

องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับ  
วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคฟีพอด *Apocyclops royi*



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร  
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2564  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF DELTA-6 DESATURASE ( $\Delta 6$ D) GENE  
INVOLVED IN OMEGA-3 FATTY ACID BIOSYNTHESIS PATHWAY IN COPEPOD *Apocyclops*

*royi*



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Food Technology

Department of Food Technology

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2021

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด <i>Apocyclops royi</i>
โดย	น.ส.ศุภกานต์ สังข์แก้ว
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา)

ศุภกานต์ สังข์แก้ว : องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *Apocyclops royi*. ( FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF DELTA-6 DESATURASE (ArD6D) GENE INVOLVED IN OMEGA-3 FATTY ACID BIOSYNTHESIS PATHWAY IN COPEPOD *Apocyclops royi*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.จันทร์ประภา อึ้งจงใจรัก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิติ อ่ำพ่าย

โคพีพอดจัดอยู่ในกลุ่มของครัสเตเชียนขนาดเล็กที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน โคพีพอดเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) โดยศึกษาในโคพีพอดระยะนอพลีส (NP) โคพีพอด (CD) และตัวเต็มวัย (AD) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสีเขียว *Tetraselmis sp.* ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ไม่พบกรดไขมัน DHA จากการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH มีกรดไขมัน PUFA, EPA และ DHA ในปริมาณสูงกว่าอาหารสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ โดยพบกรดไขมัน PUFA สูงในโคพีพอดระยะ CD (38.53%) และ AD (41.85%) ในขณะที่พบกรดไขมัน PUFA ปริมาณต่ำที่สุดในโคพีพอดระยะ NP (22.50%) นอกจากนี้พบว่าโคพีพอดทุกระยะพัฒนาการมีกรดไขมัน LC-PUFA ปริมาณสูง (5.27-10.36%) โดยพบกรดไขมัน DHA มากที่สุดในระยะ AD (4.85%) รองลงมาในระยะ CD (3.54%) และระยะ NP (2.78%) จากการเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis sp.* ที่มีกรดไขมัน EPA ต่ำ (*ArTet*) และ *Chaetoceros sp.* ที่มีกรดไขมัน EPA สูง (*ArChaeto*) พบว่าโคพีพอด *ArChaeto* มีกรดไขมัน DHA ปริมาณสูงกว่าโคพีพอด *ArTet* จึงสามารถคาดการณ์ได้ว่า องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน DHA ที่พบในโคพีพอด จากนั้นได้ศึกษาการแสดงออกของยีนดีแซททูเรส *ArD6D* ที่มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ArD6D* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในโคพีพอดระยะ AD ( $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน DHA ที่เพิ่มขึ้นในโคพีพอดระยะ AD ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *ArD6D* อาจมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด และเมื่อศึกษาการแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคพีพอด *ArTet* และ *ArChaeto* พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคพีพอด *ArChaeto* มีการแสดงออกที่สูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับโคพีพอด *ArTet* ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน DHA ที่เพิ่มขึ้นในโคพีพอด *ArChaeto* ผลจากการวิจัยพบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ทั้ง 3 ระยะพัฒนาการสามารถสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ผ่านวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน LC-PUFA และกรดไขมันในสาหร่ายส่งผลต่อปริมาณ DHA ของโคพีพอด โดยข้อมูลจากงานวิจัยนี้มีประโยชน์ต่อการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร  
ปีการศึกษา 2564

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....  
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6370157423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: copepod, *Apocyclops royi*, omega-3, desaturase, polyunsaturated fatty acid (PUFA)

Supakarn Sungkaew : FATTY ACID COMPOSITION AND EXPRESSION OF DELTA-6 DESATURASE (*ArD6D*)

GENE INVOLVED IN OMEGA-3 FATTY ACID BIOSYNTHESIS PATHWAY IN COPEPOD *Apocyclops royi*.

Advisor: Assoc. Prof. CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D. Co-advisor: Piti Amparyup, Ph.D.

Copepods are a group of small crustaceans that play an important role as live feed in fish larviculture. Copepods contain a high content of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which are important nutrients for the development of fish larvae. This research aimed to study fatty acid profiles of each developmental stage of the *Apocyclops royi*, Thai copepod species (*A. royi*-TH). Fatty acid compositions in the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages of *A. royi*-TH that had been fed on *Tetraselmis sp.*, a green microalgae that is deficient in DHA were characterized and identified using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The results showed that the copepod *A. royi*-TH contains higher level of PUFA, EPA and DHA than other aquatic live feeds. It was found that the CD (38.53%) and AD (41.85%) stages were high in PUFAs, while the NP (22.50%) stage had the lowest level of PUFAs. In addition, all stages of copepod had a high level of LC-PUFA (5.27-10.36%), from the highest to the lowest levels of DHA respectively, AD (4.85%), CD (3.54%), and NP (2.78%). Comparing between the copepods feed on a low-EPA *Tetraselmis sp.* (*ArTet*) and a high-EPA *Chaetoceros sp.* (*ArChaeto*), it was found that *ArChaeto* had a higher level of DHA than *ArTet*. This result suggested the correlation between fatty acid compositions in the algae and the quantity of DHA in the copepod. The study in the expression of desaturase gene (*ArD6D*), which is essential in DHA synthesis showed a significant increase of *ArD6D* gene expression in the AD stage ( $p < 0.05$ ) correlated with the high amount of DHA in the same developmental stages. This result suggested the possible function of *ArD6D* gene for DHA synthesis in each developmental stage. The study of *ArD6D* gene expression in *ArTet* and *ArChaeto* showed a significant higher expression level of *ArD6D* gene in *ArChaeto* compared to *ArTet* ( $p < 0.05$ ), correlated with the higher amount of DHA in *ArChaeto*. These results suggested that three developmental stages of copepod *A. royi*-TH were able to synthesize DHA through the LC-PUFA biosynthesis pathway, and the amount and types of existing fatty acids in the algae related to the amount of DHA in copepod. This research can lead to the nutritional improvement of copepod *A. royi*-TH as live feed for larviculture in Thai aquaculture industry.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature .....

Academic Year: 2021

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิติ อ่ำพ่ายพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะอันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย คอยช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการ ทำวิจัย ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์ และ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐธิดา โชติช่วง และ รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ที่ได้กรุณาสละ เวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และชี้แนะ ให้คำปรึกษาในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.วัลย์พร เจริญทรัพย์ศรี และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญด้าน เทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้ และ ความ ช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ แห่งชาติ (ไบโอเทค) และศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และ เครื่องมือในการทำวิจัยจนสามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย “ทุนวิทยบัณฑิต” ที่ได้สนับสนุน ทุนอุดหนุนการศึกษาตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้า สามารถทนต่ออุปสรรคและปัญหา และทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วง

ศุภกานต์ สังข์แก้ว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญรูป.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	4
2.1 อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน .....	4
2.2 กรดไขมันจำเป็นในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน.....	5
2.3 อาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน .....	7
2.3.1 อาร์ทีเมีย .....	7
2.3.2 ไรแดงน้ำจืด.....	10
2.4 โคพีพอด.....	12
2.4.1 อนุกรมวิธานของโคพีพอด .....	12
2.4.2 ชีววิทยาของโคพีพอด .....	13
2.4.3 ระยะพัฒนาการของโคพีพอด .....	14
2.4.4 การสืบพันธุ์ของโคพีพอด .....	16
2.4.5 อาหารสำหรับเลี้ยงโคพีพอด .....	16
2.4.5.1 สาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp.....	17
2.4.5.2 สาหร่าย <i>Chaetoceros</i> sp.....	18

2.4.6 การใช้โคฟีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน .....	19
2.5 โคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> .....	21
2.6 การสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA .....	23
2.6.1 $\Delta$ 6 fatty acid desaturase.....	25
2.7 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR) .....	26
2.7.1. Reverse transcription PCR .....	27
2.8 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) .....	27
2.8.1 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS).....	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	30
3.1 วัตถุประสงค์.....	30
3.1.1 โคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> สายพันธุ์ไทย ( <i>A. royi</i> -TH).....	30
3.1.2 สาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp., <i>Chaetoceros</i> sp. และ <i>Chlorella</i> sp.....	30
3.1.3 ไรแดงน้ำจืด ( <i>Moina</i> sp.) .....	30
3.1.4 อาร์ทีเมีย ( <i>Artemia salina</i> ).....	30
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	31
3.2.1 อุปกรณ์.....	31
3.2.2 สารเคมี.....	31
3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน.....	33
3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน .....	33
3.3.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน .....	33
3.3.1.1.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อเป็นอาหารโคฟีพอด .....	33
3.3.1.1.2 การเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. ....	34



3.3.1.1.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด <i>Chlorella</i> sp. เพื่อเป็นอาหารไรแดงน้ำจืด	34
3.3.1.1.4 การเลี้ยงไรแดงน้ำจืด <i>Moina</i> sp. ด้วยสาหร่ายน้ำจืด <i>Chlorella</i> sp.	35
3.3.1.1.5 การเตรียมอาร์ทีเมีย ( <i>Artemia salina</i> )	36
3.3.1.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS	36
3.3.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ	37
3.3.1.2.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อเป็นอาหาร โคฟีพอด	37
3.3.1.2.2 การเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อแยกระยะพัฒนาการ	37
3.3.1.2.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน	38
3.3.1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS	38
3.3.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. และสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp.	38
3.3.1.3.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อเป็นอาหารโคฟีพอด	38
3.3.1.3.2 การเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp.	38
3.3.1.3.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน	39
3.3.1.3.4 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. เพื่อเป็นอาหารโคฟีพอด	39

3.3.1.3.5 การเลี้ยงโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. ....	39
3.3.1.3.6 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน .....	40
3.3.1.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS .....	40
3.3.2 การศึกษายีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	41
3.3.2.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	41
3.3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ในแต่ละระยะพัฒนาของ โคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	41
3.3.2.2.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อเป็นอาหาร โคพีพอด .....	41
3.3.2.2.2 การเลี้ยงโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	41
3.3.2.2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA).....	42
3.3.2.2.4 การเตรียม cDNA .....	42
3.3.2.2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR.....	43
3.3.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ในโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. และสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. .	45
3.3.2.3.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อเป็นอาหาร โคพีพอด .....	45
3.3.2.3.2 การเลี้ยงโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน .....	45
3.3.2.3.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. เพื่อเป็นอาหารโคพีพอด .....	45

