

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ:	TRG5780018
ชื่อโครงการ:	ผลกระทบของแม่เพรียงทรายที่ถูกเพิ่มคุณค่าโดยกรดไขมันชนิดต่างๆเพื่อใช้เป็นอาหารกุ้งต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของกุ้งกุลาดำพ่อพันธุ์
ชื่อนักวิจัย และสถาบัน:	รุ่งนภา ลีละธนาวิทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อีเมล:	runghapa.lee@biotec.or.th
ระยะเวลาโครงการ:	2 ปี (มิถุนายน 2557 – พฤศจิกายน 2560, พักโครงการ 1.5 ปี)

### บทคัดย่อ:

ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของกุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงเป็นหนึ่งในปัญหาสำคัญที่มีผลต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้ง การให้อาหารที่เหมาะสมในบ่อเลี้ยงก็เป็นหนึ่งแนวทางสำคัญที่จะช่วยกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้งในบ่อเลี้ยงได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษาผลกระทบของอาหารสดหลายชนิดต่อการกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้งพ่อพันธุ์ในบ่อเลี้ยง โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม แต่ละกลุ่มจะมีการให้อาหารต่างชนิดกัน คือ อาหารเม็ดปกติที่ใช้เลี้ยงกุ้ง, อาหารเม็ดสำหรับใช้เตรียมความพร้อมกุ้งก่อนเข้าโรงเพาะฟัก, แม่เพรียงทราย, ปลาหมึก, และแม่เพรียงทรายกับปลาหมึก (1:1) และทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโต, อัตราการรอดชีวิต, น้ำหนักของสเปิร์ม, จำนวนสเปิร์ม, % สเปิร์มที่มีรูปร่างผิดปกติ, และ % ปฏิกริยา acrosome (acrosome reaction) ก่อนเริ่มและหลังการให้อาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากุ้งกลุ่มที่ให้อาหารสดจะมีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากลุ่มอาหารเม็ด น้ำหนักของสเปิร์มและจำนวนสเปิร์มของกุ้งกลุ่มที่ให้แม่เพรียงทรายและกลุ่มที่ให้ทั้งเพรียงทรายกับปลาหมึกสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่อัตราการเกิดปฏิกริยา acrosome ของกุ้งกลุ่มที่ให้ปลาหมึกสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญหลังจากการให้อาหาร อย่างไรก็ตาม ไม่มีกลุ่มอาหารใดเลยที่สามารถลดจำนวนสเปิร์มที่มีรูปร่างผิดปกติได้ นอกจากนี้อาหารที่ใช้ในการทดลองได้ถูกวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารและกรดไขมันต่างๆ โดยพบว่าอาหารสดมีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าอาหารเม็ดทั้งสองชนิด ในขณะที่อาหารเม็ดมีปริมาณไขมันมากกว่าอาหารสด แม่เพรียงทรายมีปริมาณไขมันสูงที่สุด ในขณะที่ปลาหมึกมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด แต่มีปริมาณไขมันและไขมันน้อยที่สุด สำหรับผลวิเคราะห์กรดไขมัน linoleic acid (LA) และ linolenic acid (ALA) ถูกพบในอาหารทุกชนิด ยกเว้นปลาหมึก แม่เพรียงทรายมีปริมาณ arachidonic acid (ARA) และ eicosapentaenoic acid (EPA) สูงกว่าอาหารชนิดอื่นๆ ในขณะที่ ปลาหมึกมีปริมาณ docosapentaenoic acid (DHA) สูงกว่าอาหารชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาถึงสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างแม่เพรียงทรายและปลาหมึก เพื่อพัฒนาความสามารถของอาหารในการปรับปรุงคุณภาพของสเปิร์มทั้งในแง่ของจำนวนและความสมบูรณ์ให้ดีขึ้นอีก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเรื่องของการลดจำนวนสเปิร์มที่ผิดปกติ

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของแม่เพรียงทรายต่อการกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้งพ่อพันธุ์ในระดับชีวโมเลกุล โดยการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะและท่อนำสุจิ) ของกุ้งที่ให้แม่เพรียงทราย (ระดับความสมบูรณ์พันธุ์สูง) และให้อาหารเม็ด (ระดับความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ) ด้วยเทคนิคไมโครอะเรย์ ผลจากการศึกษาพบการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างกุ้งที่ให้อาหารแตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีนระหว่างอัณฑะและท่อนำสุจิของกุ้ง นอกจากนี้ตัวอย่างของยีนที่พบว่ามีแสดงออกที่แตกต่างกันระหว่างกุ้งที่ให้อาหารแตกต่างกันจากผลของไมโครอะเรย์จำนวน 11 ยีนถูก

