บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันความนิยมในการบริโภคกุ้งมีมาก ส่งผลให้กุ้งมีราคาสูงการเพาะเลี้ยงกุ้งจึงเป็นอุตสาหกรรมเกษตรที่สำคัญ ประเทศไทยสามารถส่งออกกุ้งจากการเพาะเลี้ยงเป็นอันดับหนึ่งของโลกมาตั้งแต่ปี 2534 คิดเป็นมูลค่าหลายหมื่นล้านบาทในปี 2543 กุ้งแช่แข็งและกุ้งปรุงแต่งไม่บรรจุภาชนะอัดลม มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกเป็นอันดับหนึ่งและสองตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นมูลค่ารวมประมาณ เก้าหมื่นล้านบาท และในสองเดือนแรกของปี 2544 มีมูลค่าการส่งออกกุ้งสูงถึง หนึ่งหมื่นสี่พันล้านบาท จากธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งได้นำมาซึ่งธุรกิจอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น การผลิตวัตถุดิบเพื่อทำอาหารกุ้ง อุปกรณ์ต่างๆ อาหารกุ้ง ยาและสารเคมี ผู้ซื้อขายกุ้ง ผู้แปรรูปและการส่งออกเป็นต้น ธุรกิจดังกล่าว ส่งผลให้มีเงินตราหมุนเวียนภายในประเทศ และนำเงินตราต่างประเทศเข้าประเทศเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการช่วยพยุงเศรษฐกิจ แต่ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งก็พบกับปัญหาอุปสรรคมากมาย ถึงแม้ว่า ประเทศไทยในปัจจุบันจะได้รับการยอมรับว่าเป็นผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งเป็นอันดับหนึ่งก็ตาม แต่เกือบทั้งหมดเป็นกุ้งกุลาดำที่ได้จากการเพาะเลี้ยง

ในจำนวนกุ้งทะเลหลายชนิด กุ้งแชบ๊วย นับว่าเป็นกุ้งทะแลที่จับในธรรมชาติมากและมีมูลค่าเศรษฐกิจสูงซึ่งส่งผลทำให้มีการทำประมงกุ้งแชบ๊วยเกินกำลังผลิตที่สมดุลธรรมชาติ ส่งผลให้ทรัพยากรกุ้งแชบ๊วยมีปริมารลดลงอย่างรวดเร็ว และเนื่องจากการเพาะเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยมีน้อยจากการสำรวจการเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นรายจังหวัดเมื่อปี 2541 พบการเลี้ยงกุ้งแชบ๊วยเพียง 1 % ของผลผลิตการเลี้ยงกุ้งทั้งหมดโดยพบที่จังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม จันทบุรี นครศรีธรรมราช เป็นต้น (http://www.oae.go.th/statistic)

ลูกกุ้งเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงกุ้ง ถ้าลูกกุ้งขาดคุณภาพมีโรคอ่อนแอ ก็จะเกิดความเสียหายในการเพาะเลี้ยง ปัจจุบันแม่กุ้งได้จากทะเลลึกซึ่งหายากและราคาแพงขึ้นเรื่อยๆ อันเนื่องมาจากการจับกุ้งทะเลมาบริโภคและส่งออกมากขึ้นนั้นเอง แม่กุ้งที่นำมาจากทะแลต้องมีการบีบก้านตาเพื่อให้รังไข่เจริญเติบโตก่อนผสมพันธุ์ การบีบก้านตาทำให้แม่กุ้งอ่อนแอ และตายไป (Benzie, 1998)

สาเหตุการตายเนื่องมาจากบริเวณก้านตาเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตฮอร์โมนหลายชนิด เช่น ฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่ (Gonad Inhibiting Hormone (GIH)) (Fingerman, 1987) ฮอร์โมนที่ควบคุมปริมาณน้ำตาลในเลือด (Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH)) (De Kleijn *et al.*, 1992) และฮอร์โมนที่ควบคุมการลอกคราบ (Molt inhibiting Hormone (MIH)) (Quackenbush, 1986) ฮอร์โมนเหล่านี้มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของกุ้ง ในการบีบก้านตาจะเป็นการลดปริมาณ GIH ลงแต่ในขณะเดียวกันฮอร์โมนอื่นๆที่จำเป็นต่อกลไกต่างๆ ก็ลดลงด้วยทำให้กุ้งอ่อนแอ

GIH ถูกผลิตขึ้นที่ X-organ sinus gland บริเวณก้านตา (Kallen and Meusy, 1989) พบได้ทั้งตัวผู้และตัวเมีย (De Kleijin *et al.*, 1992) เป็นฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ยับยั้งการสร้าง vitellin ในกุ้งตัวเมีย vitellin ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของไข่ Yano และ Chinzei (1987) พบว่า ใน *Penaeus japonicus* โปรตีนดังกล่าวถูกผลิตขึ้นที่รังไข่ Aquilar และคณะ (1992) ได้กล่าวอ้างถึงการทดลองของ Gorell and Gilbert (1971) และ Eastman-Reks and Fingerman (1984) ซึ่งพบว่า GIH สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในรังไข่ของ *Uca purilalor* อีกทั้งยังกล่าวอ้าวถึงการทดลองของ Jugan (1985) และ Jugan and Soyez (1985) ซึ่งพบว่า GIH สามารถยับยั้งการเกาะของ vitellogenin กับ receptor ที่ผนังเมมเบรนของ oocyte ของ *Macrobrachium rosenbergii* ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า GIH มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างไข่ของ Crustacean ได้มีรายงาน ฮอร์โมน GIH จากก้านตากุ้ง *Homarus americanus* พบว่ามีน้ำหนักประมาณ 9,135 Da (Soyez *et al.*, 1991) ต่อมามีการศึกษาการโคลนยีน GIH และทราบการเรียงตัวของกรดนิวคลีอิก ใน *H. americanus* เช่นกัน

(De Kleijin *et al.*, 1992) หากแต่ยังไม่พบรายงานการศึกษาฮอร์โมน GIH ในกุ้งแชบ๊วย จากแหล่งใดเลย ดังนั้น หากมีการศึกษาเกี่ยวกับ GIH ในลักษณะต่างๆ เพื่อหาวิธีการยับยั้ง GIH ซึ่งจะมีประโยชน์ในแง่พัฒนาคุณภาพของแม่กุ้งที่สมบูรณ์ซึ่งจะทำให้ได้ลูกกุ้งที่สมบูรณ์ และไม่ทารุณสัตว์ นอกจากนั้นยังชักนำให้เกิดแม่พันธุ์กุ้งจากกุ้งเลี้ยงได้ในอนาคต

1.2 บทตรวจเอกสาร

1.2.1 อนุกรมวิธานของกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Superorder Eucarida