3.3.2.3.4 การเลี้ยงโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน .....	45
3.3.2.3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>ArD6D</i> .....	45
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	47
4.1 คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน .....	47
4.1.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันของ โคพีพอด ไรแดงน้ำจืด และอาร์ทีเมีย .....	47
4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ.....	53
4.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp.....	60
4.2 การศึกษาอินสักระเหยื่อกรดไขมันโอเมกา-3 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	68
4.2.1 ลักษณะสมบัติของยีน <i>delta-6 desaturase (ArD6D)</i> ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH.....	68
4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>ArD6D</i> ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ.....	73
4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>ArD6D</i> ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ .....	78
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	78
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	79
บรรณานุกรม.....	80
ภาคผนวก ก.....	96
ภาคผนวก ข.....	97
ภาคผนวก ค.....	105
ภาคผนวก ง .....	115

ประวัติผู้เขียน..... 125



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 โครงสร้างของกรดไขมัน.....	7
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ในสาหร่าย <i>Tetraselmis chuii</i> และ <i>Chaetoceros calcitrans</i> .....	18
ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมีย ไรแดงน้ำจืด และโคฟีพอด.....	21
ตารางที่ 4 สายพันธุ์โคฟีพอดที่มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์.....	21
ตารางที่ 5 สัดส่วนของกรดไขมัน PUFA, DHA และ EPA ในโคฟีพอดแต่ละสายพันธุ์ .....	23
ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA.....	44
ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ทำ PCR.....	45
ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR.....	45
ตารางที่ 9 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด ไรแดงน้ำจืด และอาร์ทีเมีย .....	50
ตารางที่ 10 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> ในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	57
ตารางที่ 11 องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp. และโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด.....	63
ตารางที่ 12 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน ArD6D ของโคฟีพอด <i>A. royi-TH</i> กับโปรตีนในกลุ่ม desaturase ในโคฟีพอดสายพันธุ์อื่นๆ .....	72
ตารางที่ 13 การเตรียมอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2.....	99

## สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลลูกปลาแต่ละระยะพัฒนาการ.....	6
รูปที่ 2 ลักษณะของอาร์ทีเมีย.....	9
รูปที่ 3 วัฏจักรชีวิตของอาร์ทีเมีย.....	10
รูปที่ 4 ลักษณะของไรแดงน้ำจืดเพศผู้.....	11
รูปที่ 5 ลักษณะของไรแดงน้ำจืดเพศเมีย.....	12
รูปที่ 6 ลักษณะของโคฟีพอด.....	13
รูปที่ 7 ลักษณะของโคฟีพอดระยะตัวเต็มวัย.....	15
รูปที่ 8 วัฏจักรชีวิตของโคฟีพอด.....	16
รูปที่ 9 วัฏจักรชีวิตของโคฟีพอด.....	17
รูปที่ 10 ลักษณะของสาหร่าย <i>Tetraselmis chuii</i> .....	19
รูปที่ 11 ลักษณะของสาหร่าย <i>Chaetoceros</i> sp.....	19
รูปที่ 12 ลักษณะของโคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> .....	22
รูปที่ 13 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA.....	25
รูปที่ 14 แบบจำลองของโปรตีน $\Delta 6$ fatty acid desaturase ใน <i>Pythium</i> sp.....	26
รูปที่ 15 ขั้นตอนการทำ PCR.....	28
รูปที่ 16 แผนผังของแก๊สโครมาโทกราฟี.....	29
รูปที่ 17 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp.....	34
รูปที่ 18 การเลี้ยงโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Tetraselmis</i> sp.....	35
รูปที่ 19 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด <i>Chlorella</i> sp.....	36
รูปที่ 20 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม <i>Chaetoceros</i> sp.....	41
รูปที่ 21 ลักษณะของอาหารมีชีวิตที่ใช้ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน.....	48
รูปที่ 22 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของโคฟีพอด <i>A. royi</i> -TH, ไรแดงน้ำจืด <i>Moina</i> sp. และอาร์ทีเมีย <i>Artemia salina</i> .....	52

รูปที่ 23 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH, ไรแดงน้ำจืด <i>Moina</i> sp. และอาร์ทีเมีย <i>Artemia salina</i> .....	53
รูปที่ 24 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH, ไรแดงน้ำจืด <i>Moina</i> sp. และอาร์ทีเมีย <i>Artemia salina</i> .....	54
รูปที่ 25 ลักษณะของโคพีพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	55
รูปที่ 26 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	58
รูปที่ 27 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	59
รูปที่ 28 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ .....	60
รูปที่ 29 ลักษณะของสาหร่ายที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	61
รูปที่ 30 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp. และโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด .....	66
รูปที่ 31 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp. และโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด .....	67
รูปที่ 32 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp. และโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองพัฒนาการ.....	68
รูปที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	70
รูปที่ 34 โดเมนของโปรตีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH .....	71
รูปที่ 35 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH (ArD6D-TH) กับโปรตีน desaturase อื่นๆ .....	73
รูปที่ 36 การแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ.....	74
รูปที่ 37 ระดับการแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ ..	75
รูปที่ 38 การแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด <i>A. royi</i> -TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp. และ <i>Chaetoceros</i> sp.....	76

รูปที่ 39 ระดับการแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย  
*Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. .... 77

รูปที่ 40 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ของโคพีพอด *A. royi*-TH ..... 78





## บทที่ 1

### บทนำ

อาหารทะเลเป็นอาหารที่นิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย ทำให้มีความต้องการบริโภคอาหารทะเลเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้ต้องมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากการอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนเป็นปัญหาคอขวดที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตของอุตสาหกรรมอาหารทะเลของไทย โดยอาหารมีชีวิตที่ใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนในปัจจุบัน เช่น โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย มีคุณค่าทางโภชนาการของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) รวมถึงกรดไขมันโอเมกา-3 (n-3 PUFA) ที่ต่ำมาก ไม่เพียงพอต่อการใช้สารอาหารของลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน นอกจากนี้โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย ยังมีขนาดตัวที่ใหญ่ไม่เหมาะสมกับขนาดปากของสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด ส่งผลให้สัตว์น้ำวัยอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ ปัจจุบันมีอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่สำคัญเช่น โคพีพอด (Copepod) โดยโคพีพอดเป็นครัสเตเชียนชนิดหนึ่ง มีขนาดตัวที่เล็ก มีหลากหลายขนาด และมีบทบาทสำคัญในการเป็นเหยื่อมีชีวิตตามธรรมชาติสำหรับสัตว์น้ำ ปัจจุบันมีรายงานการใช้โคพีพอดในการอนุบาลลูกปลาทะเลหลายชนิด (Busch et al., 2011; Olivotto et al., 2008; Rajkumar and Vasagam, 2006; Toledo et al., 2005) โดยใช้โคพีพอดร่วมกับอาหารมีชีวิตแบบดั้งเดิม หรือใช้เป็นอาหารทางเลือกเพื่อแก้ไขปัญหาคอขวดของการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากโคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งโปรตีน และกรดไขมัน จึงทำให้โคพีพอดกลายเป็นอาหารสัตว์น้ำมีชีวิตที่มีศักยภาพในการอนุบาลสัตว์ทะเลวัยอ่อน

ไซโคลพอยด์ *Apocyclops royi* เป็นโคพีพอดที่พบได้ในประเทศไทย แบ่งเป็น 3 ระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะนอเพลียส (nauplius stage, NP) ระยะโคพีพอดโพติด (copepodid stage, CD) และระยะตัวเต็มวัย (adult stage, AD) โดยมีขนาดตัวที่หลากหลาย (50 ถึง 1000 ไมโครเมตร) มีวงจรชีวิตที่สั้น สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย ทนต่อความเค็มและอุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของ PUFA ประกอบด้วย กรดไขมันดีเอชเอ (docosahexaenoic acid, DHA) กรดไขมันอีพีเอ (eicosapentaenoic acid, EPA) และกรดไขมันเออาร์เอ (arachidonic acid, ARA) ที่สำคัญและจำเป็นต่อการเจริญของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยมีงานวิจัยพบว่าโคพีพอด *A. royi* มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-

chain polyunsaturated fatty acid, SC-PUFA) (Nielsen et al., 2019, 2020, 2021; Pan et al., 2018)

กรดไขมันจำเป็น (essential fatty acid) โดยเฉพาะกรดไขมันโอเมกา-3 ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) เป็นสารอาหารที่จำเป็นเนื่องจากเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) นอกจากนี้กรดไขมันโอเมกา-3 ยังมีความสำคัญต่อเจริญเติบโตของสัตว์ รวมถึงการสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน การควบคุมสมดุลของไอออน และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Glencross, 2009) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) จำนวนมากมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ LC-PUFA (Kabeya et al., 2018; Monroig and Kabeya, 2018) โดยเฉพาะดีแซตทูเรส (desaturase) และอีลองเกส (elongase) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ PUFA ในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

เอนไซม์ดีแซตทูเรสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์ PUFA โดยทำหน้าที่เพิ่มพันธะคู่ให้กับสายโซ่ของกรดไขมัน (Monroig and Kabeya, 2018) ในปี 2019 Nielsen และคณะฯ ได้รายงานว่ามีเอนไซม์  $\Delta 6$ -desaturase เป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 โดยเฉพาะกรดไขมัน DHA และเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting enzyme) ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไต้หวัน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษากรดไขมันในพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH)

งานวิจัยนี้จึงศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC/MS) โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ส่วน (1) เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH กับอาหารมีชีวิตที่ 1 ซึ่งอยู่ในปัจจุบันได้แก่

อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) และไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) (2) เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะนอเพลียส (NP) ระยะโคพีโพติด (CD) และระยะตัวเต็มวัย (AD) และ (3) เปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย 2 ชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการ กรดไขมันที่แตกต่างกัน ได้แก่ สาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน ดีแซททูเรส *ArD6D* ที่มีความสำคัญต่อการสร้างกรดไขมัน DHA ด้วยวิธี Reverse transcription-PCR (RT-PCR) ในโคพิพอด *A. royi*-TH ทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ และโคพิพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. เพื่อให้เข้าใจการทำงานของยีน *ArD6D* ในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพิพอด *A. royi*-TH และสามารถหาข้อสรุปที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงโคพิพอด *A. royi*-TH เชิงพาณิชย์ของไทยในอนาคต

#### วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันของโคพิพอด *Apocyclops royi* ของไทย ด้วยเทคนิค GC/MS
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพิพอด ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

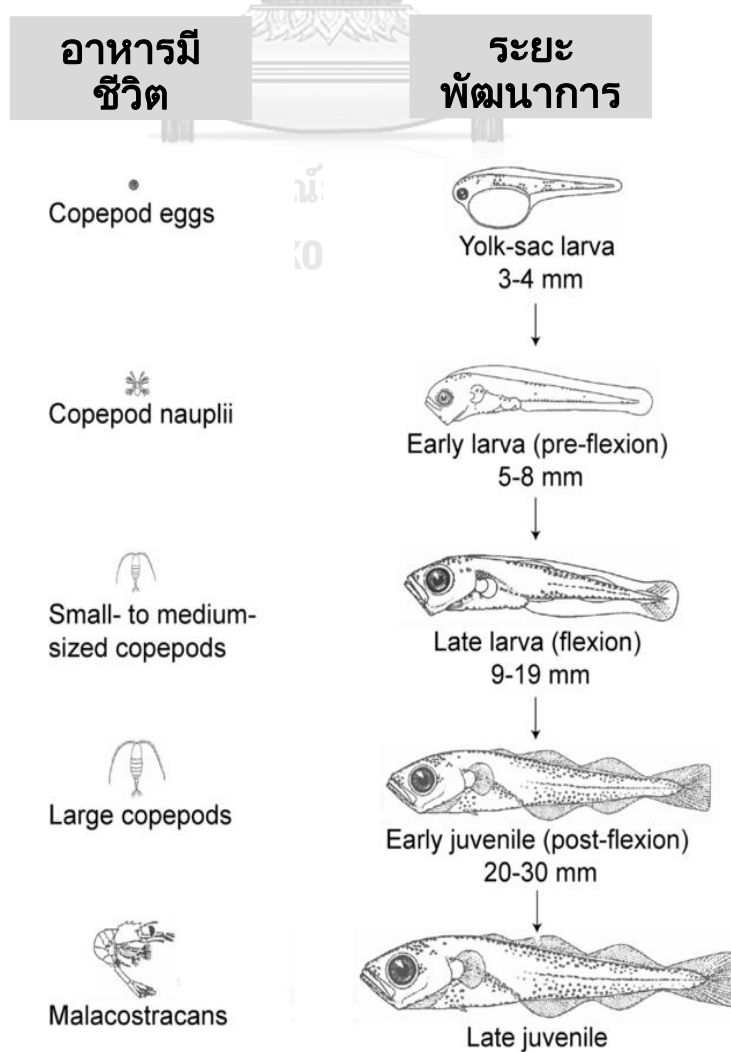


## 2.1 อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ “อาหาร” ถือเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากปัจจัยหนึ่ง อาหารที่มีคุณภาพดีและมีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมจะส่งผลให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตที่ดี และมีความสมบูรณ์ แต่การอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนระยะแรกฟักยังคงเป็นปัญหาสำหรับอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำวัยอ่อนระยะแรกฟักมีขนาดลำตัวและขนาดปากที่เล็ก สุขภาพ และคณะฯ (2561) ได้รายงานว่าลูกปลาเก๋าปะการังระยะแรกฟัก 3 วันมีขนาดตัวเพียง 244 ไมโครเมตร และปากมีขนาดเพียง 170 ไมโครเมตรเท่านั้น ทำให้สัตว์น้ำวัยอ่อนระยะแรกฟัก ไม่สามารถกินอาหารที่มีขนาดใหญ่ได้ เพราะเหตุนี้จึงส่งผลให้สัตว์น้ำวัยอ่อนมีอัตราการเจริญเติบโต และการรอดชีวิตที่ต่ำ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าลูกปลาเก๋าปะการังเสี้ยววัยอ่อนระยะแรกฟัก 1-15 วัน แรกมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ โดยมีอัตราการรอดเพียง 8-10% เท่านั้น (มนทกานติ และคณะฯ, 2557)

แพลงก์ตอนเป็นอาหารมีชีวิตตามธรรมชาติของสัตว์น้ำ ทั้งสัตว์น้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม โดยแพลงก์ตอนถูกนำมาใช้ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากมีขนาดตัวที่เล็ก มีคุณค่าทางโภชนาการครบถ้วนเหมาะสมกับความต้องการของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) กลุ่มโอเมกา-3 (n-3 PUFA) ทั้ง docosahexaenoic acid (DHA) และ eicosapentaenoic acid (EPA) ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนิยมใช้อาร์ทีเมียและไรแดงน้ำจืดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมได้ อย่างไรก็ตามมีการนำโคพีพอดมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน แต่ยังไม่แพร่หลายมากนักเมื่อเทียบกับอาหารมีชีวิตแบบดั้งเดิมทั้งสองชนิด แต่กลับพบว่าการใช้โคพีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนให้ผลลัพธ์ที่ดีกว่าการใช้อาร์ทีเมีย (Conceição et al., 2010) และไรแดงน้ำจืด เนื่องจากโคพีพอดมีกรดไขมันจำเป็นปริมาณสูงกว่าที่พบในอาร์ทีเมียและไรแดงน้ำจืด และโคพีพอดยังมีขนาดตัวที่เล็กหลายหลายขนาด ซึ่งเหมาะสมกับการกินของสัตว์น้ำวัยอ่อนแต่ละระยะพัฒนาการ (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 อาหารมีชีวิตสำหรับการอนุบาลลูกปลาแต่ละระยะพัฒนาการ  
ดัดแปลงจาก Jacobsen และคณะฯ (2020)

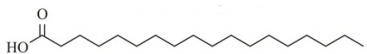
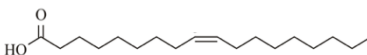
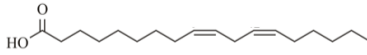
## 2.2 กรดไขมันจำเป็นในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

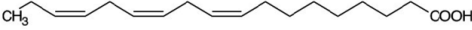



กรดไขมัน (fatty acid) เป็นสารอินทรีย์ประเภทกรดคาร์บอกซิลิก (Wang et al., 2017) มีลักษณะเป็นโซ่ยาว โดยมีหมู่คาร์บอกซิล (COOH) อยู่ที่ปลายด้านหนึ่ง เรียกว่า ปลายแอลฟา ( $\alpha$ -end) และหมู่เมทิล (CH<sub>3</sub>) อยู่ที่ปลายอีกด้านหนึ่ง เรียกว่า ปลายโอเมกา ( $\omega$ -end) (Lindshield, 2018) กรดไขมันสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้ 2 แบบ ได้แก่ (1) กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่ประกอบด้วยพันธะเดี่ยวทั้งหมด และ (2) กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง กรดไขมันไม่อิ่มตัวแบ่งออกเป็น กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid, MUFA) ที่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้าง 1 ตำแหน่งและกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ที่มีพันธะคู่อยู่ในโครงสร้างมากกว่า 2 ตำแหน่ง (Moghadasian and Shahidi, 2017) โดยกรดไขมัน PUFA สามารถแบ่งตามความยาวของสายโซ่คาร์บอนได้ดังนี้ กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain PUFA, SC-PUFA) ที่มีความยาวของสายคาร์บอน 18 อะตอม และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain PUFA, LC-PUFA) ที่มีความยาวของสายคาร์บอนตั้งแต่ 20 อะตอมขึ้นไป (Garrido et al., 2019) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนประกอบด้วยกรดไขมัน 2 กลุ่มหลัก ได้แก่ กรดไขมันโอเมกา-3 (n-3 PUFA) ที่มีพันธะคู่หนึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง  $\omega$ -3 นับจากปลายเมทิล เช่น  $\alpha$ -linolenic acid (C18:3n-3, ALA), eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA) และ docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA) และกรดไขมันโอเมกา-6 (n-6 PUFA) ที่มีพันธะคู่หนึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง  $\omega$ -6 จากปลายเมทิล (Turchini et al., 2012) เช่น arachidonic acid (C20:4n-6, ARA) โครงสร้างของกรดไขมันแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 1

กรดไขมันเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในสัตว์น้ำวัยอ่อน เป็นทั้งแหล่งพลังงาน และเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โดยเฉพาะในส่วนของสมองและส่วนที่ใช้ในการมองเห็นหรือรับภาพ (retina) (มนทกานติ และคณะ, 2557) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตและการพัฒนาของตัวอ่อน โดยกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA เป็นสารอาหารที่จำเป็นซึ่งถือเป็นตัวขับเคลื่อนที่สำคัญต่อความสมบูรณ์และเสถียรภาพของระบบนิเวศ (Parrish, 2013) นอกจากนี้กรดไขมันโอเมกา-3 มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน รวมถึงการสืบพันธุ์ ระบบภูมิคุ้มกัน การควบคุมสมดุลของไอออน และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ (Glencross, 2009) โดยเฉพาะกรดไขมัน EPA และ DHA ที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาการการสะสมเม็ดสี และความต้านทานโรคของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Sorgeloos et al., 2001) ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อนเพิ่มสูงขึ้น (Jørgensen and Kjær, 2018)

โดยกรดไขมันโอเมกา-3 เหล่านี้เป็นกรดไขมันที่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น (Das et al., 2012) นอกจากนี้อัตราส่วนระหว่างกรดไขมัน DHA:EPA มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาท เยื่อหุ้มเซลล์ และการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยอัตราส่วนระหว่าง DHA:EPA ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนจะอยู่ที่ 1.0-2.0:1 (National Research Council, 2011)

