus* SL4 (NC_022780.1), and *P. pentosaceus* SRCM100892 (NZ_CP021474.1) were the top five BLAST hits with approximately 99% identity and very significant E-values. The similarity of MR001 to its three closest relatives was analyzed and visualized using the CGView Server, with the E-value cutoff set to 0.0001 and the identity cutoff set to 30%, based on the BLASTX comparison. The circular representation of the chromosome of *P. pentosaceus* was produced using the CGView Server V1.0[88]. Subsystem mapping was produced by RAST version 2.0[80,81]. In addition, a circular representation of the plasmids was drawn using Geneious 9.1.2[89].

Bacteriocin identification. Bacteriocin identification was analyzed following the procedure of Surachat et al., 2017[90]. The nucleotide sequence of *P. pentosaceus* was first screened against the *BACTERIOCINS* database using BLASTX. The preliminary screening result was then generated and used as the target of a search for similar protein sequences from *Lactobacilli* in the NCBI and UniProt databases. After removing data redundancy, the local database was then created. Finally, the preliminary result from the first BLAST was used as query sequences to search against the newly created database using BLASTX with the E-value set sequence and confirmed as a bacteriocin in *P. pentosaceus.* We identified the bacteriocin using the Bagel4 server. We also used the Bagel database[91] (Class I, II, III) in the BLAST analysis to identify antimicrobial proteins. The *P. pentosaceus* MR001 sequence was then used in a BLASTX search with the E-value and %identity cutoff set to 10^{-4} and 30%.

Phylogenetic tree analysis. 16S rRNA sequences (approximately 1,580 bp) were obtained from the following 11 species: *P. pentosaceus* ATCC 25,745, *P. pentosaceus* SL4, *P. pentosaceus* SRCM100194, *P. pentosaceus* SRCM100892, *P. pentosaceus* wikim20, *P. acidilactici* JCM 2014, *P. claussenii* ATCC BAA-344, *P. damnosus* TMW 2.1536, *L. curieae* CCTCC M 2,011,381, *L. paracollinoides* TMW 1.1995, and *Lactococcus lactis subsp. lactis KF147*. The multiple alignment of 16sRNA was generated using MUSCLE[92]. The phylogenetic tree was constructed with the Geneiuos 9.1.2[89] program using the neighbour-joining method with a bootstrap value of 1,000. The phylogenetic tree highlighting the evolutionary relationships of the four strains of *P. pentosaceus* was based on concatenated nucleotide sequences of the pheS, recA, tuF and gryA genes (approximately 5800 bp).

The amplification of *sortase A* and *entrolysin A* transcripts. *P. pentosaceus* culture (at an optical density at 600 nm of 0.5) were centrifuged at 4000 g for 10 min, and the pellet was resuspended in 1 ml of Trizol (Invitrogen). Bacteria were broken once for 30 s in the Bead Beater at maximum speed. The supernatants was then extracted with chloroform : isoamyl alcohol. Total RNA was precipitated using isopropanol. The contami-

เอกสารนี้นำมาเผยแพร่โดย ธนดล ศรีเพชร ID 5398135 เพื่อการใช้งานภายในจุฬาฯ เท่านั้น 6/6/2021

nating DNA was treated with RNase-Free DNase I (Roche). First-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using the SuperScript III First-Strand Synthesis System.

The transcripts of *sortase A* and *entrolysin A* were analysed by PCR using the each specific primers SrtA-F and SrtA-R for *sortase A* and EntA-F and EntA-R for *entrolysin A*. The thermal cycling profile used was 95 °C for 3 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, annealing for 30 s at 52 °C for sortase A and 60 °C for entrolysin A and 72 °C for 30 s. PCR products were analysed on 1.5% agarose gel.

Data availability

This Whole Genome project has been deposited in the NCBI BioProject, BioSample, and GenBank under the following respective accession numbers: PRJNA596088, SAMN13612138, and CP047081. The raw sequence PacBio and Illumina reads have been deposited in the SRA database (accession number: SRR10717635-36).

Received: 25 January 2021; Accepted: 12 August 2021
Published online: 15 September 2021

References

1. Farzanfar, A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **48**, 149–158 (2006).
2. Lakshmi, B., Viswanath, B. & Sai Gopal, D. V. R. Probiotics as Antiviral Agents in Shrimp Aquaculture. *J. Pathog.* **2013**, 1–3 (2013).
3. Sanchez Ortiz, A. C. *et al.* Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **43**, 123–136 (2015).
4. Dawood, M. A. O., Koshio, S., Abdel-Daim, M. M. & Van Doan, H. Probiotic application for sustainable aquaculture. *Rev. Aquac.* **11**, 907–924 (2019).
5. Giatsis, C. *et al.* Probiotic legacy effects on gut microbial assembly in tilapia larvae. *Sci. Rep.* **6**, 1 (2016).
6. Kumar, V., Roy, S., Meena, D. K. & Sarkar, U. K. Application of probiotics in shrimp aquaculture: Importance, mechanisms of action, and methods of administration. *Rev. Fish. Sci. Aquacult.* **24**, 342–368 (2016).
7. Zommiti, M. *et al.* In vitroassessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *pediococcus pentosaceus* MZF16 isolated from artisanal tunisian meat "dried ossban. *Front. Microbiol.* **9**, 1 (2018).
8. Martino, M. E. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penocin operon. *Antonie Van Leeuwenhoek* **103**, 1149–1163 (2013).
9. Truc, L. N. T. *et al.* Effects of feed mixed with lactic acid bacteria and carbon, nitrogen, phosphorus supplied to the water on the growth and survival rate of white leg shrimp (*penaeus vannamei*) infected with acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *vibrio parahaemolyticus*. *Biology* **10** (2021).
10. Adel, M., Yeganeh, S., Dawood, M. A. O., Safari, R. & Radhakrishnan, S. Effects of *Pediococcus pentosaceus* supplementation on growth performance, intestinal microflora and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* **23**, 1401–1409 (2017).
11. Scientific Opinion on the efficacy of Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) when used as a feed additive for fish. *EFSA Journal* **10,** (2012)
12. Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I. & Balcázar, J. L. Probiotics in aquaculture: A current assessment. *Rev. Aquac.* **6**, 133–146 (2014).
13. Havarstein, L. S., Holo, H. & Nes, I. F. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology* **140**, 2383–2389 (1994).
14. McCormick, J. K., Klaenhammer, T. R. & Stiles, M. E. Colicin V can be produced by lactic acid bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **29**, 37–41 (1999).
15. Dai, G. *et al.* A ferritin-like protein with antioxidant activity in *Ureaplasma urealyticum*. *BMC Microbiol.* **15**, 1 (2015).
16. Coppo, L., Montano, S. J., Padilla, A. C. & Holmgren, A. Determination of glutaredoxin enzyme activity and protein S-glutathionylation using fluorescent eosin-glutathione. *Anal. Biochem.* **499**, 24–33 (2016).
17. Duan, Y. *et al.* Oxidative stress response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* to *Vibrio parahaemolyticus* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **46**, 354–365 (2015).
18. Won, S. *et al.* Evaluation of potential probiotics *bacillus subtilis* WB60, *Pediococcus pentosaceus*, and *Lactococcus lactis* on growth performance, immune response, gut histology and immune-related genes in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* **8**, (2020).
19. Chai, P. C., Song, X. L., Chen, G. F., Xu, H. & Huang, J. Dietary supplementation of probiotic Bacillus PC465 isolated from the gut of *Fenneropenaeus chinensis* improves the health status and resistance of *Litopenaeus vannamei* against white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* **54**, 602–611 (2016).
20. Wang, Y. B. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* **6**, 327–332 (2007).
21. Zokaeifar, H. *et al.* Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **33**, 683–689 (2012).
22. Lovett, D. L. & Felder, D. L. Ontogenetic change in digestive enzyme activity of larval and postlarval white shrimp *Penaeus setiferus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Biol. Bull.* **178**, 144–159 (1990).
23. Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. & Chim, L. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* **28**, 622–631 (2010).
24. Gamboa-Delgado, J., Molina-Poveda, C. & Cahu, C. Digestive enzyme activity and food ingesta in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) as a function of body weight. *Aquac. Res.* **34**, 1403–1411 (2003).
25. Thongprajukaew, K. *et al.* Effects of dietary modified palm kernel meal on growth, feed utilization, radical scavenging activity, carcass composition and muscle quality in sex reversed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* **439**, 45–52 (2015).
26. Kamarudin, M. S., Jones, D. A., le Vay, L. & Abidin, A. Z. Ontogenetic change in digestive enzyme activity during larval development of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* **123**, 323–333 (1994).
27. Zhou, X. X., Wang, Y. B., & Li, W. fen. Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. *Aquaculture* **287**, 349–353 (2009).
28. Zhang, Q. *et al.* Dietary administration of Bacillus (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). *Aquac. Res.* **42**, 943–952 (2011).
29. Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M. & Cheng, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunol.* **23**, 364–377 (2007).
30. Chen, L. *et al.* Intestinal immune function, antioxidant status and tight junction proteins mRNA expression in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed riboflavin deficient diet. *Fish Shellfish Immunol.* **47**, 470–484 (2015).
31. Duan, Y. *et al.* Effect of dietary poly-β-hydroxybutyrate (PHB) on growth performance, intestinal health status and body composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Fish Shellfish Immunol.* **60**, 520–528 (2017).