Order Decapoda

Suborder Natantia

Section Penaeidea

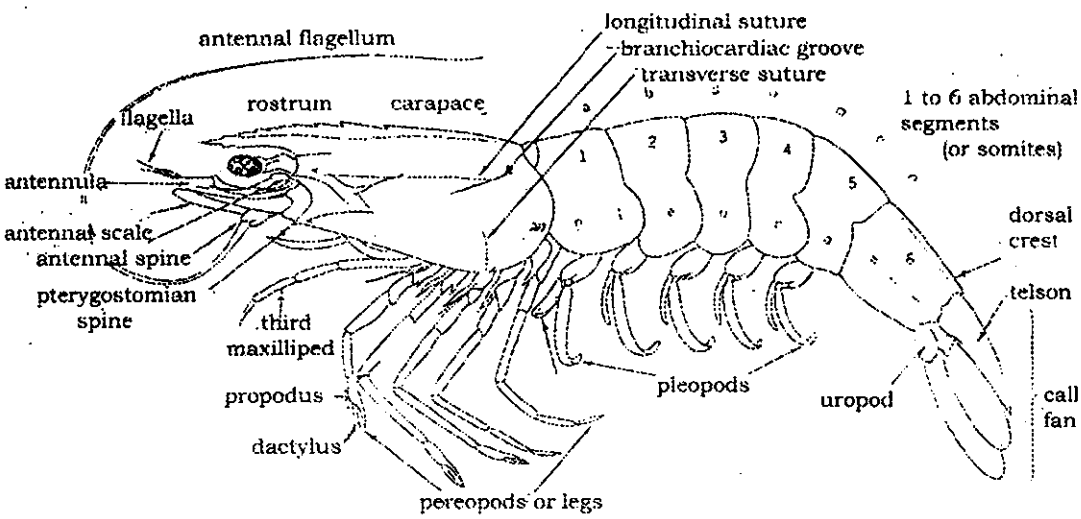
Family Penaeidae

Subfamily Penaeidae

1.2.2. คุณลักษณะของกุ้งแชบ๊วย

กุ้งแชบ๊วย มีลักษณะกรียาว ตรง โคนกรีมีลักษณะเป็นรูปสามเหลี่ยมปลายกรีจะยาวเลยปลายก้านหนวดคู่ที่ 1 เล็กน้อย (ในกุ้งที่มีขนาดเล็กกรีจะมีขนาดยาวมากและโค้งเรียว โคนกรีไม่ยกสูงขึ้นเป็นรูปสามเหลี่ยม) ขอบด้านบนมีฟัน 7-8 ซี่ ขอบด้านล่างมีฟัน 4-5 ซี่ สันและร่องข้างกรียาวไม่ถึงฟันกรีที่อยู่เหนือกระเพาะอาหาร หรืออาจจะยาวประมาณฟันกรีที่อยู่เหนือกระเพาะอาหารแต่ไม่ยาวเลย ทั้งกุ้งเพศผู้และเพศเมียมี dactylus ยาวประมาณ 0.5-0.6 เท่าของ propodus แต่กุ้งเพศผู้จะมีกลุ่มขนบริเวนโคนของ dactylus ลำตัวมีสีครีมปนเหลือง มีจุดสีน้ำตาล สีเขียวแก่ และเขียวอ่อน กระจายอยู่ประปราย สันบนปล้องท้อง และกรีมีสีน้ำตาลปนแดง หนวดคู่ที่ 2 มีสีน้ำตาลแดงไม่มีลาย ขาเดินและระยางค์ว่ายน้ำ มีสีเหลืองออกน้ำตาล แพนหางและระยางค์ว่ายน้ำ มีสีแดง (มหาวิทยาลัยบูรพา, 2544)

(A)



(B)

รูปที่ 1.1 (A) กุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis*

(B) สันฐานวิทยาของกุ้ง (Carpenter and Niem, 1998)

1.2.3 ชีววิทยาของกุ้งแชบ๊วย

1.2.3.1 วงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย

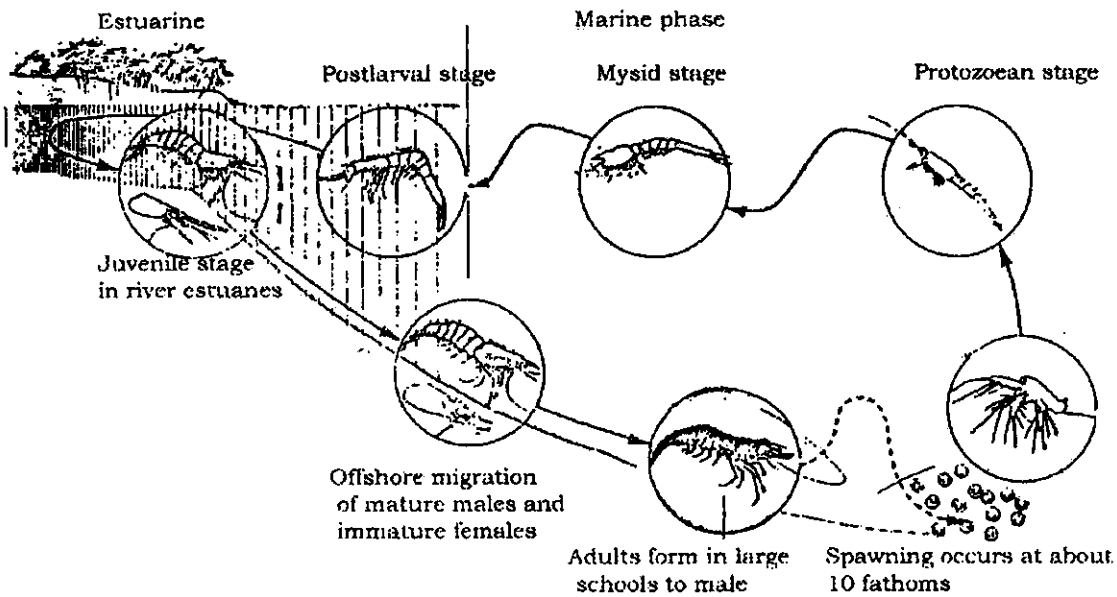
การเจริญพัฒนาของลูกกุ้งแชบ๊วยตั้งแต่แม่กุ้งวางไข่จนถึงระยะ first Postlarva ใช้ระยะเวลาประมาณ 10 วัน ประกอบด้วย 4 ระยะใหญ่คือ Nauplius, Protozoea, Mysis และ Postlarva จากภาพที่ 1.2 แสดงวงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วยมีการแพร่กระจายทั้งบริเวณชายฝั่งทะเลที่เป็นน้ำกร่อยและทะเลเปิดโดยกุ้งระยะ postlarva จะย้ายเข้ามาอาศัยพื้นที่ป่าชายเลนประมาณ 1-2 เดือนขึ้นกับสภาพแวดล้อมของพื้นที่จนถึงระยะ juvenile อายุประมาณ 2-3 เดือนจะเคลื่อนย้ายออกสู่บริเวณชายฝั่งน้ำตื้นจนเจริญเข้าสู่ระยะก่อนวัยเจริญพันธุ์ (subadult) ซึ่งมีอายุประมาณ 3-4 เดือน จึงเคลื่อนย้ายออกสู่ทะเลเปิด และเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะเจริญพันธุ์เพื่อแพร่ขยายพันธุ์ต่อไป (มัทนา บุญยุบล, 2539 อ้างถึงโดย สุชาติ สว่างอารีย์รักษ์, เพ็ญศรี บุญเรืองและข้อดีเยาะ พรชัย, 2542)

1.2.3.2 ฤดูการวางไข่ของกุ้งแชบ๊วย

จากการศึกษาของ สุชาติ สว่างอารีย์รักษ์, เพ็ญศรี บุญเรืองและ ค้อดีเยาะ พรชัย (2542) พบว่าการเคลื่อนย้ายออกของกุ้งขนาดใหญ่ระยะต่างๆมีตลอดปี และพบปริมาณมากช่วงฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ โดยมีปริมาณน้ำฝนเป็นปัจจัยสำคัญต่อขนาดการเคลื่อนย้ายออกของกุ้งขนาดใหญ่จากการศึกษากุ้งแชบ๊วยบริเวณคลองกระเปอร์พบว่ากุ้งแชบ๊วยบริเวณนี้มีฤดูการวางไข่ที่ชุกชุมอยู่ 2 ช่วงคือ ช่วงแรก ฤดูมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ (เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม) และช่วงที่ 2 ฤดูมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ (เดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม)

จากการศึกษาของ มาโนช รุ่งราตรี และ วันชัย ไล้ทิม (2535) พบว่ากุ้งแชบ๊วยบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกมีการวางไข่ตลอดปี โดยเดือนที่พบมากคือ เดือน มกราคม มิถุนายน กันยายน และ ธันวาคม โดยมีระยะการวางไข่สูงสุด 2 ช่วง คือ มิถุนายนถึงกันยายนและ ธันวาคมถึงมกราคม กุ้งแชบ๊วยที่อาศัยอยู่นอกชายฝั่งความลึกตั้งแต่ 16 เมตรขึ้นไปเป็นกุ้งที่สมบูรณ์เพศแล้ว ส่วนกุ้งที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งส่วนใหญ่เป็นกุ้งระยะ juvenile

จากการศึกษาฤดูการวางไข่ของกุ้งแชบ๊วย *P. merguiensis* ในบริเวณทะเลจังหวัดสงขลา โดย นิเวศน์ เรืองพานิช, คณิต ไชยาคำ และ ประวิทย์ อินทรโชติ (2517) พบว่า กุ้งแชบ๊วยมีไข่ตลอดปี ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคมกุ้งแชบ๊วยมีไข่แก่มากที่สุด และกุ้งแชบ๊วยมีไข่แก่มากรองลงมาระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม ดังนั้นฤดูการวางไข่ของกุ้งแชบ๊วยคือ เดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม

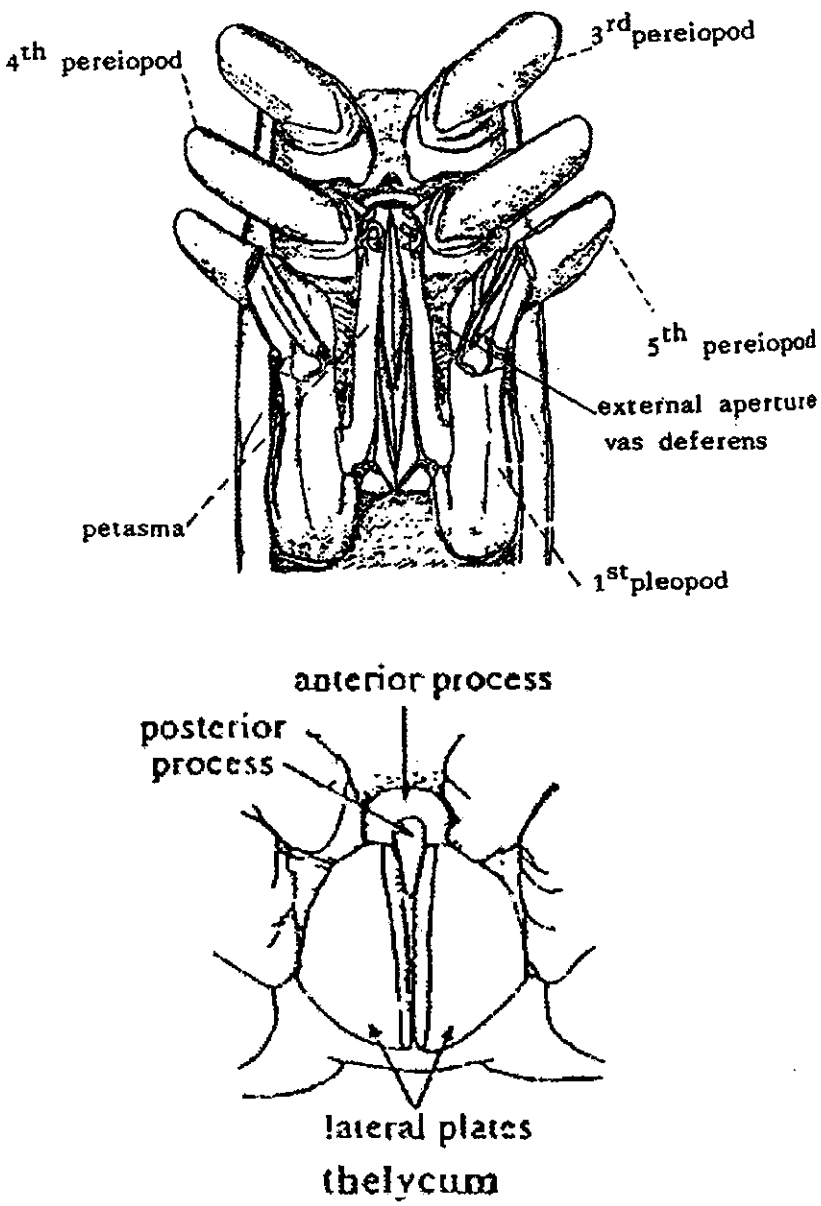


รูปที่ 1.2 วงจรชีวิตของกุ้งแชบ๊วย (ประจวบ หลำอุบล, มปป)

1.2.3.3 การสืบพันธุ์ของกุ้ง

กุ้งเพศผู้มีอวัยวะเพศเรียกว่า petasma ดัดแปลงพัฒนามาจากแขนงอันใน (endopod) ของระยางค์ว่ายน้ำคู่ที่ 1 อวัยวะเพศเมียเรียกว่า thelycum พัฒนามาจาก sternalplate แสดงดังรูปที่ 1.3 จากการศึกษาของ มาโนช รุ้งราตรี และ วันชัย ไล้ทิม (2535) พบว่า ขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยต่ำสุดของกุ้งแชบ๊วยเพศเมียที่เริ่มมีไข่ระยะที่ 2 มีค่าเท่ากับ 15.25 เซนติเมตร ในขณะที่ทวีป บุญวานิช (2536) ศึกษาไว้มีค่าเท่ากับ 14.6 เซนติเมตรซึ่งกุ้งแชบ๊วยสมบูรณ์เพศเหล่านี้จะอาศัยอยู่นอกชายฝั่งความลึกตั้งแต่ 16 เมตร ขึ้นไป

เมื่อกุ้งเพศผู้และเพศเมียพร้อมที่จะผสมพันธุ์ หมายถึงตัวเมียลอกคราบแล้ว ประมาณ 3-6 ชั่วโมง จากนั้นจะมีการเกี้ยวพาราสีกัน โดยกุ้งตัวผู้จะใช้ก้ามคู่ที่ 2 กอดรัดตัวเมีย และพยายามทำความสะอาดบริเวณด้านท้อง (ventral thoracic) ของตัวเมีย และจับหงายขึ้น พร้อมทั้งปล่อยน้ำเชื้อซึ่งมีลักษณะเป็นสารเหนียวข้น (gelatinous mass) ไปเก็บที่ถุงเก็บน้ำเชื้อด้านในของ thelycum ในกุ้งตัวเมีย รอการวางไข่ ต่อไป ซึ่งไข่จะปล่อยออกทางช่องเปิดที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ในขณะเดียวกันน้ำเชื้อจากถุงเก็บน้ำเชื้อตัวเมียก็จะไหลออกจากรูเปิดโคนขาคู่ที่ 4 มาผสมกันในน้ำ ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะจมชั่วระยะเวลาหนึ่งประมาณ 12-14 ชั่วโมง จึงจะฟักออกเป็นตัว ส่วนมากการวางไข่มักจะเกิดขึ้นก่อนสว่าง (ประจวบ หลำอุบล , มปป)



รูปที่ 1.3 แสดงอวัยวะเพศผู้ และอวัยวะเพศเมีย (ประจวบ หล้าอุบล, มปป; Carpenter and Niem, 1998)