ตารางที่ 1 โครงสร้างของกรดไขมัน

กรดไขมัน	โครงสร้าง	อ้างอิง
กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid)		
Stearic acid (C18:0)		Chemistry Glossary, 2018
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid)		
Oleic acid (C18:1)		Chemistry Glossary, 2018
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid)		
Linoleic acid (C18:2n-6)		Chemistry Glossary, 2018
กรดไขมันโอเมกา-3 (n-3 polyunsaturated fatty acid)		

$\alpha$ -Linolenic acid (C18:3n-3, ALA)		Kashiwagi and Huang, 2012
Eicosapentaenoic acid (C20:5n-3, EPA)		Kashiwagi and Huang, 2012
Docosahexaenoic acid (C22:6n-3, DHA)		Kashiwagi and Huang, 2012
<b>กรดไขมันโอเมกา-6 (n-6 polyunsaturated fatty acid)</b>		
Arachidonic acid (C20:4n-6, ARA)		Kashiwagi and Huang, 2012

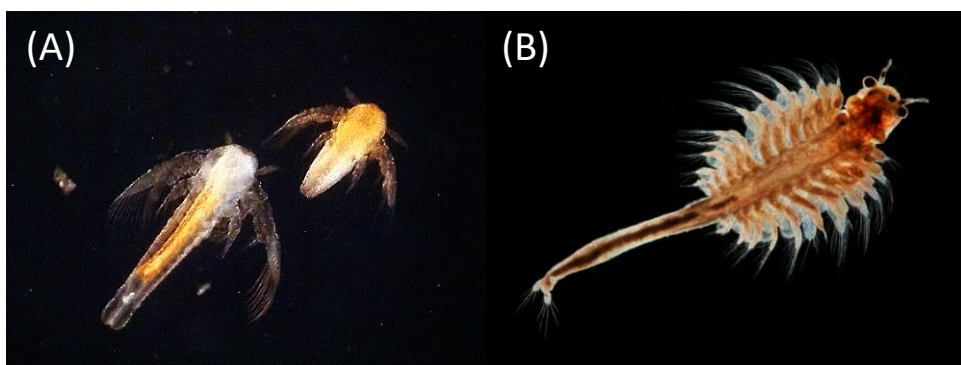
## 2.3 อาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยสัตว์น้ำวัยอ่อนแต่ละชนิดอาจมีความต้องการอาหารที่แตกต่างกันไป อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยนิยมใช้อาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน ได้แก่ อาร์ทีเมีย และไรแดงน้ำจืด

### 2.3.1 อาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมีย (artemia) หรือไรน้ำเค็ม (brine shrimp) เป็นอาหารมีชีวิตชนิดหนึ่งที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก อาร์ทีเมียเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดหนึ่งที่ถูกจัดในไฟลัมอาร์โทรพอดา (phylum: arthropoda) ชั้นไฟลัมครัสเตเชีย (subphylum: crustacea) อันดับอนอสตรากา (order: anostraca) (Criel and Macrae, 2002a) อาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัยมีลำตัวเรียวยาวแบนคล้ายใบไม้ ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว มีขนาดตั้งแต่ 800-1200 ไมโครเมตร ลำตัวแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ออก และท้อง (Criel and Macrae, 2002b) (รูปที่ 2B) แต่มีขนาดตัวที่ใหญ่เกินไปสำหรับนำไปใช้ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน อาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัยจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงปลาสวยงาม ในขณะที่ตัวอ่อนระยะอเพลียสมิขนาด 400-500 ไมโครเมตร (Marini, 2002) (รูปที่ 2A) จึงเหมาะสำหรับใช้ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

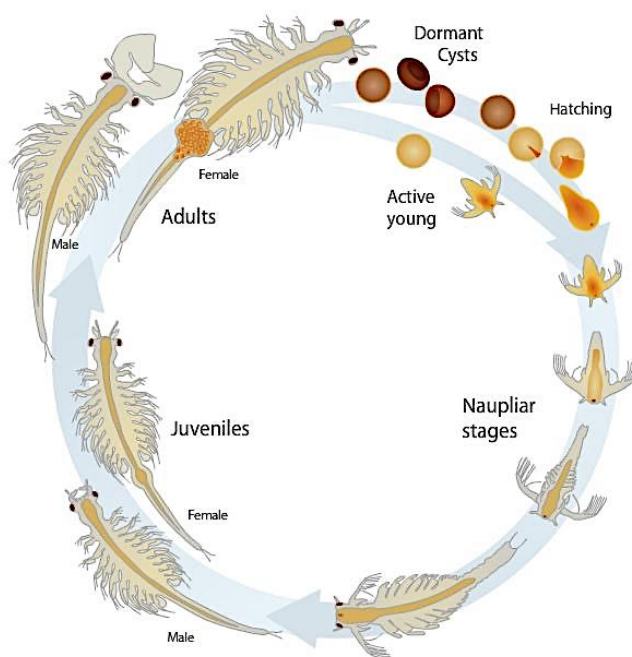




รูปที่ 2 ลักษณะของอาร์ทีเมีย

(A) อาร์ทีเมียระยะนอเพลียส และ (B) อาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัย  
ที่มา (A) Aqua Scaping Lab (2017) และ (B) Piper (2019)

อาร์ทีเมียระยะตัวเต็มวัยสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) โดยจะจับคู่ผสมพันธุ์กันระหว่างอาร์ทีเมียตัวผู้และตัวเมีย และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) ไข่จะไม่ได้รับการผสมจากตัวผู้ แต่สามารถพัฒนาต่อไปได้ ซึ่งการสืบพันธุ์ทั้งสองแบบนี้สามารถออกลูกได้ 2 แบบ ได้แก่ (1) ออกลูกเป็นตัว และ (2) ออกลูกเป็นไข่ (Lavens and Sorgeloos, 1996) ในสภาวะแวดล้อมปกติที่มีความเค็มตั้งแต่ 20-120 ppt อาร์ทีเมียจะออกลูกเป็นตัว โดยตัวอ่อนจะฟักออกจากไข่ในถุงไข่ของตัวแม่ (ovoviviparous) ซึ่งตัวอ่อนจะได้รับอาหารจากไข่แดงภายในไข่ แต่อาร์ทีเมียจะออกลูกเป็นไข่เมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนไป เช่น ความเค็มมากกว่า 130 ppt ตัวเมียจะปล่อยไข่ที่แก่แล้วออกจากถุงไข่ เรียกว่า cysts หรือไข่อาร์ทีเมีย โดยไข่อาร์ทีเมียจะมีสีน้ำตาล เปลือกหนา และจะไม่ฟักเป็นตัวจนกว่าสภาวะแวดล้อมจะเหมาะสม (Dhont et al., 2013)



รูปที่ 3 วัฏจักรชีวิตของอาร์ทีเมีย

ที่มา Courtesy University of Utah, Genetic Science Learning Center (2018)

ไซอาร์ทีเมียถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากไซอาร์ทีเมียสามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน และใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมงในการฟักตัวอาร์ทีเมียออกจากไข่ (Dhont et al., 2013) ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนนิยมใช้ตัวอ่อนของอาร์ทีเมียระยะแรกฟักออกจากไข่ (นอเพเลียส) เนื่องจากเป็นช่วงที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่สุด ประกอบด้วยโปรตีน 50.6% คาร์โบไฮเดรต 25.7% และไขมัน 14.2% (John et al., 2004) และมีขนาดตัวที่เล็กที่สุดถึงแม้ว่าอาร์ทีเมียจะเป็นอาหารมีชีวิตที่นิยมนำมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตสำหรับอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน อย่างไรก็ตามขนาดของตัวอ่อนอาร์ทีเมียยังมีขนาดใหญ่เกินไปสำหรับสัตว์น้ำหลายๆ ชนิด นอกจากนี้คุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมียไม่เหมาะสำหรับการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Dhont et al., 2013) และไซอาร์ทีเมียมีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนสูง

### 2.3.2 ไรแดงน้ำจืด

ไรแดงน้ำจืด หรือชื่อสามัญ water flea มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Moina* เป็นแพลงก์ตอนสัตว์กลุ่มครัสเตเชียน มีลำตัวสีแดง ขนาดตั้งแต่ 400-1800 ไมโครเมตร (กรมประมง, 2561) ไรแดงมีทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยไรแดงเพศเมียจะมีขนาดตัวที่ใหญ่กว่าเพศผู้ ลำตัวอ้วนเกือบกลม ส่วนไรแดงเพศผู้จะตัวเล็กและลำตัวยาวกว่า ตัวอ่อนแรกฟักของไรแดงจะมีขนาดเฉลี่ย 220-350 ไมโครเมตร (กรมประมง, 2561) ลักษณะโดยทั่วไปของไรแดงจะมีส่วนหัวกว้าง มีตาขนาดใหญ่ มีแอ่งที่ชอกคอ (Cervical sinus) หนวดคู่แรกมีขนาดใหญ่ สันไม่เป็นข้อปล้อง ไรแดงน้ำจืดมีการสืบพันธุ์ 2 แบบ ได้แก่ (1) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และ (2) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Yuslan et al., 2021) โดยมีลักษณะดังต่อไปนี้