คัดเลือกไปทำการยืนยันผลการแสดงออกที่แตกต่างกันของยีนระหว่างสองกลุ่มอาหารด้วยเทคนิค real-time PCR (qPCR) โดยพบว่ามี 6 ยีน (ยีน *HNRPUL1* และ *GCP4* ในอินทผลัม ยีน *MAT2B*, *CDC16* และ *CSN5* ในท่อนำสุจิ และยีน *SLD5* ทั้งในอินทผลัมและท่อนำสุจิ) มีระดับการแสดงออกในกึ่งที่ให้แม่เพรียงทรายมากกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารเม็ดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของไมโครอะเรย์และ qPCR ได้บ่งชี้ไปในทิศทางเดียวกันว่ายีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันระหว่างสองกลุ่มอาหารมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) และการเกิดนิวเคลียสในไมโครทิวบูล (microtubule nucleation) นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในยีนที่เกี่ยวข้องกับการได้รับสารอาหารและกระบวนการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์เฉพาะในอินทผลัมของกึ่ง ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการม้วนพับของโปรตีน (protein refolding) และพบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบที่มีโปรแกรมไว้ (apoptosis) เพิ่มขึ้นเฉพาะในท่อนำสุจิ ดังนั้นแม่เพรียงทรายน่าจะช่วยกระตุ้นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของกึ่งกุลาดำพ่อพันธุ์ (spermatogenesis) โดยการกระตุ้นกระบวนการเจริญเติบโตของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะสเปิร์มาโทโกเนีย (spermatogonia proliferation) ในอินทผลัมและการควบคุมความสมบูรณ์ของสเปิร์มในท่อนำสุจิ

**คำหลัก:** กึ่งกุลาดำ, คุณภาพของสเปิร์ม, แม่เพรียงทราย, ปลาหมึก, ไมโครอะเรย์

## Abstract

---

**Project Code:** TRG5780018  
**Project Title:** Effects of fatty acids enrichment on polychaetes to be used as amaturation feed for the male black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)  
**Investigator:** Rungnapa Leelatanawit  
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)  
**E-mail Address:** rungnapa.lee@biotec.or.th  
**Project Period:** 2 years (June 2014 – November 2017, temporary stop 1.5 years)

### Abstract:

Poor reproductive maturation of the captive black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) is a crucial problem for shrimp industry. Feed is deemed to be one of the most important factors for enhancing reproductive maturation of shrimp in captivity. Therefore, this research aims to examine effects of different fresh feeds on sperm quality of male captive shrimp. From the change in our research plan, five shrimp groups were fed with different feeds: commercial pellet, broodstock pellet, squids, polychaetes, and combination of polychaetes and squids. Growth rate, survival rate, spermatophore weight, total sperm count, % abnormal sperm cells and % acrosome reaction (AR) were measured before and after a 4-week feeding trial. The result showed that growth rates of three fresh feed groups were significantly higher than those of pellet groups after the feeding trial. Spermatophore weight and total sperm count were higher in groups fed with polychaetes and the polychaetes and squids combination, while acrosome reaction rate was significantly higher in shrimp fed with squid ( $P<0.05$ ). However, all examined feeds could not decrease amount of abnormal sperm cells after feeding. For nutrient and fatty acid analysis, fresh feeds had significantly higher total protein contents than commercial and broodstock pellets, whereas both pellets had significantly higher ash than all fresh feeds. Moreover, polychaetes had the highest total fat content. Squid had highest protein content, but lowest fat and ash contents. For fatty acid analysis, linoleic acid (LA) and linolenic acid (ALA) were found in all feeds, except squid. Polychaetes had significantly higher arachidonic acid (ARA) and eicosapentaenoic acid (EPA) amounts than other feeds, whereas squid had significantly higher docosapentaenoic acid (DHA) amount than other feeds. However, a suitable ratio between polychaetes and squids will need to be examined to further improve sperm performance, especially in term of abnormal sperm cells.

Beside the study of feed combination effect, transcriptomic differences between reproductive organs (testes and vas deferens) of polychaetes-fed shrimp with high level of reproductive maturation and commercial pellet-fed shrimp with low level of reproductive maturation were also studied using microarray technique to decipher molecular mechanism

of male reproductive maturation induced by polychaetes. The significantly different genes between the two different feeds were identified by significance analysis of microarrays (SAM) and mapped to biological pathways to decipher their potential involvement in better sperm performance after polychaetes feeding. Subsequently, expression patterns of the identified differentially expressed genes were further validated by quantitative real-time PCR (qPCR). The overall profiles were distinguishingly different between the two feed groups as well as between testes and vas deferens. Additionally, six of eleven differentially expressed genes identified by the microarray (*HNRPUL1* and *GCP4* in testes, *MAT2B*, *CDC16*, and *CSN5* in vas deferens, and *SLD5* in both organs) were validated by qPCR and found to exhibit significantly higher expression levels in polychaete-fed shrimp than in commercial pellet-fed shrimp. From microarray and qPCR results, the differentially expressed transcripts in both testes and vas deferens between different feeds belonged to DNA replication and microtubule nucleation pathways. Interestingly, while the transcripts involved in nutrient uptake and nucleotide biosynthesis were increased only in testes, those involved in protein refolding and apoptosis were increased only in vas deferens. These findings suggest that polychaetes may enhance spermatogenesis by increasing spermatogonia proliferation in testes and by regulating mature spermatozoa in vas deferens.

**Keywords:** *Penaeus monodon*, sperm performance, polychaetes, squid, cDNA microarray