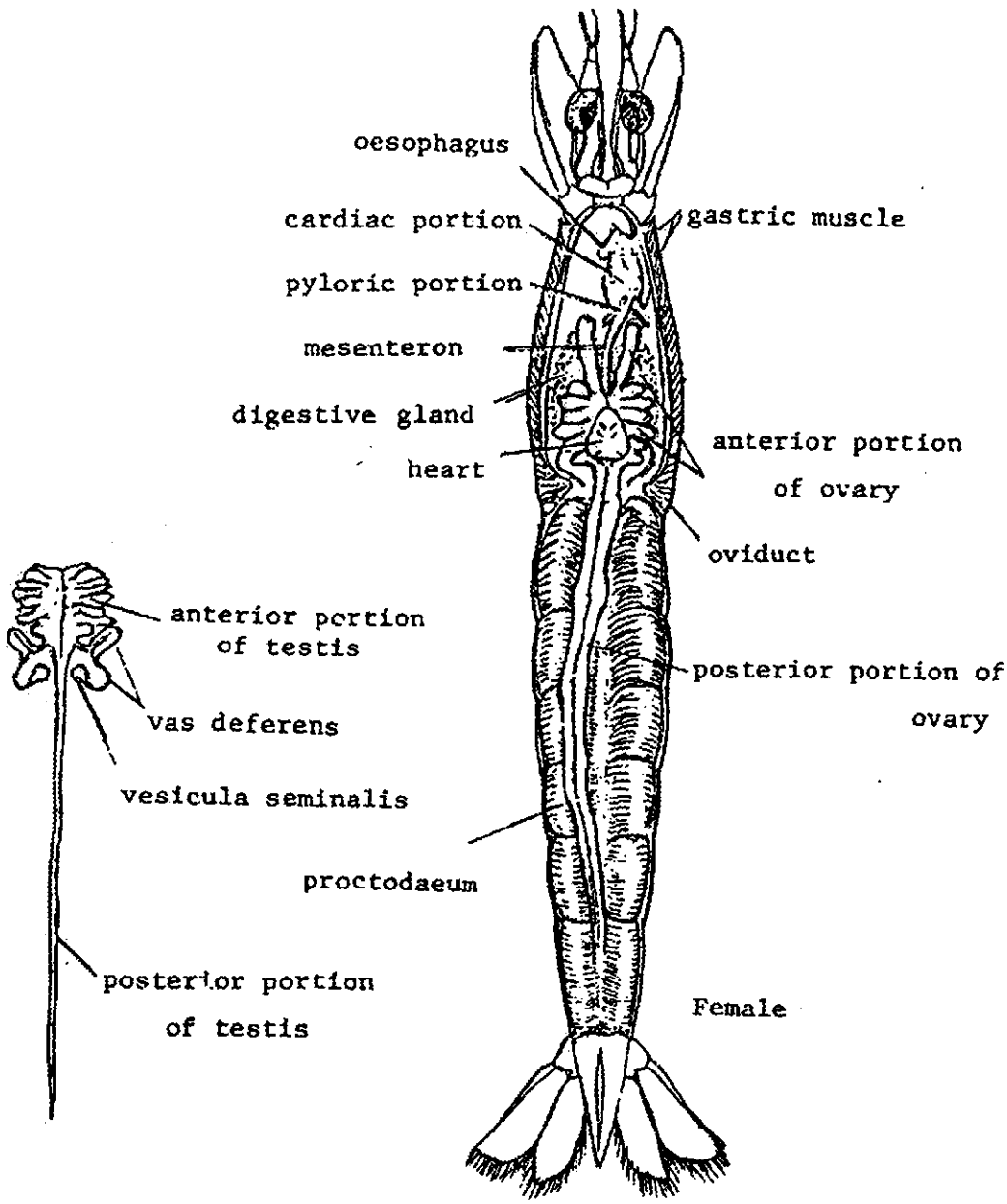
1.2.3.4 รังไข่และการสร้างโปรตีนไข่

รังไข่ (ovaries) มีลักษณะเป็นท่อคู่ อยู่ที่ส่วนหัวและลำตัวของกุ้งดังรูปที่ 1.4 การดูระยะพัฒนารังไข่ซึ่งศึกษาในกุ้งกุลาดำแบ่งออกเป็น 5 ระยะซึ่งอาศัยดูจากเงาของรังไข่โดยมองจากแสงสว่างที่ส่องผ่านตัวกุ้ง แสดงดังรูปที่ 1.5 (เรณู ยาชิโร, 2533) ซึ่งจะเห็นได้ว่า ระยะ 0 หลังกุ้งจะใสไม่มีรอยเส้นดำ ระยะที่ 1 มีเส้นดำเล็กกลางหลังตามความยาว ระยะที่ 2 เส้นเริ่มทึบใหญ่ขึ้นซึ่งระยะที่ 1และระยะที่ 2 เรียกระยะไข่อ่อน ระยะที่ 3 เส้นทึบเริ่มมีสามเหลี่ยมบริเวณปล้องแรกหรือปล้องที่ 2 ของลำตัว บางคนเรียกว่าเป็นรูปผีเสื้อ หรือรูปเพชร ส่วนอื่นๆของรังไข่ตามแนวยาวตามลำตัวก็ใหญ่ขึ้นด้วย เรียกระยะนี้ว่าระยะไข่แก่ ระยะที่ 4 เมื่อรังไข่ตลอดลำทึบขยายเต็มที่ ระยะที่ 5 เห็นขอบของรังไข่จางๆ แต่ไม่มีส่วนทึบแสง เป็นระยะวางไข่แล้ว

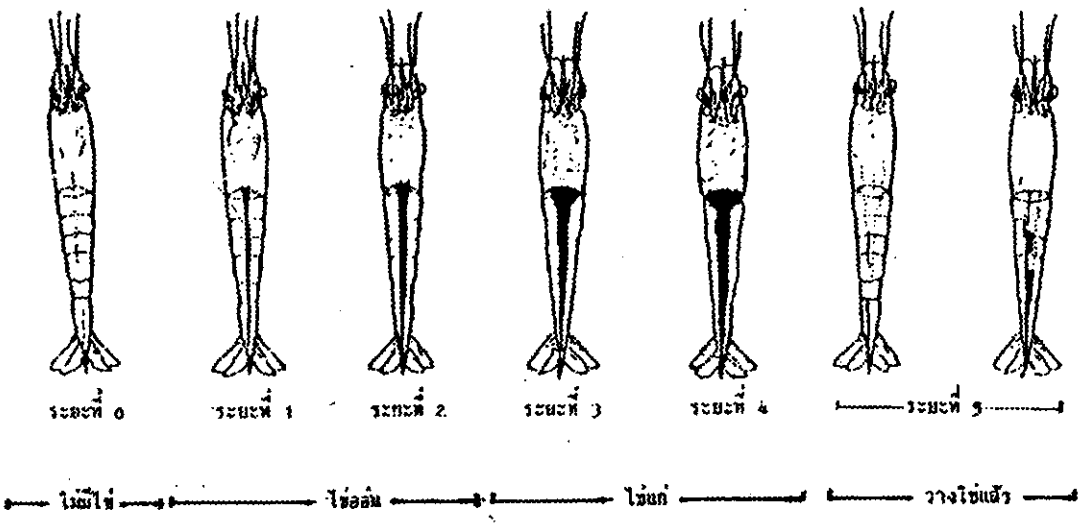
ระยะเหล่านี้เมื่อวัดความกว้างของรังไข่ตั้งแต่ระยะที่ 1 ถึงระยะที่ 4 นำมาเปรียบเทียบกับความกว้าง ของลำตัวจะได้ค่าดัชนีรังไข่ (ovary index) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

$$\text{ดัชนีไข่} = \frac{\text{ความกว้างของรังไข่}}{\text{ความกว้างของลำตัว}} \times 100$$

ระยะพัฒนารังไข่จากการดูเงารังไข่	ดัชนีรังไข่จากการวัดเงารังไข่ (%)
1	<20-35
2	36-49
3	50-59
4	>60-87



รูปที่ 1.4 แสดงรังไข่ของกุ้งทะเล (ประจวบ หลำอุบล, มปป)



รูปที่ 1.5 แสดงระยะการพัฒนาของรังไข่ (เรณู ยาชิโร, 2533)

ในระหว่างที่มีการเจริญหรือพัฒนาการรังไข่ของสัตว์พวก Crustacean จะมีการสร้างและสะสมโปรตีน vitellin โดยสะสมอยู่ในไข่แดงในรังไข่ โปรตีนไข่ (vitellin) เชื่อว่าสร้างมาจาก vitellogenin ซึ่งเป็นโปรตีนจากเลือด (blood serum precursor) โดยสร้างที่ตับในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrate) และสร้างที่เนื้อเยื่อไขมัน (fat body) ในสัตว์จำพวกแมลง (insects) จากการศึกษาระดับ vitellogenin ในเลือดกับการพัฒนาการของรังไข่ของกุ้งตะกาด *Metapenaeus affinis* (ศิวาพร ลงยันต์ และคณะ, 2537) โดยการเก็บตัวอย่างเลือดของกุ้งตะกาด *M. affinis* ที่มีรังไข่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ และระยะหลังการวางไข่โดยตรวจหาปริมาณ vitellogenin ด้วยวิธี competitive ELISA เทียบกับสารสกัด vitellin มาตรฐานพบว่าระดับ vitellogenin ในเลือดจะอยู่ในระดับต่ำในระยะต้นๆของการเจริญของรังไข่ และเพิ่มสูงขึ้นในกุ้งที่มีระยะเจริญในระยะที่ II และ III ส่วนในระยะที่ IV พบว่าระดับ vitellogenin ในเลือดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับในกุ้งลอบสเตอร์ *H. americanus* และกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* จากการทดลองดังกล่าวทำให้เชื่อว่า vitellogenin ในเลือดเป็นดัชนีที่ดีสำหรับแสดงพัฒนาการของรังไข่

vitellin เป็นโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ มีหลายหน่วยแล้วแต่ชนิดของสัตว์ โปรตีนนี้จะอยู่รวมกันกับไขมันและน้ำตาล (lipoglycoprotein) ในระหว่างการสร้างไข่จะพบโปรตีน vitellogeninในเลือดของสัตว์เพศเมีย ซึ่งมีลักษณะคล้าย vitellin

จากการศึกษาลักษณะของ vitellin จากรังไข่ของกุ้ง *Parapenaeus longirostris* โดย Tom และคณะ (1987) พบว่า โปรตีน vitellin ที่แยกได้ สามารถย้อมติดสี PAS (periodic acid leucofuchsin) ซึ่งเป็นสีย้อมน้ำตาล แสดงว่า vitellin เป็น glycoprotein และเมื่อย้อมด้วยสี sudan black B ซึ่งเป็นสีย้อมไขมัน พบว่า vitellin มีส่วนประกอบของไขมันอยู่ด้วย และเมื่อนำโปรตีน vitellin มาทำ SDS-PAGE พบว่าโปรตีนประกอบด้วย 2 หน่วย ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 45,000 และ 66,000 ดาลตัน