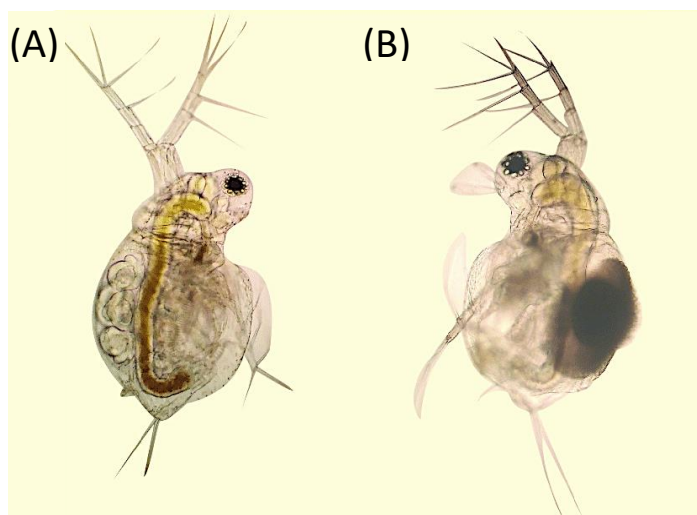


รูปที่ 4 ลักษณะของไรแดงน้ำจืดเพศผู้

ที่มา : Center for Freshwater Biology (2011)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ หรือที่เรียกว่า parthenogenesis ไรแดงเพศเมียที่มีการสืบพันธุ์ลักษณะนี้จะเรียกว่า parthenogenesis female (Mubarak et al., 2019) (รูปที่ 5A) สามารถผลิตไข่ชนิดพิเศษที่เรียกว่า parthenogenesis egg โดยไข่ชนิดพิเศษนี้สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนได้โดยไม่ต้องอาศัยเชื้อจากตัวผู้เพื่อผสมพันธุ์ ซึ่งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศนี้สามารถเกิดได้เกือบตลอดทั้งปี ไรแดงน้ำจืดจะสามารถสืบพันธุ์ได้เมื่ออายุเพียง 4-7 วัน โดยตัวเมียหนึ่งตัวสามารถมีลูกได้ 4-22 ตัว (Forro Korovchinsky et al., 2008) สามารถฟักไข่ได้ทุกๆ 1.5-2 วัน (Forro Korovchinsky et al., 2008) หากเกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำ

เกินไป หรือในภาวะขาดแคลนอาหารจะทำให้ไรแดงเปลี่ยนวิธีการสืบพันธุ์เป็นอีกรูปแบบหนึ่งคือการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Yuslan et al., 2021)



รูปที่ 5 ลักษณะของไรแดงน้ำจืดเพศเมีย

(A) ไรแดงน้ำจืดเพศเมียที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis female) และ (B) ไรแดงน้ำจืดเพศเมียที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual female)

ที่มา : Jia และคณะฯ (2018)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือ sexual female (รูปที่ 5B) ในช่วงเวลาที่สภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมไรแดงเพศเมียจะสร้างไข่ที่เรียกว่า sexual egg จำนวน 2 ฟอง ซึ่งจะต้องผสมกับเชื้อของไรแดงเพศผู้จึงจะสามารถเจริญเป็นตัวอ่อนได้ โดยตัวเมียจะปล่อยไข่ออกมา ไข่จะมีเปลือกแข็งสามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมไม่เหมาะสมได้ และไข่จะฟักเป็นตัวเมื่อสภาวะแวดล้อมดีขึ้น และไรแดงจะกลับสู่สภาวะ parthenogenesis อีกครั้งเมื่อสภาวะแวดล้อมกลับสู่สภาวะปกติ (กรมประมง, 2561)

ไรแดงน้ำจืด เป็นอาหารมีชีวิตตามธรรมชาติที่ถูกนำมาใช้อุบลสัตว์น้ำวัยอ่อนโดยเฉพาะสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ทั้งปลาสวยงามและปลาเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงในปัจจุบัน เช่น ปลากัด ปลาตุ๊ก ปลากระพง ปลานิล และปลาน้ำจืด เป็นต้น โดยไรแดงน้ำจืดมีโปรตีน 74.09% คาร์โบไฮเดรต 12.50% และไขมัน 10.19% (กรมประมง, 2561) อย่างไรก็ตามไรแดงน้ำจืดมีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันจำเป็นไม่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและอัตราการการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน

## 2.4 โคพีพอด

### 2.4.1 อนุกรมวิธานของโคพีพอด

โคพีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กชนิดหนึ่งที่มีขนาดตั้งแต่ 50-2000 ไมโครเมตร (Amparyup et al., 2022; Walter and Boxshall, 2022) ขึ้นอยู่กับสปีชีส์ โคพีพอดถูกจัดให้อยู่ใน ชั้นไฟลัมครัสเตเชีย (subphylum: crustacea) (Mauchline et al., 1998) ชั้นคลาสโคพีโพดา (subclass: copepoda) โดยโคพีโพดาแบ่งออกเป็น 3 อันดับ (order) ที่สำคัญ ได้แก่ ไซโคลพอยด์ (cyclopoid) คาลานอยด์ (calanoid) และฮาร์แพคติกอยด์ (harpacticoid) (Mauchline et al., 1998; Johnson et al., 2012) โดยมีการจัดลำดับอนุกรมวิธานโดยละเอียดดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Crustacea

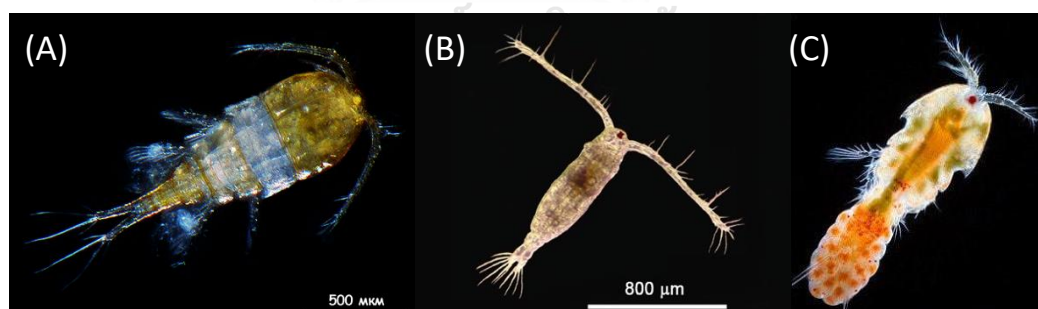
Class: Maxillopoda

Subclass: Copepoda

Order: Cyclopoid

Order: Calanoid

Order: Harpacticoid



รูปที่ 6 ลักษณะของโคพีพอด

(A) ไซโคลพอยด์ (cyclopoid) (B) คาลานอยด์ (calanoid) และ (C) ฮาร์แพคติกอยด์ (harpacticoid)

ที่มา (A) Novikov (2018), (B) Lundgren (2011) และ (C) Monti (2018)

### 2.4.2 ชีวิตวิทยาของโคฟีพอด

โคฟีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีเปลือกหุ้ม มีตา 1 ข้างอยู่ตรงกลางด้านบนหลัง ลำตัวมีรูปร่างยาวรี มีข้อปล้องที่ชัดเจน ตัวโตเต็มวัยเพศเมียจะมีขนาดลำตัวที่ใหญ่กว่าเพศผู้ โดยส่วน ลำตัวประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ (1) ส่วนหัว (cephalosome) และอก (metasome) รวมกันเรียกว่า prosome (Johnson et al., 2012) ส่วนหัวมี 5 ปล้องที่เชื่อมติดกัน ส่วนอกมี 5 ปล้อง มีรยางค์ (appendages) ทั้งหมด 11 คู่ เป็นรยางค์ในส่วนหัว 6 คู่ และรยางค์ในส่วนอก 5 คู่ และ (2) ส่วนท้อง เรียกว่า urosome (Johnson et al., 2012) เป็นส่วนท้ายของลำตัว มีลักษณะเป็น ทรวงกระบอกแคบ ไม่มีรยางค์

หนวดคู่ที่ 1 เรียกว่า “Antennule” มีลักษณะแบบ uniramous แบ่งเป็นข้อ บางข้อจะมีขน โดยตัวผู้จะมีหนวดข้างขวาหรือทั้งสองข้างเพื่อใช้ในการจับตัวเมียในขณะสืบพันธุ์ หน้าที่ของหนวดคู่นี้ จะเกี่ยวข้องกับการทรงตัวเป็นหลัก โดยหนวดคู่นี้จะมีขนาดหลากหลาย ในฮาร์แพคติกอยด์จะยาว ที่สุด และสั้นสุดในคาลานอยด์ (Støttrup, 2003)

หนวดคู่ที่ 2 เรียกว่า “Antennae” มีลักษณะแบบ biramous ตั้งอยู่ใต้หนวดคู่ที่ 1 เกี่ยวข้อง กับการจับและกินอาหาร

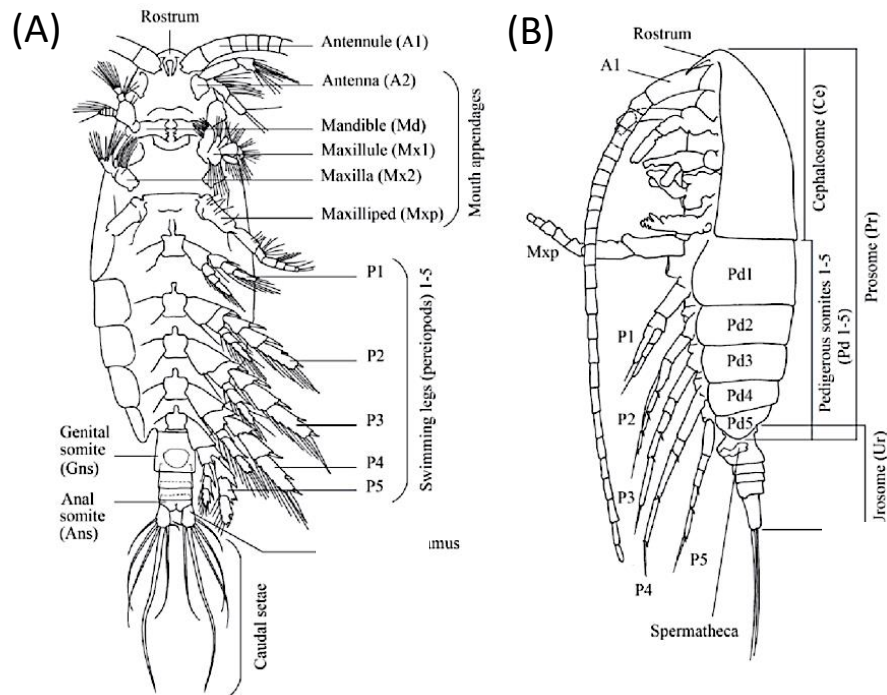
รยางค์คู่ที่ 3 เรียกว่า “Mandible” มีลักษณะแบบ biramous เป็นรยางค์ที่อยู่สองข้างของ ปาก จะพัฒนาเพื่อทำหน้าที่บดอาหาร ประกอบไปด้วยฟันหลายซี่