เอกสารฉบับนี้ได้รับการอนุเคราะห์จาก ระบบคลังข้อมูลงานวิจัย (CU Digital Collection) โดย ธนพล ศรีเพชร ID 5230155021 เมื่อ 06/2024

32. Daniels, C. L. *et al.* Effect of dietary *Bacillus* spp. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. *Aquaculture* **304**, 49–57 (2010).
33. Martin, G. G. & Graves, B. L. Fine structure and classification of shrimp hemocytes. *J. Morphol.* **185**, 339–348 (1985).
34. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–384 (2010).
35. Wang, X. W. & Wang, J. X. Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 981–989 (2013).
36. Sánchez-Ortiz, A. C. *et al.* Effect of mixed-Bacillus spp isolated from pustulose ark *Anadara tuberculosa* on growth, survival, viral prevalence and immune-related gene expression in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* **59**, 95–102 (2016).
37. Maningas, M. B. B., Kondo, H., Hirono, I., Saito-Taki, T. & Aoki, T. Essential function of transglutaminase and clotting protein in shrimp immunity. *Mol. Immunol.* **45**, 1269–1275 (2008).
38. Fagutao, F. F., Maningas, M. B. B., Kondo, H., Aoki, T. & Hirono, I. Transglutaminase regulates immune-related genes in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* **32**, 711–715 (2012).
39. Senan, S., Prajapati, J. B. & Joshi, C. G. Whole-genome based validation of the adaptive properties of Indian origin probiotic *Lactobacillus helveticus* MTCC 5463. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 321–328 (2015).
40. Grover, S., Rashmi, H. M., Srivastava, A. K. & Batish, V. K. Probiotics for human health -new innovations and emerging trends. *Gut Pathogens* **8**, 2233–1859 (2012).
41. Ocaña, V. & Nader-Macías, M. E. Adhesion of *Lactobacillus vaginal* strains with probiotic properties to vaginal epithelial cells. *Biocell* **25**, 265–273 (2001).
42. Botes, M., Loos, B., Van Reenen, C. A. & Dicks, L. M. T. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Arch. Microbiol.* **190**, 573–584 (2008).
43. Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y. & Ahn, J. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 434–442 (2009).
44. Ton-That, H., Marraffini, L. A. & Schneewind, O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* **1694**, 269–278 (2004).
45. Remus, D. M. *et al.* Impact of *Lactobacillus plantarum* sortase on target protein sorting, gastrointestinal persistence, and host immune response modulation. *J. Bacteriol.* **195**, 502–509 (2013).
46. Douillard, F. P. *et al.* Functional identification of conserved residues involved in *Lactobacillus rhamnosus* strain GG sortase specificity and pilus biogenesis. *J. Biol. Chem.* **289**, 15764–15775 (2014).
47. Westermann, C. *et al.* Exploring the genome sequence of *Bifidobacterium bifidum* S17 for potential players in host-microbe interactions. *Symbiosis* **58**, 191–200 (2012).
48. Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 728–764 (2008).
49. Lorca, G. L., Raya, R. R., Taranto, M. P. & De Valdez, G. F. Adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnol. Lett.* **20**, 239–241 (1998).
50. Pfeiler, E. A., Azcarate-Peril, M. A. & Klaenhammer, T. R. Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.* **189**, 4624–4634 (2007).
51. Zacharof, M. P. & Lovitt, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Proc.* **2**, 50–56 (2012).
52. Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A. & Kapila, S. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiot. Antimicrob. Prot.* **6**, 47–58 (2014).
53. Dicks, L. M. T. *et al.* Medical and Personal Care Applications of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* 391–421 (2011).
54. Foulquié Moreno, M. R., Rea, M. C., Cogan, T. M. & De Vuyst, L. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 73–84 (2003).
55. López-Cuellar, M. del R., Rodríguez-Hernández, A. I. & Chavarría-Hernández, N. LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol. and Biotechnol. Equip.* **30**, 1039–1050 (2016).
56. Nilsen, T., Nes, I. F. & Holo, H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2975–2984 (2003).
57. Jiang, J. *et al.* Comparative Genomics of *Pediococcus pentosaceus* Isolated From Different Niches Reveals Genetic Diversity in Carbohydrate Metabolism and Immune System. *Front. Microbiol.* **11**, 253 (2020).
58. Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A. & Van Houdt, R. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 709–730 (2017).
59. Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 939–1031 (2006).
60. Jamal, Z. *et al.* Distribution and functions of phosphotransferase system genes in the genome of the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3371–3379 (2013).
61. Abe, K. & Uchida, K. Correlation between depression of catabolite control of xylose metabolism and a defect in the phosphoenolpyruvate: Mannose phosphotransferase system in *Pediococcus halophilus*. *J. Bacteriol.* **171**, 1793–1800 (1989).
62. Monedero, V. *et al.* The phosphotransferase system of *Lactobacillus casei*: Regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 20–32 (2006).
63. Stevens, M. J. A., Molenaar, D., De Jong, A., De Vos, W. M. & Kleerebezem, M. Involvement of the mannose phosphotransferase system of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in peroxide stress tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3748–3752 (2010).
64. Houot, L., Chang, S., Pickering, B. S., Absalon, C. & Watnick, P. I. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J. Bacteriol.* **192**, 3055–3067 (2010).
65. Prabhurajeshwar, C. & Chandrakanth, R. K. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomed. J.* **40**, 270–283 (2017).
66. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. & Palenzona, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett. Appl. Microbiol.* **31**, 438–442 (2000).
67. Lowry. Lowry Protein Assay. *J. Biol. Chem.* 265–275 (1951).
68. Rungruangsak-Torrissen, K., Moss, R., Andresen, L. H., Berg, A. & Waagbø, R. Different expressions of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* **32**, 7–23 (2006).
69. Areekijseree, M. *et al.* Temperature and pH characteristics of amylase and proteinase of adult freshwater pearl mussel, *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* Simpson 1900. *Aquaculture* **234**, 575–587 (2004).
70. Xue, X. M. *et al.* Characterisation of cellulase activity in the digestive system of the redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Aquaculture* **180**, 373–386 (1999).
71. Stuckmann, M. & Winkler, U. K. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* **138**, 663–670 (1979).
72. Koren, S. *et al.* Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k -mer weighting and repeat separation. *bioRxiv* **071282**, (2016).
73. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).

เอกสารนี้เป็นสำเนาที่ได้รับการอนุมัติจากผู้ทรงสิทธิ์ โดย ธนพล ศรีเพชร เพื่อการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น จากระบบคลังข้อมูลวิทยานิพนธ์ จุฬาฯ

74. Li, H. *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**, 2078–2079 (2009).
75. Walker, B. J. *et al.* Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One* **9,** (2014).
76. Delcher, A. L., Bratke, K. A., Powers, E. C. & Salzberg, S. L. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer. *Bioinformatics* **23**, 673–679 (2007).
77. Lukashin, A. V. & Borodovsky, M. GeneMark.hmm: New solutions for gene finding. *Nucl. Acids Res.* **26**, 1107–1115 (1998).
78. Besemer, J. & Borodovsky, M. Heuristic approach to deriving models for gene finding. *Nucl. Acids Res.* **27**, 3911–3920 (1999).
79. Besemer, J., Lomsadze, A. & Borodovsky, M. GeneMarkS: A self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucl. Acids Res.* **29**, 2607–2618 (2001).
80. Aziz, R. K. *et al.* The RAST Server: Rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genom.* **9**, 75 (2008).
81. Overbeek, R. *et al.* The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucl. Acids Res.* **42**, D206-214 (2014).
82. Lowe, T. M. & Chan, P. P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes. *Nucl. Acids Res.* **44**, W54-57 (2016).
83. Lowe, T. M. & Eddy, S. R. tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucl. Acids Res.* **25**, 955–964 (1997).
84. Schattner, P., Brooks, A. N. & Lowe, T. M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs. *Nucl. Acids Res.* **33**, W686-689 (2005).
85. Lagesen, K. *et al.* RNAmmer: Consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. *Nucl. Acids Res.* **35**, 3001–3008 (2007).
86. Zhou, Y., Liang, Y., Lynch, K. H., Dennis, J. J. & Wishart, D. S. PHAST: A Fast Phage Search Tool. *Nucl. Acids Res.* **39**, W347-352 (2011).
87. Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. CRISPRFinder: A web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucl. Acids Res.* **35**, W52-57 (2007).
88. Grant, J. R. & Stothard, P. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucl. Acids Res.* **36**, W181-184 (2008).
89. Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–1649 (2012).
90. Surachat, K., Sangket, U., Deachamag, P. & Chotigeat, W. In silico analysis of protein toxin and bacteriocins from *Lactobacillus paracasei* SD1 genome and available online databases. *PLoS One* **12**, e0183548 (2017).
91. de Jong, A., van Hijum, S. A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J. & Kuipers, O. P. BAGEL: A web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucl. Acids Res.* **34**, W273-276 (2006).
92. Edgar, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* **32**, 1792–1797 (2004).

Acknowledgements

This work was supported by the revenue budget of Prince of Songkla University, Thailand (SCI6202064S), the Fundamental Fund (FF) budget of Prince of Songkla University, Thailand (SCI6405032d), and funding from Center of Genomics and Bioinformatics Research, Prince of Songkla University.

Author contributions

W.W. conceived and designed the study; P.K. and W.W. performed the molecular biology experiments; W.W. and K.S. performed the in silico analysis; W.W. and A.P. interpreted the results; W.W. and K.S. drafted the paper, W.W. edited the paper and managed the project. All the authors reviewed the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1038/s41598-021-96780-z.