Chen และ Chen (1993) ได้ทำการแยกและศึกษาลักษณะของ vitellin จากไข่ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จากการทดลอง vitellin ซึ่งเป็น lipoglycoprotein เมื่อนำมาทำ SDS-PAGE พบว่าประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 168, 104, 83, และ 74 กิโลดาลตัน

Tsukimura *et al.* (2000) ได้ศึกษาลักษณะของโปรตีน vitellin ในกุ้ง *Sicyonia ingentis* พบว่า vitellin มีน้ำหนักโมเลกุล 322 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ 182,91 และ 85 กิโลดาลตัน

Yano และ Chinzei (1987) ได้ศึกษาการสร้าง vitellin ในกุ้ง *P. japonicus* โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อของรังไข่และ hepatopancreas จากกุ้งตัวเมียในระยะเริ่มผลิตโปรตีนไข่ (early vitellogenic period) บ่มในหลอดทดลองซึ่งมีอาหาร เลี้ยงเซลล์ที่มี ^{14}C-amino acid อยู่ด้วยพบว่า ทั้งรังไข่ และ hepatopancreas สามารถนำ ^{14}C-amino acid มาสร้างเป็นโปรตีนในหลอดทดลองได้ เมื่อนำโปรตีนดังกล่าวมาตกตะกอนร่วมกับ anti-vitellin-serum นำมาแยกโดย electrophoresis และ นำมาทำ fluorography พบว่า มีเพียงรังไข่เท่านั้นที่เป็นแหล่งในการสังเคราะห์โปรตีน vitellin ในกุ้ง *P. japonicus* และจากการทำ immunofluorescence พบ anti-vitellin-IgG ติดบริเวณ folicle cells ของรังไข่ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า follicle cells เป็นแหล่งที่ผลิตโปรตีน vitellin ในกุ้ง *P. japonicus* หากแต่การศึกษาของ Quackenbush (1989) ได้ศึกษาการสังเคราะห์โปรตีนไข่ในหลอดทดลอง โดยใช้เนื้อเยื่อรังไข่ และ hepatopancreas ของกุ้ง *Penaeus vanamei* พบว่าทั้งรังไข่และ hepatopancreas เป็นแหล่งในการผลิตหน่วยย่อยของโปรตีนไข่ในกุ้ง *P. vanamei*

Fainzilber *et al.* (1992) ได้ทดลองเลี้ยงเนื้อเยื่อ Subepidermal adipose tissue (SAT) และ hepatopancreas ของกุ้ง *Penaeus semisulcatus de Haan* ในอาหารที่มี ^{14}C-Leucine จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนที่สร้างขึ้นใหม่ โดยวิธี trichloroacetic acid precipitation และ วัดโปรตีน vitellin ที่สร้างใหม่โดย radioimmuno precipitation โดยใช้ แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อ vitellin จากการทดลองไม่พบการสังเคราะห์ vitellin จาก SAT ที่แยกจากกุ้งเพศเมียในหลายๆระยะการพัฒนารังไข่ส่วน hepatopancreas พบว่ามีการผลิตโปรตีน vitellin แต่มีปริมาณน้อยกว่า 15 % เมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด ในขณะที่รังไข่สามารถผลิตได้ 38 % (อ้างถึง Browdy *et al.*, 1990) จึงสรุปได้ว่าการสร้างโปรตีนไข่จากภายนอกรังไข่ (extraovarian) ในกุ้ง *P. semisulcatus* มีปริมาณต่ำ ดังนั้นรังไข่จึงเป็นเนื้อเยื่อหลักในการผลิต vitellin

ต่อมา Tsutsui *et al.* (2000) ได้ทดลองโคลน cDNA ของโปรตีน Vitellogenin ในกุ้ง *P. japonicus* โดยเริ่มต้นจากการทำ N-Terminal amino acid scquence ของ 91 kDa subunit ของโปรตีน vitellin จาก sequence ที่ได้ทำให้พบ cDNA ที่แปรงเป็น amino acid ได้ 2,587 ตัว ซึ่งมีน้ำหนัก 287 กิโลดาลตัน และพบตำแหน่งที่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ทำให้โปรตีนแยกออกเป็น 2 หน่วย คือ 78 กิโลดาลตัน และ 206 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับ 91 และ 186 กิโลดาลตัน หน่วยของโปรตีนดังกล่าวที่ได้รายงานไว้แล้ว (Kawazoe *et al.*, 2000 อ้างถึงโดย Tsutsui *et al.*, 2000) จากการทำ Northern blot analysis พบ Vitellogenin mRNA ได้ทั้งในรังไข่และ hepatopancreas (follicle cells และ parenchymal cells ตามลำดับ) จากผลการทดลองนี้ชี้ว่า Vitellogenin สามารถผลิตได้ทั้งในรังไข่และ hepatopancreas ใน *P. japonicus*

1.2.4 ฮอร์โมน และปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไข่

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลมีแนวโน้มที่จะขยายตัว เนื่องจากมีความต้องการและนิยมบริโภคกุ้งมากขึ้น ด้วยเหตุนี้การควบคุมการเพาะพันธุ์กุ้งทะเล เพื่อให้ได้ลูกกุ้งที่สมบูรณ์ แข็งแรง ไม่มีโรค จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งทะเล ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการพัฒนารังไข่ในกุ้งหลายชนิด เช่น Crocos และ Kerr (1986) พบว่าแสงสว่างและอุณหภูมิ มีผลต่อการพัฒนาของรังไข่กุ้ง *Penaeus esculentus* และ Yano (1987) ได้ศึกษาผลของ 17α-hydroxy-progesterone ต่อการสร้างโปรตีน vitellogenin ในกุ้ง *P. japonicus* พบว่า 17α-hydroxy-progesterone กระตุ้นให้มีการสร้าง vitellogenin

นอกจากปัจจัยทางด้านสภาพแวดล้อม (แสงสว่างและอุณหภูมิ) และ สารเคมี เช่น 17α-hydroxy-progesterone แล้ว ฮอร์โมน (gonad-inhibiting hormone (GIH) หรือ vitellogenin-inhibiting hormone (VIH)) ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการพัฒนาของรังไข่ ซึ่งการตัดก้านตาเป็นการทำลาย ฮอร์โมน GIH เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างไข่ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Panouse ในปี 1943,1944 (อ้างอิงโดย Huberman, 2000) โดยศึกษา

ในกุ้ง *Palaemon serratus* ต่อมาก็มีการศึกษาเช่นเดียวกันในกุ้งหลายชนิด เช่น Yano (1984) ได้รายงานว่าการตัดก้านตาเพียงข้างเดียวในกุ้ง *P. japonicus* ทำให้อัตราการวางไข่ของกุ้งเพิ่มขึ้น 50 % และ Quackenbush และ Herrnkind (1981) ได้ศึกษาการตัดก้านตาในกุ้ง *Panalirus argus* พบว่าทำให้รังไข่มีการพัฒนาและใหญ่ขึ้นรวมทั้งยังพบว่า การลอกคราบเกิดขึ้นเร็วกว่าในกุ้งที่ใช้เป็นกุ้งควบคุมและเมื่อนำสารสกัดจากก้านตามาฉีดเข้าไปในกุ้งที่ตัดก้านตา ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่

ฮอร์โมนที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่ (gonad inhibiting hormone, GIH) ซึ่งเป็น Peptide ฮอร์โมน ถูกผลิตขึ้นที่ x-organ และถูกส่งไปตาม axon เพื่อสะสมที่ sinus gland (รูปที่1.6) จากการทดลองแยกสารสกัดจาก sinus gland ซึ่งแยกออกมาจากก้านตา ของกุ้ง Mexican crayfish *Procambarus bouvieri* (Huberman *et.al.*, 1995) โดยใช้ reverse-phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) ด้วย μBondapak-phenyl column พบ peptide 4 ชนิด คือ gonad-inhibiting hormone (GIH) molt-inhibiting hormone (MIH) crustacean hyperglycaemic hormone I (CHH–I) และ crustacean hyperglycaemic hormone II (CHH-II) ซึ่งทั้ง 4 ชนิด เรียกว่า CHH/MIH/GIH family มีการผลิตที่บริเวณเดียวกันคือ X-organ neurons (Kallen and Meusy, 1989; De Kleijn *et al*, 1992; Marco and Gade, 1999) GIH สามารถผลิตได้ทั้งกุ้งตัวผู้ และ กุ้งตัวเมีย ซึ่งเป็นไปได้ว่า GIH ในกุ้งตัวผู้ มีหน้าที่คล้ายๆกับ gonadotrophins ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) (De kleijn *et al*,1992)