รยางค์คู่ที่ 4 เรียกว่า “Maxillule” เป็นรยางค์ขนาดเล็ก มีลักษณะแบบ biramous มีโครงสร้างที่ซับซ้อน มีพู่ โดยขอบพู่จะมีซี่คล้ายขนนก ขอบด้านในจะมีก้านที่มีหนามที่อยู่บนก้านเพื่อ ใช้สำหรับกินอาหาร

รยางค์คู่ที่ 5 เรียกว่า “Maxilla” เป็นรยางค์ขนาดเล็ก มีลักษณะแบบ uniramous

รยางค์คู่ที่ 6 เรียกว่า “Maxilliped” เป็นขาอกคู่แรกที่มีลักษณะแบบ uniramous พัฒนา รูปร่างเพื่อกินอาหาร

รยางค์ในส่วนอก หรือ ขาอก (Thoracic legs) มีทั้งหมด 5 คู่ เป็นขาสำหรับใช้ว่ายน้ำ (swimming legs) ขาคู่ที่ 1-4 มีลักษณะคล้ายกันทั้ง 4 คู่ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยมีลักษณะเป็น biramous แต่ขาคู่ที่ 5 จะมีลักษณะแตกต่างจากขาคู่อื่น ส่วนมากขาคู่ที่ 5 มักจะมีขนาดเล็ก โดยขา คู่ที่ 5 นี้จะมีลักษณะที่แตกต่างกันไปตามอันดับ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดของ โคฟีพอด (Conway, 2012)



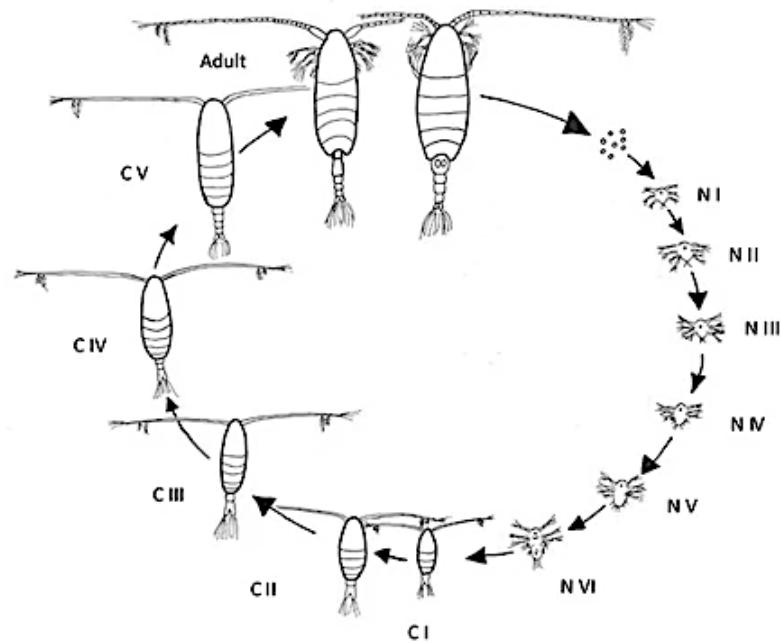
รูปที่ 7 ลักษณะของโคพีพอดระยะตัวเต็มวัย

(A) ด้านท้อง และ (B) ด้านข้าง

ที่มา : Prusova และคณะฯ (2012)

### 2.4.3 ระยะพัฒนาการของโคพีพอด

โคพีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีการลอกคราบในขณะเจริญเติบโต (metamorphosis) แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ตัวอ่อนระยะแรกฟักหรือโนเพลียส (nauplius) ระยะวัยรุ่นหรือโคพีโพติด (copepodid) และระยะตัวเต็มวัย (adult) (Støttrup, 2003)



รูปที่ 8 วัฏจักรชีวิตของโคพีพอด

โดยเริ่มตั้งแต่ฟักออกจากไข่จนถึงระยะตัวเต็มวัย โดย NI-NVI; โคพีพอดระยะนอเพเลียสระยะที่ 1-6, CI-CV; โคพีพอดระยะโคพีโพดิติสระยะที่ 1-5 และ adult; โคพีพอดระยะตัวเต็มวัย  
ที่มา : Algae Research and Supply (2018)

ระยะนอเพเลียส (nauplius) เป็นระยะแรกหลังจากที่ฟักออกจากไข่ แบ่งเป็น 6 ระยะย่อย โดยโคพีพอดในระยะนี้ลำตัวจะมีลักษณะคล้ายไข่ มีหัวและหาง ยังไม่แบ่งเป็นข้อปล้อง เริ่มมีการเจริญของหนวด รัยางค์ในส่วนหัว และขาว่ายน้ำ แต่ยังมีขนาดเล็ก

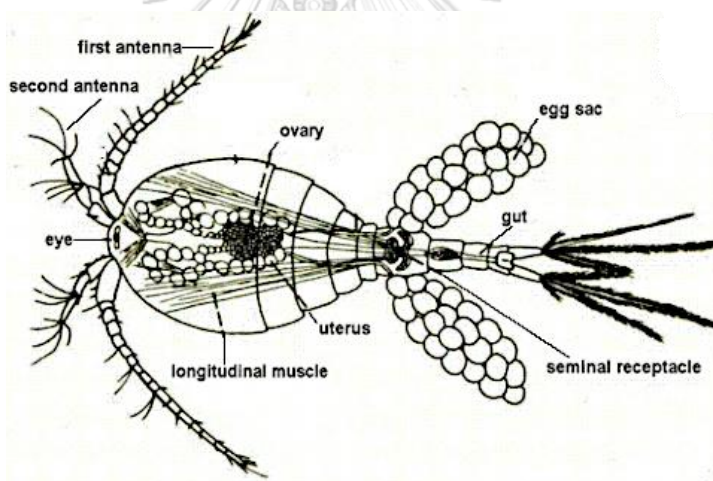
ระยะโคพีโพดิติส (copepodid) แบ่งได้เป็น 5 ระยะย่อย โดยโคพีพอดระยะนี้ลำตัวจะแบ่งเป็นข้อปล้อง หนวดและรัยางค์ในส่วนหัวเจริญจนเกือบเท่าระยะตัวเต็มวัย ขาว่ายน้ำเจริญได้ดี เริ่มมีขนบริเวณขา เริ่มเห็นความแตกต่างของทั้งสองเพศ และมีอวัยวะเพศเกิดขึ้น

ระยะตัวเต็มวัย (adult) เป็นระยะที่การเจริญของทุกส่วนในร่างกายสมบูรณ์ สามารถแบ่งเพศได้อย่างชัดเจน พร้อมสำหรับการสืบพันธุ์



#### 2.4.4 การสืบพันธุ์ของโคฟีพอด

โคฟีพอดมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Støttrup, 2003) โดยที่เพศผู้และเพศเมียจะมีอวัยวะเพศแยกกันอยู่คนละตัว โคฟีพอดเพศผู้จะมีอัณฑะ (testis) 1 ข้าง และท่อนำเชื้อ 1 ท่อ ซึ่งเปิดออกนอกตัวที่ปล่องอกปล้องที่ 1 โคฟีพอดเพศเมียจะมีถุงไข่ (egg sac) 1-2 ถุง ท่อนำไข่ (oviduct) 2 ท่อ ที่เปิดออกนอกลำตัวที่ปล้องท้องปล้องที่ 1 และมีถุงสำหรับเก็บสเปิร์ม (seminal receptacle หรือ spermathecae) 1 คู่ การปฏิสนธิจะเกิดขึ้นเมื่อสเปิร์มของเพศผู้เข้าสู่ช่องผสมพันธุ์ของเพศเมีย สเปิร์มจะถูกเก็บไว้ในถุงสำหรับเก็บสเปิร์มของเพศเมีย จากนั้นจะเกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่กับสเปิร์ม และจะถูกรวบรวมไว้ในถุงที่มีเยื่อหุ้มเกิดเป็นถุงไข่ โดยโคฟีพอดจะวางไข่อย่างน้อย 8 ครั้ง ภายใน 10 วัน ซึ่งไข่ที่ได้รับการผสมจะฟักภายใน 24 ชั่วโมง แต่จำนวนครั้งในการสืบพันธุ์อาจเปลี่ยนแปลงขึ้นกับสภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่



รูปที่ 9 วัฏจักรชีวิตของโคฟีพอด

ที่มา : Algae Research Supply (2018)

#### 2.4.5 อาหารสำหรับเลี้ยงโคฟีพอด

โคฟีพอดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่กินสาหร่ายขนาดเล็กเป็นอาหาร โดยมีรายงานการใช้สาหร่ายหลายชนิดอาหารเลี้ยงโคฟีพอด *Tetraselmis suecica* (Amparyup et al., 2022; Nielsen et al., 2019), *Tetraselmis chuii* (El-khodary et al., 2020; Pan et al., 2018), *Isochrysis galbana* (Nielsen et al., 2019; Pan et al., 2018), *Chaetoceros muelleri* (Barroso et al., 2013), *Dunaliella tertiolecta* (Boyen et al., 2019; Nielsen et al., 2019, 2020), *Nannochloropsis*

*oculate* (Pan et al., 2018), *Rhodomonas salina* (Nielsen et al., 2019, 2020) ในงานวิจัยนี้ เลือกใช้สาหร่าย 2 ชนิด ได้แก่ *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายที่ถูกใช้ อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยในปัจจุบัน โดยมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้ Pan และคณะฯ (2018) ได้รายงานว่ สาหร่าย *Tetraselmis chuii* เป็นสาหร่ายที่พบกรดไขมัน ALA สูง (23.64%) พบกรดไขมัน EPA ค่อนข้างต่ำ (4.15%) และไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่ายชนิดนี้ ในขณะที่สาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* พบกรดไขมัน EPA สูง (21.53%) แต่พบกรดไขมัน ALA และ DHA ในปริมาณต่ำ (Ackman and Ratnayake, 1990) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด) ในสาหร่าย *Tetraselmis chuii* และ *Chaetoceros calcitrans*

กรดไขมัน	<i>Tetraselmis chuii</i> (Pan et al., 2018)	<i>Chaetoceros calcitrans</i> (Ackman and Ratnayake, 1990)
<b>กรดไขมันโอเมกา-3</b>		
C18:3n-3 (ALA)	23.64	0.24
C20:5n-3 (EPA)	4.15	21.53
C22:6n-3 (DHA)	n.d.	1.16
<b>กรดไขมันโอเมกา-6</b>		
C20:4n-6 (ARA)	0.92	0.17
$\Sigma$ PUFA	55.52	47.0