Correspondence and requests for materials should be addressed to W.W.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2021

เอกสารฉบับนี้เป็นสำเนาที่ได้รับอนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้า โดย ธนพล ศรีเพชร 17/04/2022 จากระบบคลังข้อมูลวิทยานิพนธ์ (TDRR)

(แบบ 1)

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาอาหารที่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการฝากเซลล์สืบพันธุ์ให้เจริญพันธุ์

Development of feed diet for gonad-transplanted shrimp

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

คณะนักวิจัย

ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. พลสิทธิ์ สถาผลเดชา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม
ประจำปีงบประมาณ 2564 รหัสโครงการ SCI6405032e

1. ชื่อชุดโครงการ
   การพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

2. ชื่อโครงการย่อยทุกโครงการ
   โครงการย่อยที่ 1 การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย
   โครงการย่อยที่ 2 การฝากถ่ายเซลล์สืบพันธุ์ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วย
   โครงการย่อยที่ 3 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอพันธุกรรมกุ้งที่เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์
   โครงการย่อยที่ 4 การใช้โพรไบโอติกที่ในการอนุบาลและเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการฝากเซลล์สืบพันธุ์
   โครงการย่อยที่ 5 การพัฒนาอาหารที่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งที่เกิดจากการฝากเซลล์สืบพันธุ์ให้เจริญพันธุ์

3. คณะนักวิจัย และ หน่วยงานต้นสังกัด (คณะ/ภาควิชา หรือหน่วยงาน)
   ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พลสิทธิ์ สถาผลเดชา คณะวิทยาศาสตร์

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย	1
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	2
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	3
ทบทวนวรรณกรรม	3
วิธีการทดลอง	4
ผลการทดลอง	6
สรุปผลการทดลอง	11
เอกสารอ้างอิง	11

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการตาราง

ตารางที่ 1 รายการวัตถุดิบส่วนผสมอาหารกุ้ง 5

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

รายการภาพประกอบ

รูปที่ 1 อัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกผสม 6
รูปที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกผสมต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน 7
รูปที่ 3 ผลของการฉีดโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb ต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวันในกุ้งขาว 7
รูปที่ 4 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรแบบผสมต่อการรอดตายในกุ้งขาว 8
รูปที่ 5 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรแบบผสมต่อการเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน 8
รูปที่ 6 อัตราการรอดตายของกุ้งที่ทดสอบอาหารสูตรผสมสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการกิน 9
รูปที่ 7 ผลของอาหารสูตรผสมสารสกัดสมุนไพรและน้ำมันละหุ่งต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน 10
รูปที่ 8 ผลของอาหารสูตรผสมสมุนไพรชนิดผงต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน 10

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุนส่งเสริม ววน.) และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ SCI6405032e

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทคัดย่อ

กุ้งเป็นหนึ่งในสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยกุ้งขาวเป็นกุ้งทะเลที่เกษตรนิยมเลี้ยงมากที่สุดถึงร้อยละ 95 ของกุ้งทั้งหมด รองลงมาคือกุ้งกุลาดำ ในขณะที่กุ้งแชบ๊วยซึ่งเป็นหนึ่งในกุ้งประจำถิ่นของประเทศไทยนั้นแม้ว่าจะมีราคาสูงในท้องตลาด แต่จำเป็นต้องใช้วิธีการจับจากทะเลเป็นหลักเพราะว่าเป็นกุ้งที่เลี้ยงยากเมื่อเทียบกับกุ้งขาว และกุ้งกุลาดำ โดยการประมงกุ้งแชบ๊วยส่งผลกระทบต่อการลดจำนวนประชากรในธรรมชาติ ดังนั้นการอนุรักษ์ประชากรกุ้งแชบ๊วยจึงมีความสำคัญต่อทั้งระบบนิเวศ และทางเศรษฐกิจ หนึ่งในวิธีการอนุรักษ์สายพันธุ์สัตว์น้ำรวมถึงกุ้งสามารถทำได้โดยการอุ้มบุญกุ้งแชบ๊วยด้วยกุ้งที่มีความสามารถในการเจริญได้ดี อาทิ กุ้งขาว และกุ้งกุลาดำ ที่มีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับกุ้งแชบ๊วย โดยในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาการพัฒนาอาหารสูตรที่เร่งการเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่จะใช้เป็นกุ้งอุ้มบุญเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งแชบ๊วย โดยอาหารกุ้งจะมีการเติมสารสกัดจากสมุนไพรต่างๆ ในเบื้องต้นได้ทดสอบผลของสารสกัดสมุนไพรต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งวัยรุ่น พบว่าสารสกัดบอระเพ็ด ว่านหางจระเข้ ขมิ้นชัน และขิง สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตในช่วง 7-14 วันหลังจากฉีดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อฉีดสารสกัดผสมระหว่างสมุนไพรดังกล่าวกลับพบว่าการฉีดสารสกัดผสมขิง ว่านหางจระเข้ และบอระเพ็ดให้ฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการฉีดเพียงสารสกัดชนิดเดียว แต่หากเมื่อผสมสารสกัดเพียงสองชนิดกลับให้ฤทธิ์ในการกระตุ้นลดลง นอกจากนั้นการฉีดโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb สามารถกระตุ้นการเจริญของกุ้งวัยรุ่นเช่นเดียวกัน จากนั้นอาหารกุ้งสูตรผสมสารสกัดดังกล่าวได้นำมาทดสอบการเจริญเติบโตด้วยวิธีการกิน พบว่าอาหารสูตรผสมสารสกัดบอระเพ็ดทั้งชนิดน้ำและชนิดผงให้ฤทธิ์ในการเร่งการเจริญเติบโตในกุ้งขาวสูงที่สุดในระบะเวลา 21 วัน เมื่อเทียบกับสารสกัดขมิ้นชัน และขิง จากการทดลองนี้เห็นว่าสารสกัดบอระเพ็ดนั้นมีศักยภาพที่ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารกุ้งเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต ในขณะที่โปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb ที่มีรายงานก่อนหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ ยังมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญซึ่งโปรตีนลูกผสมนี้จะถูกนำไปทดสอบและพัฒนาสูตรอาหารที่เร่งการพัฒนารังไข่ต่อไป

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/6/2021
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

Abstract

Shrimp is one of the most important aquatic animals in Thailand. Pacific white shrimp is the most popular in shrimp industry with 95% of total shrimp species due to its growth rate is high and culture in high density captivity is capable. In contrast, banana shrimp, a common species in Southeast Asia, is one of high economic value animals but it has not been cultured inland like white shrimp and black tiger shrimp. This leads fishery wild banana shrimp and results in reduction of its population. Therefore, a way to conservation of this shrimp is important. The gonad transfer and surrogating from donor banana shrimp to recipient white shrimp is an approach to propagate banana shrimp offspring without aquaculture. However, this technique has been developed and not success in shrimp yet. Hence, to improve growth and gonad development of white shrimp is necessary by developing feed diet. This study aimed to improve low cost of shrimp feed with herb extracts for shrimp growth. Seven potential herb extracts were examined for shrimp growth by injection. The result showed that *Tinospora cordifolia* (Tino), aloe vera, curcumin, and ginger extracts increased average daily growth (ADG) during 7-14 days after injection. Also, an injection of Tino, aloe vera, and ginger extracts increased growth in shrimp compared with single injections whereas mixed double extracts decreased the growth after injection. Moreover, an injection of a recombinant protein, His-TF-rgbb, stimulated ADG in shrimp. Then, feed diet supplemented with either herb extract or powder was tested for shrimp growth by oral feeding. The result indicated that ADG was highest in shrimp fed with the feed diet with either Tino extract or powder compared with feed diet supplemented with aloe vera and ginger. These suggested potential growth enhancement of *T. cordifolia* in shrimp.

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

บทนำ

กุ้งแชบ๊วยเป็นกุ้งทะเลที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง โดยที่กุ้งแชบ๊วยที่ซื้อขายตามท้องตลาดเป็นกุ้งธรรมชาติที่ได้จากการประมงในทะเล ซึ่งนำไปสู่การลดลงของจำนวนประชากรกุ้งแชบ๊วยในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยในฟาร์มยังไม่ประสบความสำเร็จด้วยการขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาของกุ้ง และการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างจากกุ้งขาวและกุ้งกุลาดำ เพื่อที่จะอนุรักษ์สายพันธุ์กุ้งชนิดนี้ซึ่งในขณะที่ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคโนโลยีเข้ามาแก้ไขปัญหา โดยหนึ่งในวิธีการเพิ่มผลผลิตกุ้งคือการฝากเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งสายพันธุ์หนึ่งไปยังกุ้งอีกสายพันธุ์หนึ่งหรืออาจเรียกว่าการอุ้มบุญ โดยกุ้งขาวเป็นตัวเลือกที่สำคัญเนื่องจากมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกับกุ้งแชบ๊วย อีกทั้งอัตราการเจริญเติบโตดี มีระบบการเลี้ยงเป็นมาตรฐานชัดเจน อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีการฝากเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งยังอยู่ในขั้นตอนของการวิจัยพัฒนาทั้งกระบวนนำฝาก การเลี้ยงรวมไปถึงการเจริญการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อที่จะสนับสนุนกระบวนการดังกล่าวการปรับปรุงวิธีการเร่งการเจริญรวมไปถึงการเร่งการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ในกุ้งรับฝากนั้นจึงมีความสำคัญ โดยหนึ่งในการพัฒนาและช่วยเร่งการเจริญทั้งตัวกุ้งและเซลล์สืบพันธุ์สามารถทำโดยการปรับปรุงสูตรอาหารกุ้งที่มีราคาถูกและใช้ประโยชน์จากสมุนไพรธรรมชาติทดแทนการใช้สารเติมแต่งเคมี ซึ่งจะนำไปสู่การได้สูตรอาหารที่เร่งการเจริญในกุ้ง และเร่งการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์กับกุ้งที่รับฝากเซลล์สืบพันธุ์ รวมไปถึงสามารถนำสูตรอาหารต้นแบบนี้ไปต่อยอดเชิงพาณิชย์ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาสูตรอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรเร่งการเจริญของกุ้งขาววัยรุ่น
2. พัฒนาสูตรอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรเพื่อเร่งการเจริญของรังไข่ของแม่กุ้งแชบ๊วย