การศึกษาคุณสมบัติของฮอร์โมนในกลุ่มนี้มีในกุ้งหลายชนิด แต่จะมีข้อมูลของ CHH และMIH มากกว่า (http://www3.icgeb.trieste.it) ทั้งนี้เนื่องจากขบวนการในการศึกษา CHH และ MIH ง่ายกว่า GIH และจากการศึกษาคุณลักษณะของ ฮอร์โมน GIH ในกุ้ง และ ปู พบว่า ในกุ้ง *P. bouvieri* ฮอร์โมน GIH มีน้ำหนัก โมเลกุล 8388 ± 2 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 72 ตัว มีลักษณะ N-blocked มีความเข็มข้นต่อ 1 ก้านตา ประมาณ 5.4 ng มีกรดอะมิโน Cysteines 6 ตัว เพื่อสร้างพันธะ Disulfide ซึ่งจะเป็นลักษณะของ peptide ฮอร์โมน ในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family (รูปที่ 1.7)

(Huberman *et al*,1995 ; Aguilar *et al*, 1992) ในปู *Cancer magister* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2000 ดาลตัน มีลักษณะทนความร้อนได้ดี (Bomirski *et al*, 1981) ใน *Armadillidium vulagre* พบว่ามีกรดอะมิโน 83 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 9485 ดาลตัน (Grève *et al*, 1999) ในกุ้ง Lobster, *H. americanus* ซึ่งศึกษาโดย Soyez และคณะ (1991) (อ้างโดย Fingerman, 1995) พบว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 77 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 9135 ดาลตัน และไม่มีการ block ที่ปลาย N-terminus.

1.2.4.1 กลไกการทำงานของฮอร์โมนที่ควบคุมการสร้างไข่

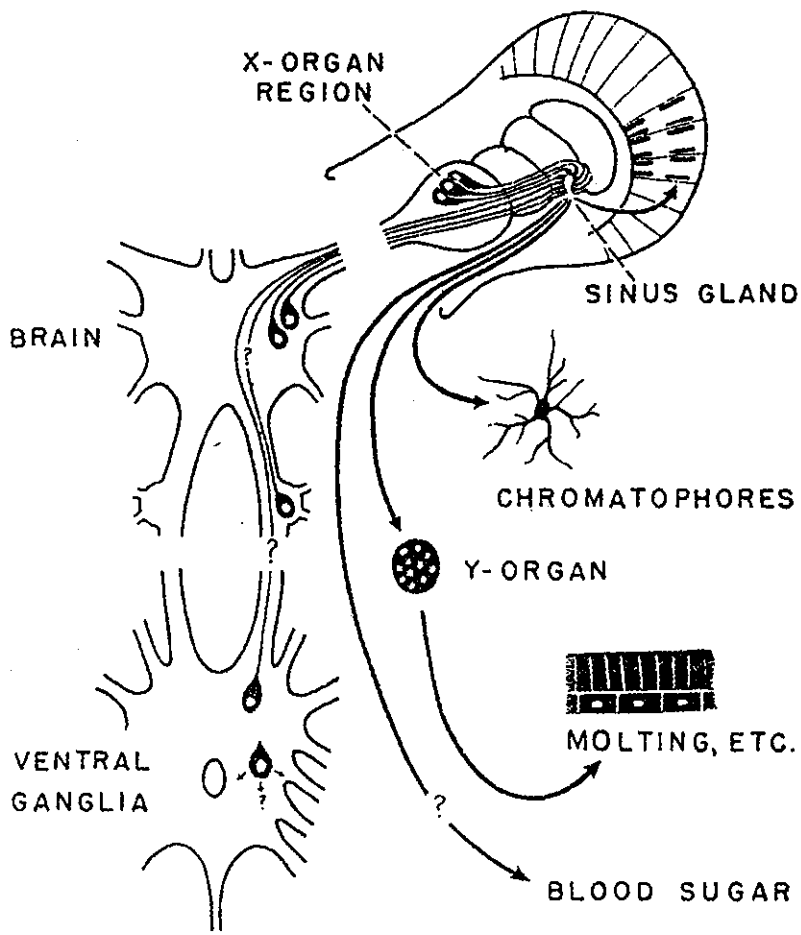
ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างโปรตีนไข่มีหลายชนิด จากรูปที่ 1.8 X-organ บริเวณก้านตา เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family GIH สามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในรังไข่ของ *U. purilalor* (Goreil and Gilbert, 1971; Eastman-Reks and Fingerman, 1984) และสามารถยับยั้งการเกาะของ Vitellogenin กับ receptor ที่ผนังเมมเบรนของ oocyte ของ *M. rosenbergii* (Jugan, 1985; Jugan and Soyez, 1985 อ้างโดย Aquilar *et al*., 1991) ดังนั้นการตัดก้านตาจึงเป็นการนำ ฮอร์โมนที่ยับยั้งการสร้างไข่ออกทำให้รังไข่เกิดการพัฒนา

จากรูปที่ 1.8 VSH (Vitellogenesis-stimulating hormone) หรือ GSH (gonad-stimulating hormone) ซึ่งผลิตบริเวณระบบเส้นประสาทส่วนกลาง คือ สมอง หรือ thoracic ganglion จากการนำสารสกัดจากบริเวณดังกล่าวมา ทดลองทั้งแบบ *in vivo* และ *in vitro* พบว่ามีผลกระตุ้นการสร้างโปรตีนไข่ใน oocytes ของกุ้ง *Paratya compressa* (Takayanagi *et al*., 1986)

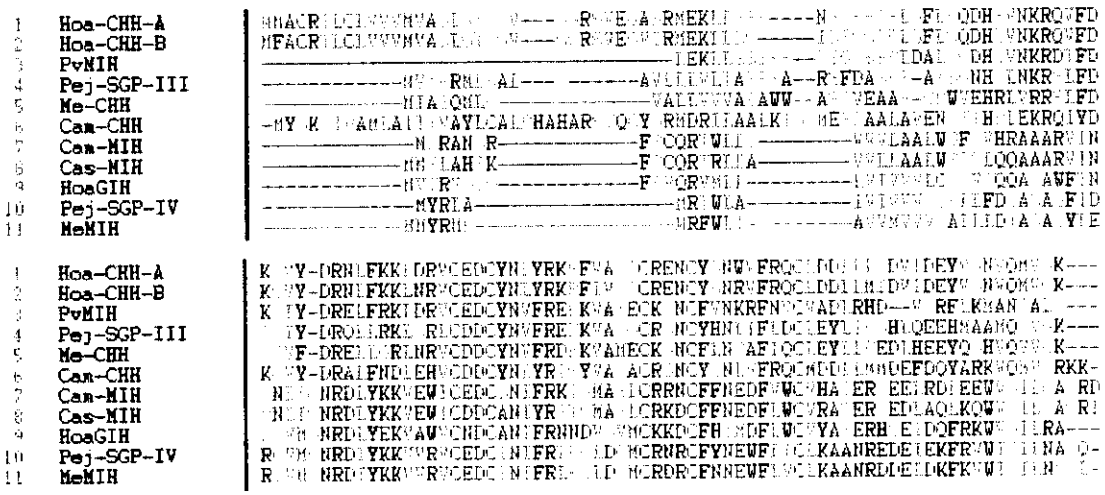
Methyl farnesoate (MF) มีลักษณะคล้ายกับ juvenile ฮอร์โมน ในสัตว์จำพวกแมลง ใน crustaceans ผลิตที่ mandibular organ (MO) MF ดูจะมีความเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ใน crustaceans ทั้งนี้เนื่องจากพบว่า ปริมาณ MF ในเลือด เพิ่มขึ้นในช่วงของการสร้างไข่และต่ำในช่วงไม่มีการสร้างไข่และ MO จะถูกยับยั้งการผลิต MF โดยฮอร์โมนจากก้านตาและถูกกระตุ้นการสร้าง MF โดยสารที่ผลิตจากบริเวณ สมองและ thoracic ganglion (Laufer *et al*., 1993)