\*n.d. คือไม่พบ

#### 2.4.5.1 สาหร่าย *Tetraselmis* sp.

สาหร่ายเตตราเซลมิส หรือ *Tetraselmis* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวชนิดหนึ่ง ที่เป็นแพลงก์ตอนพืช เป็นสาหร่ายเซลล์เดี่ยว (รูปที่ 10) โดยสาหร่ายในกลุ่มนี้จะมีความแตกต่างกัน ไปขึ้นอยู่กับสปีชีส์ มีความสูงตั้งแต่ 3.5-25 ไมโครเมตร (Arora et al., 2013) มีลักษณะกลมรี มีหนวด หรือแฟลกเจลลา (flagella) 4 เส้นสำหรับใช้ว่ายน้ำเคลื่อนที่ และมีคลอโรพลาสต์ขนาดใหญ่ 1 อัน ในประเทศไทยมีการใช้สาหร่ายชนิดนี้ในการอนุบาลลูกกุ้งทะเล ลูกหอยสองฝา โรติเฟอร์ ไรน้ำกร่อย และอาร์ทีเมีย (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตรัง, 2556) และมีการรายงานการใช้สาหร่ายชนิดนี้ เป็นอาหารของโคฟีพอด *A. royi* (Amparyup et al., 2022; Nielsen et al., 2019; ปวีณา และ คณะฯ, 2563)



รูปที่ 10 ลักษณะของสาหร่าย *Tetraselmis chuii*

ที่มา : The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin (2015)

#### 2.4.5.2 สาหร่าย *Chaetoceros* sp.

สาหร่ายคีโตเซอรอส หรือ *Chaetoceros* sp. เป็นไดอะตอมชนิดหนึ่ง มีสีเหลืองอมน้ำตาล รูปร่างเป็นทรงกระบอก (รูปที่ 11) มีขนาดตั้งแต่ 2-85 ไมโครเมตร (Hasle and Syvertsen, 1997) มักจะก่อตัวเป็นสายโซ่ (Campbell et al., 2022) เป็นสาหร่ายที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ เนื่องจากเลี้ยงได้ง่าย เมื่อเจริญเต็มที่แล้วยังสามารถอยู่ได้อีกระยะโดยที่ไม่ตายและไม่ตกตะกอนเหมือนแพลงก์ตอนพืชชนิดอื่นๆ ซึ่งสาหร่ายคีโตเซอรอสนี้ถูกนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงลูกปู ลูกหอย ไรน้ำกร่อย (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตรัง, 2556) และโคพิพอด *Acartia tonsa* (Barroso et al., 2013)



รูปที่ 11 ลักษณะของสาหร่าย *Chaetoceros* sp.

ที่มา : Bryant (2015)

#### 2.4.6 การใช้โคพีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

ปัจจุบันมีการศึกษาโคพีพอดน้ำเค็ม ซึ่งเป็นครัสเตเชียน (crustacean) ขนาดเล็ก ที่มีบทบาทสำคัญในการเป็นเหยื่อมีชีวิตตามธรรมชาติสำหรับสัตว์น้ำ (Williamson and Reid, 2001) โดยมีรายงานการใช้โคพีพอดในการอนุบาลปลาทะเลวัยอ่อนหลายชนิด (Busch et al., 2011; Olivotto et al., 2008; Rajkumar and Vasagam, 2006) โดยใช้ร่วมกับอาหารมีชีวิตแบบดั้งเดิม หรือใช้เป็นอาหารทางเลือกเพื่อแก้ไขปัญหาของการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน จากงานวิจัยของ Barroso และคณะฯ (2013) ได้ศึกษาการใช้โคพีพอด *Acartia tonsa* ร่วมกับโรติเฟอร์ ซึ่งเป็นอาหารมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการอนุบาลลูกปลา *Centropomus parallelus* เปรียบเทียบกับการใช้โรติเฟอร์เพียงชนิดเดียว พบว่าลูกปลาที่เลี้ยงด้วยโคพีพอดร่วมกับโรติเฟอร์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้นจาก 3.6% เป็น 16% ในขณะที่น้ำหนักตัวโดยเฉลี่ยของลูกปลาเท่ากับ 0.84 มิลลิกรัม โดยเพิ่มขึ้นจากลูกปลาชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์เพียงชนิดเดียว (0.71 มิลลิกรัม) และพบว่าปลากะรังดอกแดงระยะแรกฟัก (*Epinephelus coioides*) ที่กินโรติเฟอร์ร่วมกับโคพีพอดเป็นอาหาร มีการเจริญเติบโตและอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าปลากะรังดอกแดงที่ได้รับโรติเฟอร์เพียงอย่างเดียว (Toledo et al., 2005) เนื่องจากโคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยพบโปรตีนในโคพีพอด 71.2% คาร์โบไฮเดรต 9.5% และไขมันสูงถึง 22.5% (Vijverberg and Frank, 1976) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมัน PUFA, EPA และ DHA ปริมาณสูงเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารมีชีวิตชนิดอื่นๆ แสดงดังตารางที่ 3 นอกจากนี้โคพีพอดจะเป็นแหล่งของสารอาหารแล้ว โคพีพอดยังมีขนาดตัวที่เล็กหลากหลายขนาด และมีการว่ายน้ำเคลื่อนที่ จึงทำให้โคพีพอดกลายเป็นอาหารสัตว์น้ำมีชีวิตที่มีศักยภาพในการอนุบาลสัตว์ทะเลวัยอ่อน (Dhont et al., 2013; Drillet et al., 2011; Støttrup, 2000)

ในปัจจุบันโคพีพอดหลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้เป็นอาหารมีชีวิตในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในหลายๆ ประเทศทั่วโลก จึงทำให้มีการเพาะเลี้ยงโคพีพอดเชิงพาณิชย์ *Apocyclops panamensis*, *Acartia tonsa*, *Parvocalanus crassirostris*, *Pseudodiaptomus pelagicus*, *Tisbe biminensis* และ *Tigriopus californicus* แสดงดังตารางที่ 4 โดยเฉพาะโคพีพอดสายพันธุ์ *A. royi* ที่พบได้ในประเทศไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการเป็นอาหารมีชีวิตสำหรับอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน และเป็น

โคฟีพอดสายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ในประเทศไต้หวัน (Dhanker and Hwang, 2013)

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการของอาร์ทีเมีย ไรแดงน้ำจืด และโคฟีพอด

		อาร์ทีเมีย	ไรแดงน้ำจืด	โคฟีพอด
คุณค่าทางโภชนาการ (% ต่อน้ำหนักแห้ง)	โปรตีน	50.6	74.09	71.2
	ไขมัน	14.2	10.19	19.3
	คาร์โบไฮเดรต	25.7	12.50	9.5
อ้างอิง		John et al., 2004	กรมประมง, 2561	Vijverberg and Frank, 1976
กรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด)	PUFA	28.07	33.22	40.15
	EPA	3.18	0.86	2.49
	DHA	0.1	0.03	5.47
อ้างอิง		Chakraborty et al., 2007	Suhaimi et al., 2022	Amparyup et al., 2022

ตารางที่ 4 สายพันธุ์โคฟีพอดที่มีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ (ข้อมูลจากเว็บไซต์บริษัท, มิถุนายน 2565)

โคฟีพอด	ปริมาณ	ราคา	บริษัท	ประเทศ
<i>Cyclopoid</i>				
<i>Apoclyps panamensis</i>	8 oz	23 USD	AlgaGen	USA
	16 oz	30 USD	AlgaeBarn	USA
<i>Calanoid</i>				
<i>Acartia tonsa</i>	8 oz	23 USD	AlgaGen	USA
<i>Parvocalanus crassirostris</i>	8 oz	28 USD	AlgaGen	USA
<i>Pseudodiaptomus pelagicus</i>	8 oz	24 USD	AlgaGen	USA
<i>Harpacticoid</i>				
<i>Tisbe biminensis</i>	8 oz	17 USD	AlgaGen	USA
	16 oz	30 USD	AlgaeBarn	USA
<i>Tigriopus californicus</i>	16 oz	30 USD	AlgaeBarn	USA
	8 oz	25 USD	Pod Your Reef	USA

## 2.5 โคพีพอด *Apocyclops royi*

โคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นโคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์ (Pan et al., 2018) ที่อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำเค็ม น้ำกร่อย และบริเวณน้ำจืด (Balian et al., 2008) โคพีพอดกลุ่มไซโคลพอยด์จะมีหนวดคู่แรกสั้นกว่าความยาวของลำตัว ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่ใช้จำแนกโคพีพอดในกลุ่มนี้ นอกจากนี้ไซโคลพอยด์เพศเมียจะมีถุงไข่สองถุงดังรูปที่ 12 ไข่สามารถฟักออกมาได้เป็นตัวอ่อนระยะนอเพลียส 10-15 ตัวต่อวัน (Hickman et al., 2017) โดยโคพีพอด *A. royi* มีขนาดตัวที่เล็กกว่าโคพีพอดสายพันธุ์อื่นๆ และมีขนาดตัวที่หลากหลายขึ้นกับระยะพัฒนาการ (50-1000 ไมโครเมตร) ระยะนอเพลียสมีขนาดเพียง 50 ไมโครเมตร ในขณะที่ตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาด 950 ไมโครเมตร และเพศเมียมีขนาด 710 ไมโครเมตร (Dhankar and Hwang, 2013) สามารถพบโคพีพอดชนิดนี้ได้ทั้งในบริเวณเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน พบได้ในทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามันของประเทศไทย โคพีพอด *A. royi* สามารถดำรงชีวิตในสภาวะความเค็มที่หลากหลาย (5-30 ppt) และทนต่ออุณหภูมิในช่วงกว้างได้ (0-35 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้โคพีพอด *A. royi* ยังเป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็นทั้งกรดไขมันกลุ่ม PUFA, DHA และ EPA เมื่อเปรียบเทียบกับโคพีพอดสายพันธุ์อื่นๆ แสดงดังตารางที่ 5 จึงทำให้โคพีพอด *A. royi* เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความสำคัญในระบบนิเวศทางน้ำในการเป็นอาหารสำหรับอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิด (Pan et al., 2018)