ทบทวนวรรณกรรม

การเร่งการเจริญของกุ้งมีปัจจัยหลายอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารกุ้งที่มีปรับปรุงสูตรใหม่อยู่ตลอดเวลา โดยโภชนาการในอาหารกุ้งประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 35-50% ไขมัน 4% วิตามิน คาร์โบไฮเดรต และสารเติมแต่งอื่นๆ (ธนาภรณ์ 2557) แม้ว่าสารอาหารจำพวกโปรตีนและไขมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญเป็นปัจจัยหลักในการเลี้ยงสัตว์ เช่น กุ้ง แต่สารอาหารอื่นๆ ที่ช่วยเสริมและกระตุ้นกระบวนการทางสรีรวิทยาของสัตว์มีความจำเป็นเพื่อทำให้กุ้งเจริญเติบโตได้รวดเร็ว และมีสุขภาพที่แข็งแรงตลอดการเพาะเลี้ยง มีรายงานการเติมสารเคมี และสารอาหารอื่นๆ เพิ่มเติมและสามารถเร่งการเจริญในกุ้งมาก อาทิ เลซิทิน (Vasagam et al., 2005) betaine และกรดอะมิโนต่างๆ (Penaflorida and Virtanen, 1996) การผสมเอนไซม์ไฮโรไลเสทจากยีสต์ (Jin et al., 2018) นอกจากนั้นมีรายงานการใช้พืชและสมุนไพรผสมในอาหารกุ้งเพื่อเร่งการเจริญ ได้แก่ การใช้หญ้าทะเลสีน้ำตาลเสริมอาหารเพิ่มกระบวนการทนต่อการติดเชื้อโรคในกุ้งขาว (Schleder et al, 2017) การใช้สารสกัดละหุ่งเสริมในอาหารเร่งการโตในกุ้งกุลาดำ (Sankar et al., 2011) สำหรับประเทศไทยมีสมุนไพรจำนวนมาก และหลากหลายชนิด และมีรายงานคุณสมบัติทางยาหลายตัว ได้แก่ ขมิ้นชัน ขิง เป็นต้น แม้ว่าจะมีการนำสมนุไพรเหล่านี้ผสมเป็นอาหารกุ้งเพื่อเพิ่มมูลค่าและโภชนาการให้กับอาหารกุ้ง แต่ส่วนใหญ่เพื่อเป้าหมายในการเพิ่มภูมิคุ้มกันในกุ้ง เช่น การเสริมสารสกัดขมิ้นชันที่มีปริมาณ curcuminoid 25.726% ในปริมาณ 25 mg/kg ของอาหาร สามารถเพิ่มระดับภูมิคุ้นกันในกุ้งขาว (Vanichkul et al., 2010) กุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดขิงมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้น และป้องกันการติดเชื้อ *Vibrio paraheamolyticus* (Soowannayan et al., 2019; Rahardjo et al., 2022) นอกจากนั้นยังมีการใช้สารสะกัดบอระเพ็ดกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล (El Basuini et al., 2022) และป้องกันการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำ (Citarasu et al., 2006) อักทั้งยังมีศักยภาพกระตุ้นการโตในปลาดุก (Latha et al., 2020)

เอกสารนี้ได้รับการเผยแพร่ในวันที่ 19/06/2024
โดยสำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก (TNRR)

เช่นเดียวกับอาหารผสมสารสกัดว่านหางจระเข้ที่สามารถป้องกันกุ้งขาวจากการเชื้อ *V. paraheamolyticus* (Trejo-Flores et al., 2016)

นอกจากสมุนไพรดังกล่าวมีรายงานกระตุ้นการโตในสัตว์น้ำอื่นๆ เช่น อาหารผสมว่านหางจระเข้กระตุ้การโตในปลาดุกแอฟริกา (Gabriel et al., 2019) ปลาไน (Mahdavi et al., 2013) และปลานิล (Gabriel et al., 2015) รวมถึงอาหารผสมผงบอระเพ็ดที่ 1% w/w สามารถกระตุ้นการเจริญในปลากระโห้อินเดียได้ (Upreti and Chauhan, 2018) และปลาไน (Dubey et al., 2016) แต่สมุนไพรดังกล่าวยังไม่มีรายงานในผลทดสอบการโตในกุ้งในขณะที่สารสกัดขิงผสมอาหารสามารถกระตุ้นการเจริญในกุ้งแมน้ำ (Poongodi et al., 2012) กุ้งขาว (Kumar et al., 2019) รวมถึงอาหารผสมสารสกัดขมิ้นชันที่สกัดจาก ethanol ที่ปริมาณ 7.5 และ 15 g/kg อาหาร สามารถกระตุ้นการโตของกุ้งขาว (Lawhavinit et al., 2011) อย่างไรก็ตามในการทดลองของ Poongodi et al., 2012 พบว่าอัตราการเจริญของกุ้งก้ามกรามที่กินอาหารผสมผงขมิ้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการเติมสารสกัดสมุนไพร และผสมผงสมุนไพรในอาหารกุ้งสามารถเสริมภูมิคุ้มกัน และอาจเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตได้ และการใช้สมุนไพรที่มีอยู่ในประเทศนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าและประโยชน์ของสมุนไพร ซึ่งลดการใช้สารเคมีในการเติมแต่ง และลดต้นทุนสูตรอาหารเร่งการเจริญในอุตสาหกรรมกุ้ง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นปรับปรุงสูตรอาหารกุ้งที่ใช้สมุนไพรเป็นสารเติมแต่งเพื่อเร่งการเจริญของกุ้งขาวที่จะใช้เป็นกุ้งตัวรับเซลล์สืบพันธุ์จากกุ้งแชบ๊วย

วิธีการทดลอง

1. สารเคมี และโปรตีนลูกผสม

สารสกัดสมุนไพร ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชัน ใบบัวบก ขิง บอระเพ็ด เปลือกกล้วยหอม กะเพรา และว่านหางจระเข้ สกัดด้วยเมธานอล และละลายกลับด้วยเอธิลีนไกลคอลให้มีความเข้มข้นประมาณ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สั่งซื้อจากบริษัท DD herbal Co. ltd. สารสกัดจะถูกเจือจางด้วยน้ำ deionized (DI) ก่อนนำไปฉีดกุ้ง ขิง บอระเพ็ด ขมิ้นชัน มะรุม และลูกเดือยชนิดผงละเอียดถูกใช้ในการผสมอาหารกุ้งด้วย

ในขณะโปรตีนลูกผสม glass bottom boat (His-TF-rgbb) และ His-TF ผลิตจากแบคทีเรีย *Escherichia coli* BL21 DE3 ที่มีพลาสมิดลูกผสม pCold-TF ที่มียีน Gbb และ pCold-TF เปล่า ตามลำดับ โดยกระตุ้นการผลิตโปรตีนลูกผสมด้วย IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 15ºC เป็นเวลา 20-22 ชั่วโมง ก่อนนำเซลล์แบคทีเรียไปสกัดด้วยวิธี Sonication ในสารละลายเกลือ (20 mM phosphate buffer pH 8.0 และ 300 mM NaCl) จากแยกโปรตีนลูกผสมให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA resin ก่อนจะนำโปรตีนลูกผสมไปเปลี่ยนสารละลายเป็น 1XPBS pH 8.0 ด้วยวิธีไดอะไลสิส และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's assay

2. การเตรียมอาหารกุ้งผสมสารกสัดสมุนไพร

องค์ประกอบของอาหารพื้นฐานได้ปรับใช้วัตถุดิบพื้นฐานจากข้อมูลกรมประมง ดังตารางที่ 1 โดยใน 100 กรัม จะประกอบด้วยการผสมวัตถุดิบเป็นผงตามสัดส่วน และเติมน้ำกลั่นในปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้ชื้นเป็นเนื้อเดียวกันก่อนจะเติมน้ำมันปลาหมึกหรือน้ำมันละหุ่งดังในตารางที่ 1 ร่วมกับสารสกัดสมุนไพรชนิดน้ำที่ความเข้มข้นสุดท้าย 7 mg ต่อน้ำหนักอาหาร 100 กรัม หรือสมุนไพรผงที่ความเข้มข้น 1 % w/w และผสมใหม่อีกครั้งให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปขึ้นรูปเป็นเส้นด้วยเครื่องอัดเม็ดและนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และจัดเก็บในที่แห้ง อาหารกุ้งที่อบแห้งแล้วจะถูกแบ่งไปตรวจค่าโภชนการเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน และขี้เถ้า โดยเทียบกับอาหารสำเร็จรูปยี่ห้อ CP เบอร์ 4

เอกสารนี้เป็นสำเนาเพื่อใช้ในการขอรับทุนวิจัย ตั้งแต่วันที่ 19/06/2021
โดย ธนาล ศรีเพชร 1529980388
การระบุแหล่งข้อมูลอ้างอิงโดย (TNRR)

ตารางที่ 1 รายการวัตถุดิบส่วนผสมอาหารกุ้ง

วัตถุดิบ	กลุ่มสูตรอาหาร และสัดส่วนวัตถุดิบที่ใช้ (% w/v หรือ % v/v)
ปลาป่น	50
ข้าวโพดป่น	4
รำละเอียด	10
แป้งมันสำปะหลัง	8
กากถั่วเหลือง	17
น้ำมันปลาหมึก	5
น้ำมันละหุ่ง	0
วิตามินและแร่ธาตุรวม	1
สารเหนียว	5
แคลเซียมคลอไรด์	0.125
กระถินป่น	5
มะรุมผง	1
ลูกเดือยผง	1

3. การทดสอบผลของสารสกัดต่อการเจริญในกุ้งวัยรุ่นด้วยวิธีการฉีด

กุ้งขาวขนาดประมาณ 4-5 กรัม เลี้ยงในน้ำทะเลที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 1-2 วันก่อนนำมาทดสอบ กุ้งขาวจะถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพร และโปรตีนลูกผสมต่อการเจริญเติบโตเบื้องต้นด้วยวิธีการฉีด โดยกุ้งขาวถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ กลุ่มควบคุม ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยจะฉีดน้ำ DI หรือฉีดด้วยโปรตีนลูกผสม His-TF ในปริมาณ 200 ng ต่อกุ้งหนึ่งตัว ในขณะที่กลุ่มทดสอบเป็นกุ้งที่ฉีดด้วยสารสกัดสมุนไพรต่างๆ ได้แก่ สารสกัดขมิ้นชัน ใบบัวบก ขิง บอระเพ็ด เปลือกกล้วยหอม กะเพรา และว่านหางจระเข้ ที่ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อตัว และโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb 200 ng ต่อกุ้งหนึ่งตัว โดยแต่ละกลุ่มจะใช้กุ้งจำนวน 8 ตัว และทำการชั่งน้ำหนักก่อนฉีดทุกตัว ให้อาหารกุ้งเม็ดจมเบอร์ 4 5 เม็ดต่อมื้อ จำนวน 3 มื้อต่อวัน บันทึกจำนวนกุ้งที่รอดตาย จำนวนครั้งและระยะเวลาลอกคราบทุกวัน บันทึกน้ำหนักกุ้งทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 28 วัน น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily growth; ADG) คำนวณจากส่วนต่างน้ำหนักกุ้ง ณ วันที่บันทึกต่อวันแรกหารด้วยจำนวนวันที่บันทึกน้ำหนัก