20-hydroxyecdysone เป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการลอกคราบ (molting hormone, MH) ในสัตว์จำพวก Crustacea และฮอร์โมนนี้สร้างขึ้นที่ Y-organ ทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการลอกคราบ แต่อาจมีผลต่อการสร้างไข่ได้เนื่องจากมีรายงานว่า ในขณะที่มีการสร้างไข่ (vitellogenesis) ปริมาณของ ecdysteroids ในเลือดก็เพิ่มสูงขึ้น (Chaix and DeReggi, 1982: Lachaise *et al.*, 1981 อ้างถึงโดย Laufer *et al.*, 1993) แต่การศึกษาอื่นๆไม่พบความสัมพันธ์ของฮอร์โมนนี้กับการสร้างไข่ (Chang, 1984; Laufar *et al.*, 1988. อ้างโดย Laufer *et al.*, 1993) จากการทดลองของ พุทธ ส่องแสงจินดา (2532) ซึ่งศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Vitellogenin 20-hydroxyecdysone และการพัฒนาของเซลล์ไข่ในกุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis* de Man) พบว่า ปริมาณ Vitellogenin เฉลี่ยในเลือดกุ้งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการลอกคราบ และมากขึ้นจนมีปริมาณเฉลี่ยสูงสุดในระยะพักการลอกคราบแล้วจะลดลงอย่างช้าๆจนถึงระยะก่อนการลอกคราบ ปริมาณ Vitellogenin เฉลี่ยในเลือดกุ้งจะต่ำลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งชี้ให้เห็นว่า ฮอร์โมนควบคุมการลอกคราบอาจมีผลต่อการแปลี่ยนแปลงปริมาณ Vitellogenin ในเลือดกุ้ง จากการทดลองพบว่า ฮอร์โมน 20-hydroxyecdysone สามารถเพิ่มปริมาณ Vitellogenin ในเลือด แต่ฮอร์โมนปริมาณมากมีแนวโน้มจะลดปริมาณ Vitellogenin ในเลือดและการตัดก้านตาสามารถลดปริมาณ Vitellogenin ในเลือดได้มากกว่าการฉีดฮอร์โมน จากการทดลองจึงชี้ให้เห็นว่า 20-hydroxyecdysone อาจทำหน้าที่เป็นปัจจัยรองในการกระตุ้นหรือควบคุมให้มีการพัฒนารังไข่ของกุ้งแชบ๊วย

Central Library
Prince of Songkla University

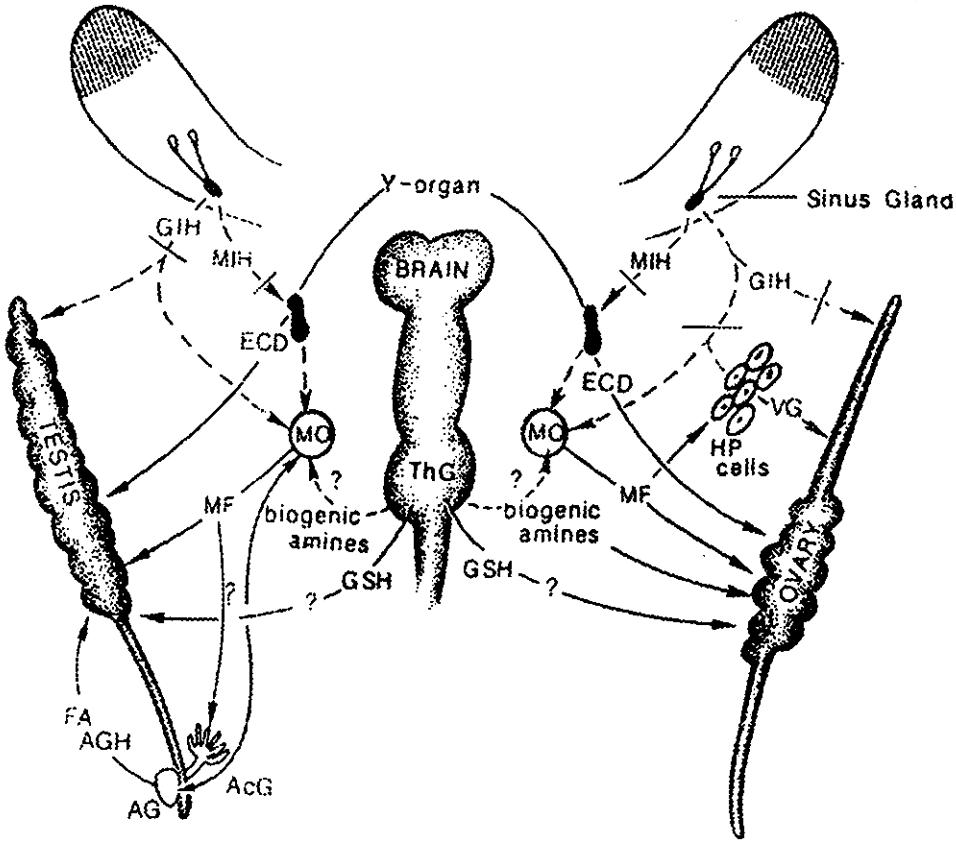


รูปที่ 1.6 แสดงตำแหน่ง X-organ และ sinus gland ในก้านตากุ้ง (Weish, 1961)



Color	Residue Code	Color	Residue Code
ORANGE	GPST	RED	HKR
BLUE	FWY	GREEN	ILMV

รูปที่ 1.7 แสดงการเปรียบเทียบการเรียงตัวของกรดอะมิโนของโปรตีนในกลุ่ม CHH/MIH/GIH family Pej-SGP-III: การเรียงตัวของกรดอะมิโน CHH ของกุ้ง *P. japonicus (Ohira et al, 1997)*, Me-CHH, MeMIH: การเรียงตัวของกรดอะมิโน CHH, MIH ของกุ้ง *Metapenaeus ensis* (Gu and Chan, 1998.), Hoa-CHH-A, Hoa-CHH-B และ HoaGIH: การเรียงตัวของกรดอะมิโน CHH และ GIH ของกุ้ง *H. americanus (*Tensen *et al.*, 1991อ้างโดย Gu and Chan, 1998, Soyez *et al.*, 1991 อ้างโดย Chan *et al.*, 1998) PvMIH: การเรียงตัวของกรดอะมิโน MIH ของกุ้ง *P. vannamei.* (Sun, 1994 อ้างโดย Gu and Chan, 1998), Cam-MIH, Cam-CHH:การเรียงตัวของกรดอะมิโน MIH, CHH ของปู *Carcinus maenas* (Klein *et al.*, 1993a, Kegel *et al.*, 1998 อ้างโดย Chan *et al.*, 1998) Cas-MIH: การเรียงตัวของกรดอะมิโน MIH ของ *Callinectes sapidus.* (Lee *et al.*, 1995. อ้างโดย Chan *et al.*, 1998) Pej-SGP-IV: การเรียงตัวของกรดอะมิโน MIH ของกุ้ง *P. japonicus (Ohira et al.*, 1997 อ้างโดย Chan *et al.*, 1998)