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในคลังข้อมูลงานวิจัย (TNRR)
โดย ธนดล พิณพร (ID 6598038) เมื่อ 19/06/2024
ภายใต้ข้อตกลงการใช้งานของคลังข้อมูลงานวิจัย (TNRR)

4. การทดสอบผลของอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญในกุ้งวัยรุ่นด้วยวิธีการกิน

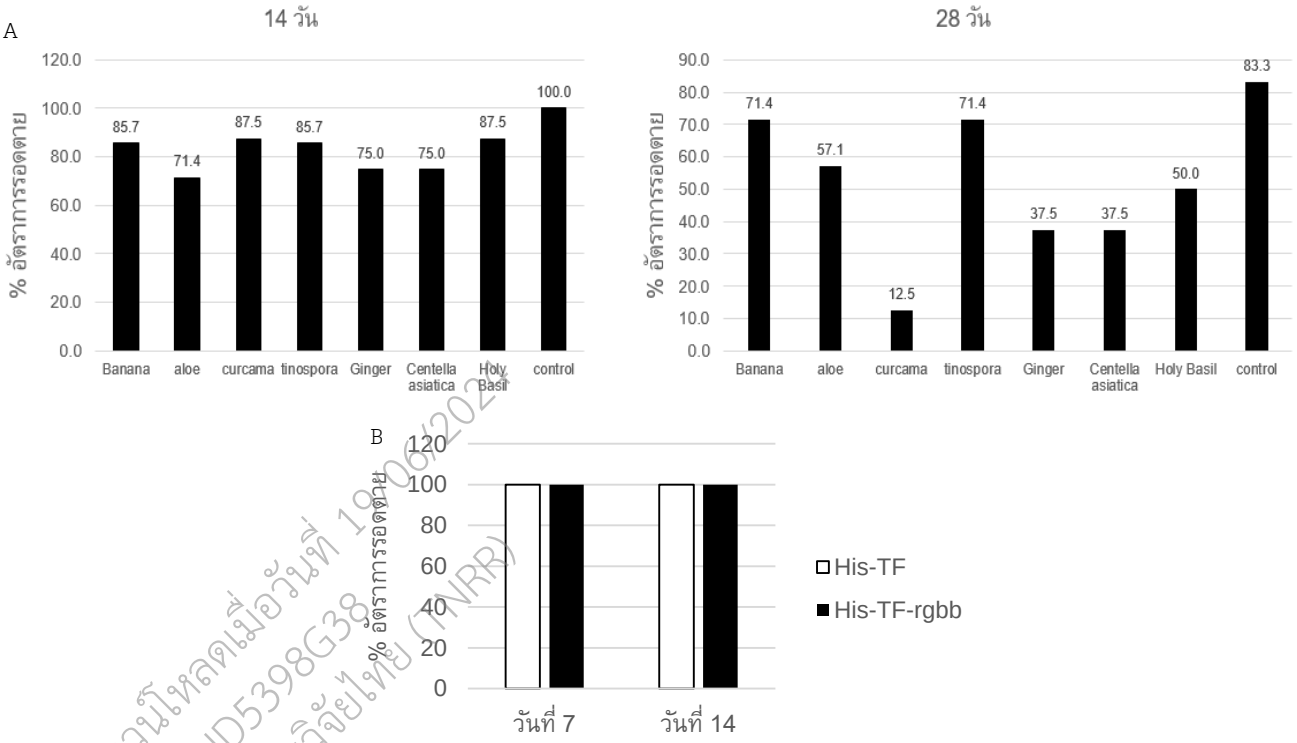
กุ้งขาวขนาดประมาณ 5 กรัม เลี้ยงในน้ำทะเลที่ความเค็ม 10 ppt เป็นเวลา 1-2 วันก่อนนำมาทดสอบ กุ้งขาวจะถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรสูตรต่างๆ โดยให้กินอาหาร 3 มื้อต่อวัน มื้อละ 1 กรัม โดยกุ้งขาวถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ได้แก่ กลุ่มควบคุม ซึ่งจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มทดสอบเป็นกุ้งทีกินอาหารสำหรับรูป (Com) และกุ้งที่กินอาการที่เตรียมเอง (Lab) ในขณะกลุ่มทดสอบแบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ กุ้งที่กินอาหารที่ผสมสารสกัดสมุนไพรอย่างละชนิด ได้แก่ สารสกัดว่านหางจระเข้ (Aloe) ขิง (Gin) และบอระเพ็ด (Tino) กลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรรวมทั้งสามชนิด (All3) และกลุ่มที่กินอาหารที่เตรียมเองแต่ผสมน้ำมันละหุ่งแทนน้ำมันปลาหมึก (Caster) โดยแต่ละกลุ่มจะใช้กุ้งจำนวน 10 ตัว และทำการชั่งน้ำหนักก่อนเริ่มการทดลองทุก บันทึกจำนวนกุ้งที่รอดตาย จำนวนครั้งและระยะเวลาลอกคราบทุกวัน บันทึกน้ำหนักกุ้งทุกๆ 7 วัน เป็นระยะเวลา 14-28 วัน น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (average daily growth; ADG) คำนวณจากส่วนต่างน้ำหนักกุ้ง ณ วันที่บันทึกต่อวันแรกหารด้วยจำนวนวันที่บันทึกน้ำหนัก

7. ผลการทดลองและวิจารณ์

1 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกผสมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาว

1.1 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกเบื้องต้นผสมต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาว

ภายหลังจากการฉีดสารสกัดสมุนไพร 7 ชนิด พบว่าอัตราการรอดตายเฉลี่ยในกลุ่มทดสอบอยู่ที่ 70-85% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ 100% ในวันที่ 14 และอัตราการรอดตายลดลงในวันที่ 28 โดยที่กลุ่มที่ฉีดด้วยสารสกัดขมิ้นชันมีอัตราการตายสูงที่สุด และกลุ่มที่ฉีดด้วยสารสกัดขิง ใบบัวบก และกะเพรามีอัตรารอดประมาณ 37-50% ในขณะที่กลุ่มที่ฉีดด้วยสารสกัดเปลือกกล้วย ว่านหางจระเข้ และบอระเพ็ดมีอัตราการรอดที่ 60-70% เอเทียบกับกลุ่มควบคุม (83.3%) ดังรูปที่ 1 A โดยกุ้งที่ฉีดด้วยโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb พบว่ามีอัตราการรอดตาย 100% ในวันที่ 7 และ 14 (รูปที่ 1 B) โดยกุ้งทุกกลุ่มมีระยะเวลาในการลอกคราบแต่ละรอบเฉลี่ยประมาณ 8 วัน และลอกคราบประมาณ 3 ครั้งในรอบ 28 วัน

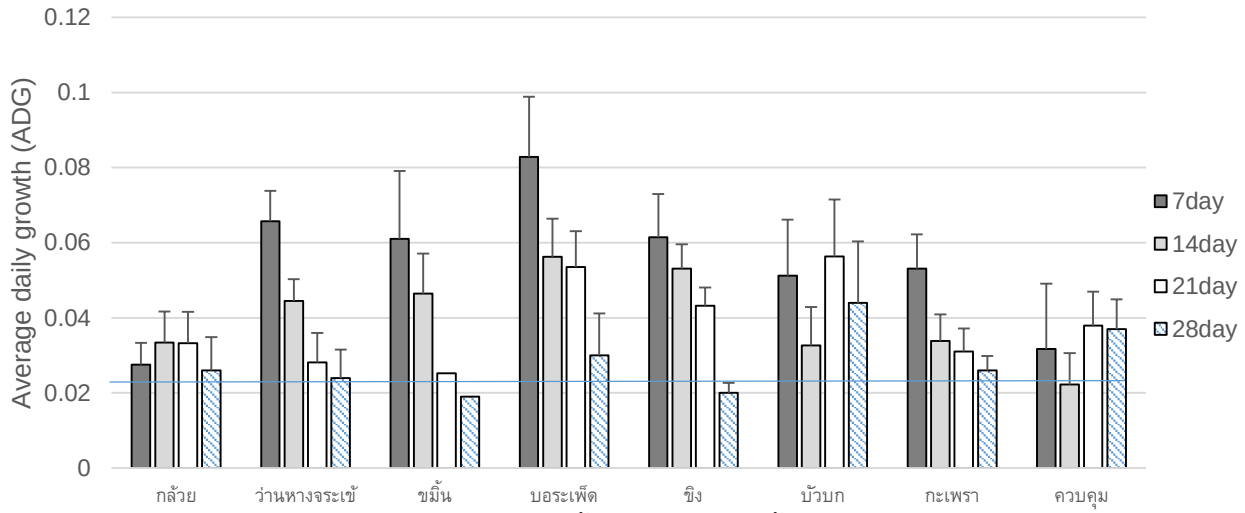


เอกสารนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนัฐ ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังปัญญาของสำนักวิจัยไทย (TNRR)

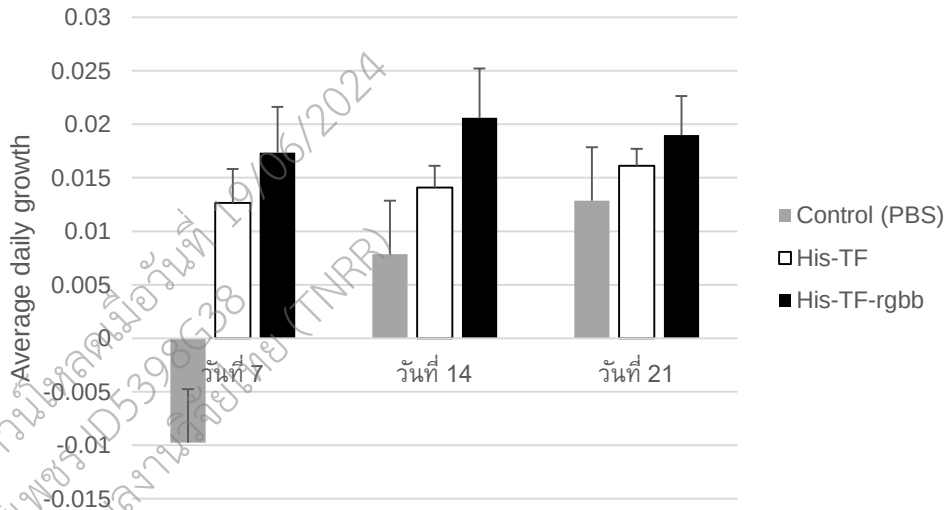
รูปที่ 1 อัตราการรอดตายของกุ้งหลังจากฉีดด้วยสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกผสม อัตราการรอดตายของกุ้งถูกฉีดด้วยสารสกัดเปลือกกล้วย (Banana) ว่านหางจระเข้ (Aloe) ขมิ้นชัน (Curcumin) บอระเพ็ด (Tinospora) ขิง (Ginger) ใบบัวบก (Centella asiatica) กะเพรา (Holy basil) หรือน้ำ DI (control) ในวันที่ 14 และ 28 (A) โดยกุ้งถูกฉีดด้วย และกุ้งที่ถูกฉีดด้วยโปรตีนลูกผสม His-TF หรือ His-TF-rgbb (B)

ในขณะที่น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) นั้นพบว่า กุ้งที่ได้รับการฉีดด้วยสารสกัดบอระเพ็ด ว่านหางจระเข้ ขิง และขมิ้นชัน มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น (0.06-0.08) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (0.03) หรือมากกว่า 100-160% ในวันที่ 7 ถึงแม้ว่าค่า ADG ที่ 14 วันในกุ้งกลุ่มดังกล่าวจะลดลงเหลือประมาณ (0.04-0.06) แต่ยังคงมากกว่ากลุ่มควบคุม (0.02) ดังรูปที่ 2 ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ ในขณะที่กุ้งที่ฉีดโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb นั้นมีค่า ADG ที่วันที่ 7 และ 14 ประมาณ 0.015 และ 0.02 ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ฉีดด้วย His-TF (รูปที่ 3) แม้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป (วันที่ 21 และ 28) พบว่าค่า ADG ลดลงนั้นใน

กลุ่มดังกล่าว อาจเป็นเพราะเนื่องจากผู้ทดลองได้ฉีดสารสกัด และโปรตีนลูกผสมเพียงหนึ่งครั้ง และในวันที่ 14 เป็นต้นไปสารดังกล่าวอาจถูกใช้จนหมด หรือถูกขจัดออกจากตัวกุ้งไปแล้ว



รูปที่ 2 ผลของสารสกัดสมุนไพรและโปรตีนลูกผสมต่อน้ำหนักฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน

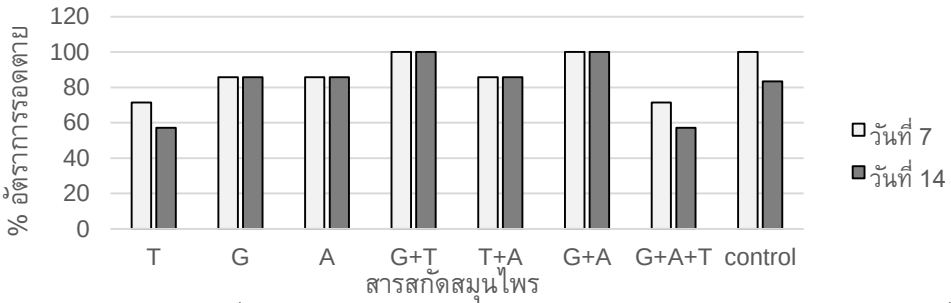


รูปที่ 3 ผลของการฉีดโปรตีนลูกผสม His-TF-rgbb ต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวันในกุ้งขาว

เอกสารฉบับนี้ถูกนำไปเผยแพร่ในคลังปัญญาจุฬาฯ เมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนพัฒ ศรีเพชร ID5398638
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)

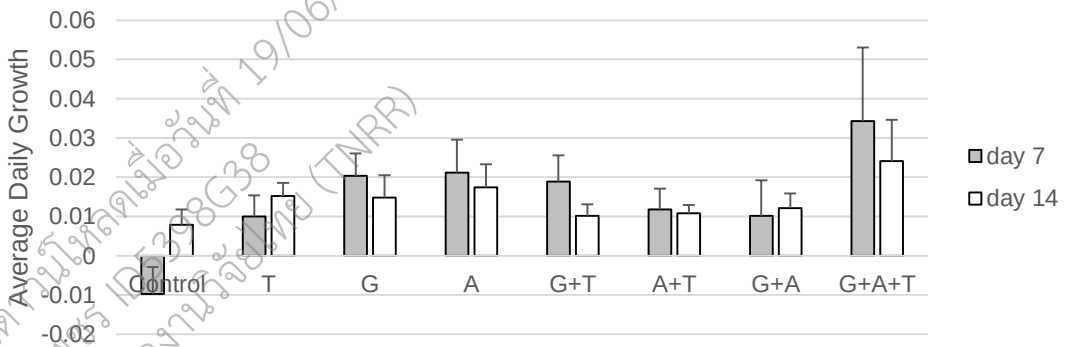
1.2 ผลของการผสมสารสกัดสมุนไพรผสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาวด้วยวิธีการฉีด

จากการทดสอบการฉีดสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตของกุ้งในข้อที่ 2.1 พบว่า สารสกัดขิง บอระเพ็ด และว่านหางจะเข้ในค่า ADG สูงที่สุด และมีอัตราการตายต่ำที่สุดในวันที่ 14 จึงนำสารสกัดเหล่านี้มาทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการเจริญโดยการผสมสารสกัดแล้วฉีดในกุ้ง จากการทดลองพบว่ากุ้งในกลุ่มที่ฉีดสารสกัดผสมแบบคู่มีอัตราการรอดตายสูง (80-100%) ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่ฉีดสารสกัดสมุนไพรแบบเดี่ยวหรือแบบผสมทั้งหมดมีอัตราการรอดตายอยู่ในช่วง 60-80% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม 80-100% ในวันที่ 7 และ 14 (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรแบบผสมต่อการรอดตายในกุ้งขาว กุ้งถูกฉีดด้วยสารสกัดสมุนไพรบอระเพ็ด (T) ขิง (G) ว่านหางจระเข้ (A) หรือผสมสารสกัดระหว่างขิงและบอระเพ็ด (G+T) บอระเพ็ดและว่านหางจระเข้ (T+A) หรือ ขิงและว่านหางจระเข้ (G+A) หรือสารสกัดผสมทั้งสามชนิด (G+A+T) และบันทึกจำนวนกุ้งที่รอดตายเป็นระยะเวลา 14 วัน

เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันแล้วพบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีดด้วยสารสกัดผสมทั้งสามชนิดให้ค่า ADG ที่วันที่ 7 สูงที่สุด (0.03) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มอื่นๆ (รูปที่ 5) ในวันที่ 14 หลังจากฉีดสารสกัด พบว่ากุ้งกลุ่มที่ฉีดสารสกัดผสมทั้งสามชนิดยังคงให้ค่า ADG สูงสุด (0.022) เพิ่มขึ้น 100% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกุ้งกลุ่มที่ฉีดสารสกัดผสมแบบสองชนิดพบว่า ADG ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แม้ว่าการฉีดสารสกัดเดี่ยวให้ค่ามากกว่าก็ตาม จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสมุนไพรยังคงให้ฤทธิ์การกระตุ้นการเจริญอยู่ และเมื่อผสมสารสกัดทั้งสามชนิดนั้นมีฤทธิ์ที่เสริมการกระตุ้นให้มากยิ่งขึ้น และเป็นที่น่าสังเกตว่าการผสมสารสกัดเพียงสองชนิดกลับให้ผลต่างข้าม ซึ่งสารสกัดดังกล่าวทั้งแบบเดี่ยวและผสมสามชนิดจะถูกนำไปปรับในการพัฒนาสูตรอาหารกุ้งต้นแบบเพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตในแผนครึ่งปีหลังต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ไหลเข้ามาในวันที่ 19/06/2024
โดย ธนินท์ ศรีเพชร ID 5738G38
จากระบบเครือข่ายงานวิจัย (TNRR)

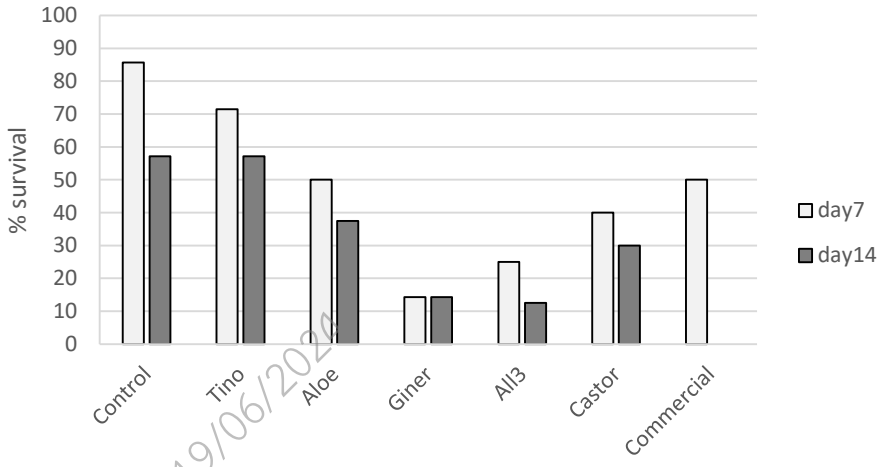
รูปที่ 5 ผลของการฉีดสารสกัดสมุนไพรแบบผสมต่อการเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน กุ้งถูกฉีดด้วยสารสกัดสมุนไพรบอระเพ็ด (T) ขิง (G) ว่านหางจระเข้ (A) หรือผสมสารสกัดระหว่างขิงและบอระเพ็ด (G+T) บอระเพ็ดและว่านหางจระเข้ (T+A) หรือ ขิงและว่านหางจระเข้ (G+A) หรือสารสกัดผสมทั้งสามชนิด (G+A+T) ค่า ADG ถูกคำนวณในวันที่ 7 และ 14 หลังจากฉีด

2. ผลของอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวด้วยวิธีการกิน

2.1 ผลของอาหารผสมสารสกัดสมุนไพรเบื้องต้นต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวด้วยวิธีการกิน

ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้เตรียมอาหารกุ้งที่ผสมสารสกัดที่มีผลในการเร่งการเจริญเบื้องต้นด้วยวิธีการฉีดจากกิจกรรมข้างต้น ประกอบด้วยอาหารที่ผสมสารสกัดว่านหางจระเข้ (Aloe) ขิง (Ginger) และบอระเพ็ด (Tino) รวมถึงอาหารที่ผสมสารสกัดรวมทั้งสามชนิด (All3) อีกทั้งยังได้ทดสอบผลของน้ำมันละหุ่ง (Castor) ผสมในอาหารกุ้งเปรียบเทียบกับอาหารพื้นฐาน (Control) ที่ผสมด้วยน้ำมันปลาหมึกที่สัดส่วน 3% v/v เท่ากัน หลังจาก

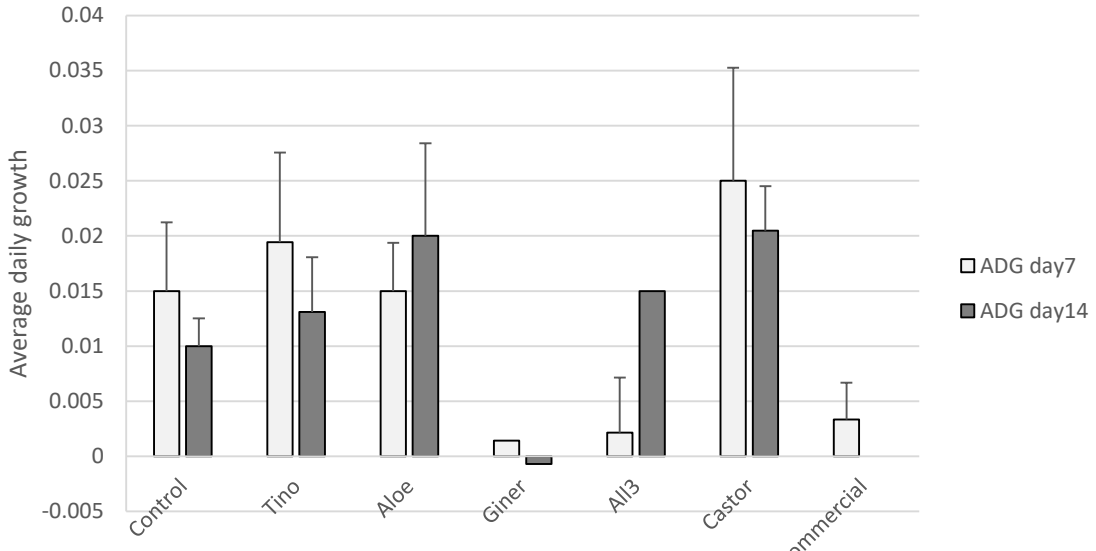
ทดสอบเบื้องต้นให้กุ้งกินอาหารไป 14 วันพบว่า อัตราการรอดตายของกุ้งลดลงอย่างมากในกลุ่มกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดขิง (15%) และแบบผสมรวมสามชนิด (25%) ในวันที่ 7 ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่กินอาหารพื้นฐานมีอัตราการรอด 85% แต่เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่มที่กินอาหารสำเร็จรูปนั้นมีอัตราการรอดลดลง 50% (รูปที่ 6) อีกทั้งเมื่อเลี้ยงและทดสอบต่อจนถึงวันที่ 14 พบว่า กลุ่มควบคุมที่กินอาหารพื้นฐานรอดเพียง 58% ในขณะที่กุ้งที่กินอาหารสำเร็จรูปตายหมด โดยในกลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัดมีอัตราการรอดตายประมาณ 15-55% เช่นกัน จากผู้วิจัยสังเกตเห็นปัญหาเรื่องน้ำที่เตรียมเพื่อเลี้ยงกุ้งในรอบนี้ที่ได้ทดลองว่าค่าไนเตรตกลับพบว่าสูงถึง 12.5 mg/ml เกินมาตรฐาน และขนาดกระบะต่อปริมาณกุ้งที่น้อยทำให้กุ้งมีความหนาแน่นสูง อีกทั้งตรวจพบการปนเปื้อนเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้กุ้งกลุ่มควบคุมตายเร็ว ผู้วิจัยเตรียมปรับสภาพน้ำโดยขจัดคลอรีน และเติมน้ำยาปรับสภาพเพื่อกำจัดไนเตรต แอมโมเนีย รวมถึงกรองน้ำก่อนเลี้ยงกุ้ง อีกทั้งติดระบบกรองในกระบะเลี้ยงกุ้งทุกกลุ่มในการทดลองซ้ำถัดไป อีกทั้งจัดหาตัวอย่างกุ้งที่ปลอดโรค และตรวจโรคก่อนทำการทดลอง



รูปที่ 6 อัตราการรอดตายของกุ้งที่ทดสอบอาหารสูตรผสมสารสกัดสมุนไพรด้วยวิธีการกิน ร้อยละอัตราการรอดตายของกุ้งที่กินอาหารผสมสารสกัดว่านหางจระเข้ (Aloe) บอระเพ็ด (Tino) ขิง (Ginger) ผสมทั้งสามสาร (All3) อาหารสูตรใส่น้ำมันละหุ่งแทนน้ำมันปลาหมึก (Castor) โดยมีกุ้งที่กินอาหารสำเร็จรูป (Commercial) และอาหารพื้นฐานที่เตรียมเอง (Control) เป็นกลุ่มควบคุม ในวันที่ 7 และ 14 กุ้งขนาดประมาณ 4-5 กรัม กลุ่มละ 10 ตัว

เอกสารฉบับนี้ได้รับการเผยแพร่ในวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร (NF5328G8)
จากระบบจัดเก็บข้อมูลงานวิจัยของ (ENRU)

เมื่อวัดน้ำหนักกุ้งที่เปลี่ยนแปลงในวันที่ 7 พบว่ากุ้งกลุ่มที่กินอาหารผสมบอระเพ็ดมีค่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (ADG) เพิ่มขึ้นประมาณ 33% เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ในขณะที่กลุ่มที่กินอาหารผสมว่านหางจระเข้ไม่มีแตกต่างจากกลุ่มควบคุม หากแต่กุ้งกลุ่มที่กินอาหารผสมสารสกัดขิง และสารสกัดรวม รวมถึงอาหารสำเร็จรูปมีค่า ADG น้อยกว่ากลุ่ม control ถึงเกือบ 6 เท่า (รูปที่ 7) เป็นที่น่าสนใจว่ากุ้งในกลุ่มที่กินอาหารที่ผสมน้ำมันละหุ่งแทนน้ำมันปลาหมึก (Castor) มีค่า ADG (0.025) สูงกว่ากลุ่มควบคุม 66% อีกทั้งเมื่อพิจารณาการเจริญในวันที่ 14 พบว่า ค่า ADG ของกุ้งกลุ่มที่กินอาหารผสมน้ำมันละหุ่ง และอาหารผสมสารสกัดว่านหางจระเข้สูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 100%

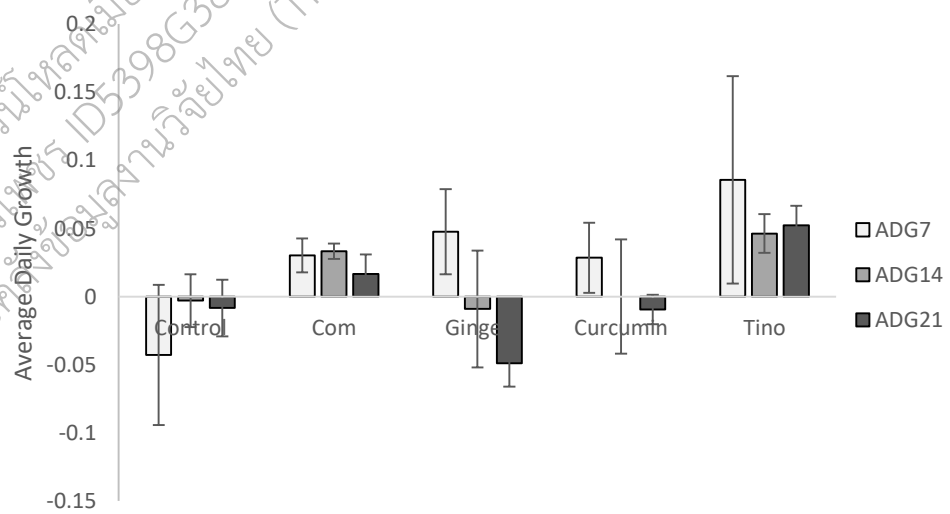


รูปที่ 7 ผลของอาหารสูตรผสมสารสกัดสมุนไพรและน้ำมันละหุ่งต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน