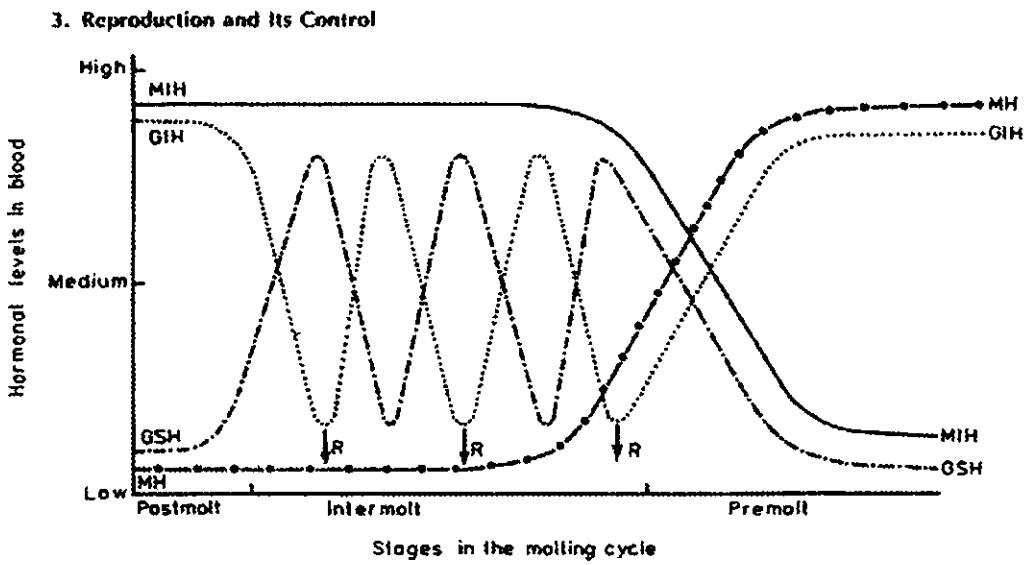


รูปที่ 1.8 แสดงแหล่งที่ผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ใน Crustaceans และเนื้อเยื่อเป้าหมาย เส้นทึบหมายถึงการกระตุ้น และเส้นประหมายถึงการยับยั้ง และเส้นประที่มีขีดขวางหมายถึงยับยั้งสิ้นสุดเมื่อมีการตัดก้านตา Molt inhibiting hormone (MIH) จะยับยั้งการผลิต edcysones (EDC) และ gonad-inhibiting hormone (GIH) หรือ vitellogenin-inhibiting hormone (VIH) มีผลยับยั้งที่รังไข่, hepatopancreas (HP) และอาจยับยั้งที่ mandibular organ (MO) ด้วยในขณะที่สมองและ thoracic ganglion (ThG) อาจมีผลกระตุ้นและหรือยับยั้งการทำงานของ MO หรือรังไข่ส่วนสาร Biogenic amines เช่น serotonin และ octopamine อาจมีผลต่อพฤติกรรมการผสมพันธุ์ และมีผลยับยั้งที่ MO (Laufer *et al.*, 1993)

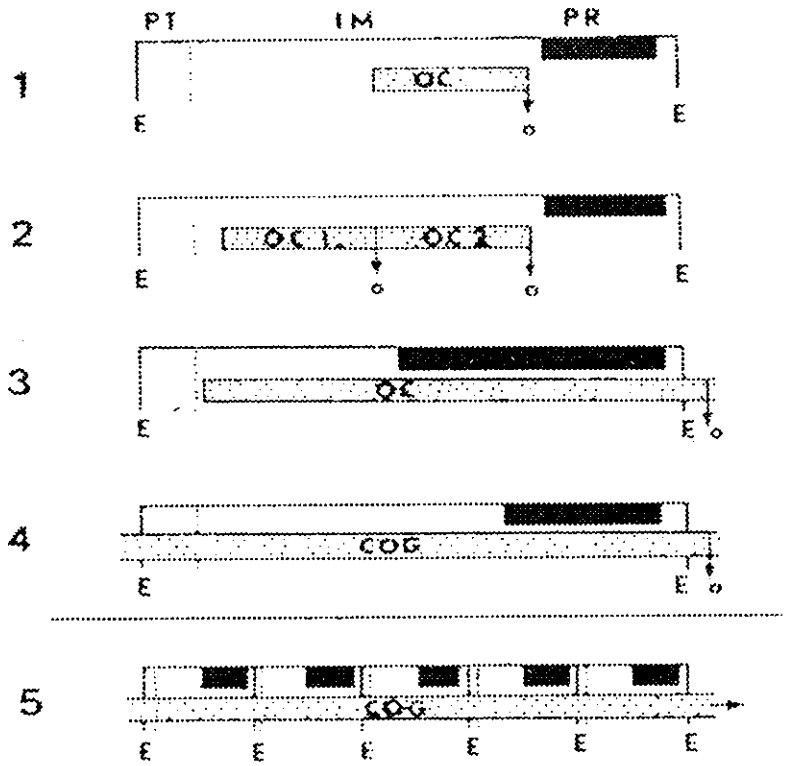
1.2.4.2 การลอกคราบและการวางไข่

จากภาพแสดงความสัมพันธ์ระหว่างฮอร์โมนในเลือดในช่วงที่มีการวางไข่และช่วงที่มีการลอกคราบ (รูปที่ 1.9) พบว่าช่วงก่อนการลอกคราบ (premolt) ปริมาณฮอร์โมนที่กระตุ้นการลอกคราบ (MH) และฮอร์โมนที่ยับยั้งการสร้างไข่ (GIH/VIH) จะสูงขึ้น ในขณะเดียวกันฮอร์โมนที่ยับยั้งการลอกคราบ (MIH) และฮอร์โมนที่กระตุ้นการสร้างไข่ (GSH/VSH) จะมีปริมาณต่ำเมื่อกุ้งลอกคราบ แล้วกุ้งจะเข้าสู่ระยะ postmolt ในระยะนี้ปริมาณ MIH และ GIH จะสูง โดยที่ MIH จะสูงเช่นนี้ตลอดจนต่ำลงในระยะ premolt ส่วน GSH และ MH จะต่ำในระยะ postmolt และ MH จะต่ำเช่นนี้ตลอดจนถึงระยะ premolt จึงจะสูงขึ้น ในระยะ intermolt ปริมาณ GIH จะเริ่มต่ำลงในขณะที่ GSH จะเริ่มสูงขึ้นจนกระทั่งมีการออกไข่ปริมาณ GIH จึงจะเริ่มสูงขึ้น และ GSH จะต่ำลงจากนั้นจึงจะเริ่มเข้าสู่ระยะ premolt

สัตว์ในกลุ่ม crustacea ที่โตเต็มที่แล้วนั้นมีความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบและการสืบพันธุ์ที่หลากหลาย ดังรูปที่ 1.10 ภาพที่ 1 และ 2 เป็นความสัมพันธ์ระหว่างการลอกคราบและการสืบพันธุ์ของ *Parathelphusa hydrodromus*. และ Brachyura ซึ่งมีช่วงการเจริญเติบโตและช่วงการขยายพันธุ์แยกกันชัดเจน โดยที่ Brachyura มีช่วง intermolt ที่ยาว (60%) ทำให้สามารถวางไข่ได้ 1 ถึง 2 รอบ ต่อการลอกคราบ 1 ครั้ง ภาพที่ 3 ซึ่งเป็นกลุ่ม Amphipod เช่น *Orchestia gammarella* มีระยะระหว่างการลอกคราบ (intermolt) ที่สั้นกว่า (50%) และช่วงก่อนการลอกคราบที่ยาวกว่า ทำให้ตัวเมียไม่สามารถพัฒนารังไข่ให้สมบูรณ์ได้ก่อนระยะ การลอกคราบ (premolt) ทำให้การเติบโตและการขยายพันธุ์เกิดขึ้นในเวลาเดียวกันได้ ภาพที่ 4 พบในสัตว์จำพวก Typical cirripede และ ภาพที่ 5 พบในสัตว์จำพวก Atypical cirriped เช่น *Semibalanus balanoides* เป็นชนิดที่รังไข่มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเป็นไปได้ว่าสามารถออกไข่ได้ตลอดเวลา ที่มีการลอกคราบ (Adiyodi, 1985)



รูปที่ 1.9 กราฟแสดงปริมาณ MIH, MH, GIH และ GSH ในเลือดในช่วงการสร้างไข่ (R) และในช่วงการลอกคราบ, GIH =gonad-inhibiting hormone, GSH= gonad stimulating hormone, MH=molting hormone, MIH = molting-inhibiting hormone (Adiyodi, 1970 อ้างโดย Adiyodi, 1985)



รูปที่ 1.10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างรอบการลอกคราบ และรอบการสร้างไข่ ส่วนที่มีสีดำเป็นช่วงที่มีฮอร์โมนลอกคราบ (ECD=ecdysteroids) ในปริมาณที่สูง ภาพที่ 1= *P. hydrodromus*. ภาพที่ 2 = Brachyura ภาพที่ 3 = Amphipoda. ภาพที่ 4 = Typical cirripede. ภาพที่ 5 = Atypical cirriped (*S. balanoides*.) COG=continuous oocyte growth (รังไข่เจริญต่อเนื่อง), E=ecdysis (การลอกคราบ), IM=intermolt (ระยะระหว่างการลอกคราบ), O =oviposition (การออกไข่), OC =ovarian cycle (รอบการออกไข่), OC1&2= first and second ovarian cycle (การออกไข่รอบที่1 และ 2), PR=premolt (ระยะก่อนการลอกคราบ), PT=postmolt (ระยะหลังการลอกคราบ) (Adiyodi, 1978 อ้างโดย Adiyodi, 1985)

1.2 วัตถุประสงค์การทดลอง

1.2.1 การโคลนฮอร์โมน GIH จากก้านตากุ้งแชบ๊วย

1.2.2 การผลิตแอนติซีรัมต่อ vitellin ของกุ้งแชบ๊วย

1.2.3 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวภาพของโปรตีนที่แยกจากก้านตาต่อการสร้างโปรตีนไข่โดยใช้แอนติซีรัมต่อ vitellin