2.2 ผลของอาหารผสมสารสมุนไพรชนิดผงต่อการเจริญเติบโตในกุ้งขาวด้วยวิธีการกิน

การทดสอบผลของอาหารผสมสมุนไพรชนิดผงต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาววัยรุ่น โดยการกินอาหารวันละ 6 มื้อ เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าอาหารผสมบอระเพ็ด (Tino) ให้อัตราการเพิ่มขึ้นน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน (~0.08) ในขณะที่อาหารผสมขิง ขมิ้น และอาหารสำเร็จรูปให้ผลการเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันใกล้คียงกันที่ 0.03-0.05 เมื่อเทียบกับกุ้งที่กินอาหารกลุ่มควบคุมที่น้ำหนักลดลง (รูปที่ 8) อาหารผสมบอระเพ็ดยังคงเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุดในวันที่ 14 และ 21 เมื่อเทียบกับกลุ่มอาหารสำเร็จรูปที่ให้น้ำหนักเฉลี่ยต่อวันค่อนข้างคงที่ แต่ในขณะที่กุ้งในกลุ่มอื่นๆ มีน้ำหนักที่ลดลง หรือไม่เพิ่มขึ้น

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดนี้อนุญาตให้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ หรือแสวงหาผลประโยชน์ โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38 วันที่ 19/06/2024 จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)



รูปที่ 8 ผลของอาหารสูตรผสมสมุนไพรชนิดผงต่อน้ำหนักเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นต่อวัน

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของบอระเพ็ดที่สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตในกุ้งขาววัยรุ่นได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับผลของการฉีดสารสกัดบอระเพ็ดที่เพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยนต่อวันในกุ้งสูงที่สุดในวันที่ 7 (รูปที่ 2) ถึงแม้ว่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันของกุ้งที่การกินอาหารผสมสารสกัดบอระเพ็ดไม่แตกต่างกับ

กลุ่มอื่นๆก็ตาม (รูปที่ 6) อาจเป็นไปได้ว่าการฉีดสารสกัดโดยตรงทำให้กุ้งเกิดการกระตุ้นได้ชัดเจนมากกว่าการผสมสารสกัดในอาหาร แต่การเตรียมอาหารกุ้งที่ผสมสมุนไพรป่นอาจทำให้สารออกฤทธิ์ที่สำคัญของบอระเพ็ดสลายหรืออยู่ในอาหารได้นานมากกว่า

12. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดสมุนไพรขมิ้นชัน บอระเพ็ด ขิง และว่านหางจระเข้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตในกุ้งขาวัยรุ่นด้วยวิธีการฉีดภายใน 7-14 วัน รวมถึงการฉีดโปรตีนลูกผสม Gbb เช่นกัน อาหารสูตรผสมสารสกัดหรือสมุนไพรผงที่นักวิจัยเตรียมมีค่าโภชนาการใกล้เคียงกับอาหารสำเร็จรูป และเมื่อทดสอบเบื้องต้นพบว่าอาหารผสมสารสกัดว่านหางจระเข้ บอระเพ็ด และขิง สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ภายใน 7-14 วัน นอกจากนั้นน้ำมันปลาหมึกให้ผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันได้ดีกว่าน้ำมันละหุ่ง อาหารที่ผสมบอระเพ็ดผงให้อัตราการเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุดตลอด 21 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มสมุนไพรอื่นๆ

13. เอกสารอ้างอิง

ธนาถรณ์ จิตตปาลพงศ์ การสร้างสูตรอาหารสัตว์น้ำและสูตรอาหารสัตว์น้ำเศรษฐกิจ 2557 กรมประมง

Citarasu, T., Sivaram, V., Immanuel, G., Rout, N., Murugan, V. (2006). Influence of selected Indian immunostimulant herbs against white spot syndrome virus (WSSV) infection in black tiger shrimp, *Penaeus monodon* with reference to haematological, biochemical and immunological changes. Fish & shellfish immunology, 21(4), 372-384.

Dubey, M. K., Khati, A., & Chauhan, R. S. (2016). Immunostimulatory and growth promoting potential of *Tinospora cordifolia* (Thunb.) Miers on fingerlings of Amur carp. Indian journal of experimental biology, 54(10), 659–663.

El Basuini, M. F., Teiba, I. I., Shahin, S. A., Mourad, M. M., Zaki, M. A., Labib, E. M., ..., Dawood, M. A. (2022). Dietary Guduchi (*Tinospora cordifolia*) enhanced the growth performance, antioxidative capacity, immune response and ameliorated stress-related markers induced by hypoxia stress in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & shellfish immunology, 120, 337-344.

Gabriel, N. N., Qiang, J., He, J., Ma, X. Y., Kpundeh, M. D., Xu, P. (2015). Dietary Aloe vera supplementation on growth performance, some haemato-biochemical parameters and disease resistance against *Streptococcus iniae* in tilapia (GIFT). Fish & Shellfish Immunology, 44(2), 504-514.

Gabriel, N.N., Wilhelm, M.R., Habte-Tsion, HM. et al. (2019). Effect of dietary Aloe vera polysaccharides supplementation on growth performance, feed utilization, hemato-biochemical parameters, and survival at low pH in African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. Int Aquat Res 11, 57–72.

Jin, M., Xiong, J., Zhou, Q. C., Yuan, Y., Wang, X. X., Sun, P. (2018). Dietary yeast hydrolysate and brewer's yeast supplementation could enhance growth performance, innate immunity capacity and ammonia nitrogen stress resistance ability of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish & shellfish immunology, 82, 121–129.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของ มหาวิทยาลัยบูรพา ตั้งแต่ 19/06/2021
โดย ธนาถรณ์ ศรีเพชร (1539800388)
ภาควิชาเคมีและเคมีอุตสาหกรรม (TNRR)

Kumar, R. M., Rao, A. C., Daggula, N., Guguloth, G., Das, B. Y., Indhuri, A. (2019). Growth promoter effect of ginger, garlic and fenugreek on Pacific white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(2), 2993-3001.

Latha, C., Krishnakumar, V., & Munuswamy, N. (2020). Growth, survival and haemato-biochemical profiles of the freshwater catfish, *Pangasius sutchi* (Fowler, 1937) fingerlings fed on *Tinospora cordifolia* Leaf extract supplemented diet. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 24(1), 249-262.

Lawhavinit, O. A., Sincharoenpoka, P., Sunthornandh, P. (2011). Effects of ethanol tumeric (*Curcuma longa* Linn.) extract against shrimp pathogenic *Vibrio spp.* and on growth performance and immune status of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Agriculture and Natural Resources, 45(1), 70-77.

Mahdavi, M., Hajimoradloo, A., Ghorbani, R. (2013). Effect of Aloe vera extract on growth parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). World Journal of Medical Sciences, 9(1), 55-60.

Peñaflorida V. D., Virtanen E. (1996). Growth, survival and feed conversion of juvenile shrimp (*Penaeus monodon*) fed a betaine/amino acid additive. The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 48(1), 3-9.

Poongodi, R., Bhavan, P. S., Muralisankar, T., Radhakrishnan, S. (2012). Growth promoting potential of garlic, ginger, turmeric and fenugreek on the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii.* International Journal of Pharma and Bio Sciences, 3(4), 914-926.

Rahardjo, S., Vauza, M. A. T., Rukmono, D., & Wiradana, P. A. (2022). Supplementation of hairy eggplant (*Solanum ferox*) and bitter ginger (*Zingiber zerumbet*) extracts as phytobiotic agents on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 9(1), 78.

Sankar, G., Elavarasi, A., Sakkaravarthi, K., & Ramamoorthy, K. (2011). Biochemical changes and growth performance of black tigher shrimp larvae after using *Ricinus communis* extract as feed additive. International Journal of PharmTech Research, 3(1), 201-208.

Schleder D.D., da Rosa, J.R., Guimarães, A.M. et al. (2017). Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. J Appl Phycol 29, 2471–2477.

Soowannayan, C., Boonmee, S., Puckcharoen, S., Anatamsombat, T., Yatip, P., Ng, W. K., ... & Withyachumnarnkul, B. (2019). Ginger and its component shogaol inhibit Vibrio biofilm formation in vitro and orally protect shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Aquaculture, 504, 139-147.

Trejo-Flores, J. V., Luna-González, A., Álvarez-Ruíz, P., Escamilla-Montes, R., Peraza-Gómez, V., Diarte-Plata, G., ..., Rubio-Castro, A. (2016). Protective effect of Aloe vera in *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and white spot syndrome virus. Aquaculture, 465, 60-64.

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยบูรพา 19/06/2024
โดย ธนพล ศรีเพชร (05398038)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ (TNRR)

Upreti, P., Chauhan, R. S. (2018). Effect of leaf powder of giloy (*Tinospora cordifolia*) in fish feed on survival and growth of post larvae of *Catla catla*. Journal of Applied and Natural Science, 10(1), 144-148.

Vanichkul, K., Areechon, N., Kongkathip, N., Srisapoome, P., & Chuchird, N. (2010). Immunological and bactericidal effects of turmeric (*Curcuma longa* Linn.) extract in pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei* Boone). Agriculture and Natural Resources, 44(5), 850-858.

Vasagam K.P.K., Ramesh S., Balasubramanian T. (2005). Dietary value of different vegetable oil in black tiger shrimp *Penaeus monodon* in the presence and absence of soy lecithin supplementation: Effect on growth, nutrient digestibility and body composition. Aquaculture. 250(1-2); 317-327.

14. ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะสำหรับการวิจัยต่อไป

ควรมีการทดลองการวัดผลการเจริญในกุ้งด้วยการกินอาหารในระยะยาวในขนาดบ่อเลี้ยงที่ใหญ่ขึ้น ทดสอบปริมาณสัดส่วนของบอระเพ็ดที่ผสมในอาหารกุ้งต่อการเจริญของกุ้งขาว

15. ภาคผนวก

☐ บทความที่ตีพิมพ์แล้ว (Reprint)

Sathapondecha, P., Nonsung, M., & Chotigeat, W. (2022). Stimulatory effect of peritrophin on vitellogenesis in female banana shrimp, *Fenneropenaeus merguiensis*. *Aquaculture Research*, 00, 1– 15. https://doi.org/10.1111/are.16097

เอกสารฉบับนี้ดาวน์โหลดเมื่อวันที่ 19/06/2024
โดย ธนดล ศรีเพชร ID5398G38
จากระบบคลังข้อมูลงานวิจัยไทย (TNRR)