รูปที่ 12 ลักษณะของโคพีพอด *Apocyclops royi*

ที่มา : Gréve (2019)

ตารางที่ 5 สัดส่วนของกรดไขมัน PUFA, DHA และ EPA ในโคฟีพอดแต่ละสายพันธุ์\*

โคฟีพอด	ปริมาณกรดไขมัน (% ของกรดไขมันทั้งหมด)			อ้างอิง
	PUFA	DHA (โอเมกา-3)	EPA (โอเมกา-3)	
<b>Cyclopoid</b>				
<i>Apocyclops royi</i>	53.37-81.05	4.05-48.81	2.63-11.17	Nielsen et al., 2019; Pan et al., 2018
<i>Apocyclops dengizicus</i>	17.62-37.56	4.07-20.23	1.77-8.43	Farhadian et al., 2009
<i>Paracyclopsina nana</i>	26.3-32.2	13.9-26.6	2.3-11.5	Lee et al., 2006
<b>Calanoid</b>				
<i>Acartia southwelli</i>	38.01	9.58	10.05	Vengadeshperumal et al., 2010
<i>Acartia centrura</i>	46.78	9.61	10.07	Vengadeshperumal et al., 2010
<b>Harpacticoid</b>				
<i>Tigriopus japonicus</i>	67.66	10.12	6.92	Lee et al., 2020
<i>Tigriopus kingsejongensis</i>	68.15	10.33	6.78	Lee et al., 2020

\*ปริมาณของกรดไขมันเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) โดย PUFA : กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน; DHA : docosahexaenoic acid; EPA : eicosapentaenoic acid

ในปี ค.ศ. 2018 Pan และคณะฯ ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi* สายพันธุ์ได้หวน โดยเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi* ด้วยสาหร่ายขนาดเล็ก 3 ชนิดที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกัน ดังนี้ *Isochrysis galbana*, *Nannochloropsis oculata* และ *Tetraselmis chuii* โดย *I. galbana* เป็นสาหร่ายเพียงชนิดเดียวในการทดลองนี้ที่พบกรดไขมัน DHA (10.55%) ในขณะที่ *N. oculata* พบกรดไขมัน EPA สูงที่สุด 35.20% และ *T. chuii* พบกรดไขมัน ALA สูงที่สุด 23.64% แต่กลับพบว่าโคฟีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสามชนิดมีกรดไขมัน DHA ปริมาณสูง 33.73, 23.2 และ 4.05% ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Nielsen และคณะฯ (2019) พบว่าโคฟีพอด *A. royi* สายพันธุ์ได้หวนที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Dunaliella tertiolecta* ที่พบกรดไขมัน ALA 60.20% แต่ไม่พบกรดไขมัน EPA และ DHA ในสาหร่ายชนิดนี้ *Rhodomonas salina* ที่พบกรดไขมัน ALA, EPA และ DHA ปริมาณสูง (21.14, 15.22 และ 9.42% ตามลำดับ) และสาหร่าย *Tetraselmis suecica* ที่พบกรดไขมัน EPA สูงที่สุด 19.47% และไม่พบกรดไขมัน DHA แต่กลับพบ

กรดไขมัน DHA ปริมาณสูงในโคฟีพอดทอดชุดการทดลอง 21.61, 48.81 และ 29.08% ตามลำดับ โคฟีพอด *A. royi* จึงเป็นสายพันธุ์ที่น่าสนใจในปัจจุบันที่คาดว่าจะสามารถสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นกลุ่มโอเมกา-3 ได้เองโดยไม่ต้องได้รับไขมันเหล่านี้จากสาหร่ายผ่านการทำงานของเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA (Nielsen et al., 2019; Pan et al., 2018)

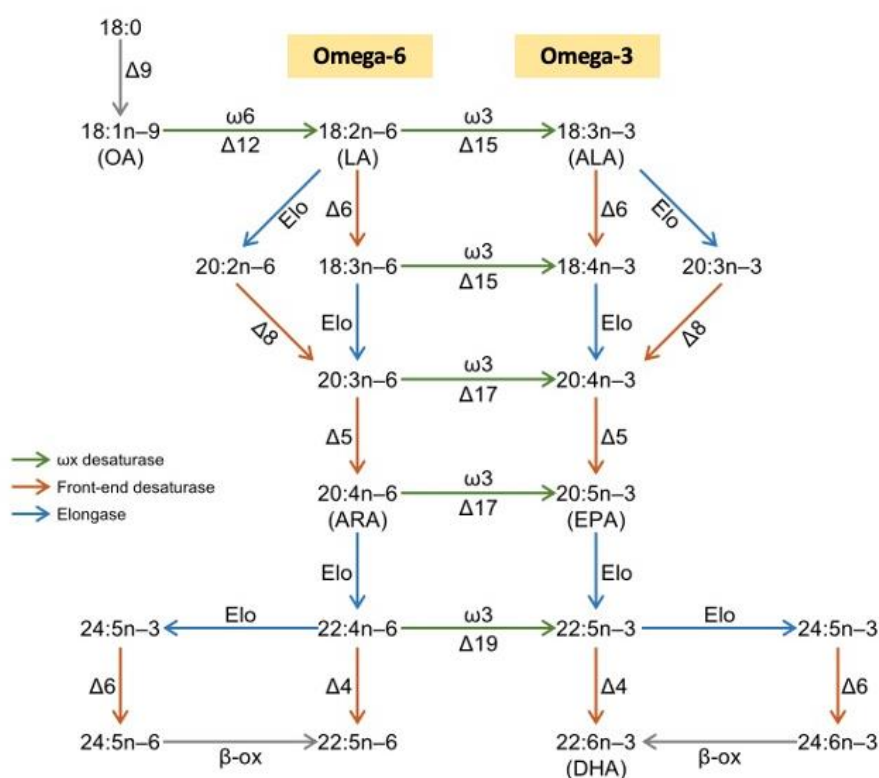
## 2.6 การสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญในระบบนิเวศทางน้ำ โดยเฉพาะในระบบนิเวศทางทะเล ทำให้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาทั้งด้านชีววิทยาและพัฒนาการเชิงวิวัฒนาการของสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบว่าสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีกลไกในการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA ผ่านการทำงานของเอนไซม์หลัก 2 กลุ่ม ได้แก่ อีลองเกส (elongase) และดีแซตทูเรส (desaturase) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีลักษณะการทำงานที่จำเพาะในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังแต่ละสปีชีส์ มีงานวิจัยหลายๆ งานที่ได้ศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่มครัสเตเชียน โดยเฉพาะแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีความสำคัญทางนิเวศวิทยาและทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA เอนไซม์ elongase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการเติมคาร์บอนให้กับกรดไขมัน มีรายงานการพบเอนไซม์ชนิดนี้ในโคฟีพอดน้ำเค็มบางชนิด (Desvillettes et al., 1997; Nanton and Castell 1998; Parrish et al., 2012) และกิ้งก่ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (Reigh and Stickney 1989) โดยสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนจะมีเอนไซม์ Elovl (Elo) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ elongase และเอนไซม์ desaturase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาการเติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมัน (Monroig and Kabeya, 2018)

การสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA ในครัสเตเชียนเริ่มจาก stearic acid (C18:0, SA) เพื่อผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายเดี่ยว oleic acid (C18:1n-9; OA) จากนั้นจะผ่านการทำงานของเอนไซม์  $\Delta 12$  หรือ  $\omega$ -6 desaturase เพื่อผลิตเป็นกรดไขมัน linoleic acid (C18:2n-6; LA) จากนั้นสามารถเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน ALA (C18:4n-3) ซึ่งเป็นกรดไขมันตั้งต้นในกลุ่มของกรดไขมันโอเมกา-3 ผ่านการทำงานของ  $\Delta 15$  หรือ  $\omega$ -3 desaturase โดยทั้ง  $\Delta 12$  และ  $\Delta 15$  desaturase จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม methyl-end desaturase โดยกรดไขมัน ALA สามารถเปลี่ยนเป็นกรดไขมันโอเมกา-3 ตัวอื่นๆ ได้ เช่น EPA ผ่าน



การทำงานของเอนไซม์  $\Delta 6$ -desaturase, elongase และ  $\Delta 5$ -desaturase ซึ่งกรดไขมัน EPA สามารถเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมัน DHA ได้ผ่านการทำงานของเอนไซม์ elongase,  $\Delta 6$ -desaturase และปฏิกิริยา  $\beta$ -oxidation ในขณะที่ครัสเตเชียนบางชนิดจะมีเอนไซม์  $\Delta 4$ -desaturase ในการเปลี่ยนเป็นกรดไขมัน DHA แสดงดังรูปที่ 13



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 13 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA

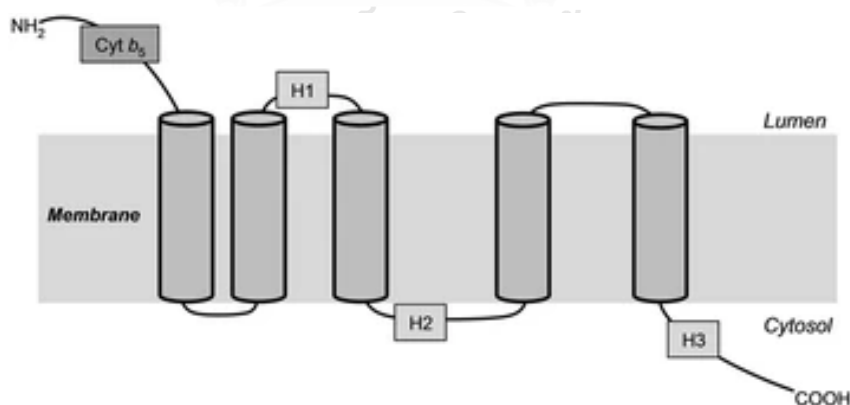
ดัดแปลงจาก Monroig และ Kabeya (2018)

ในปี ค.ศ.2019 Nielsen และคณะฯ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ได้หวนที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย 2 ชนิดที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันแตกต่างกัน *Isochrysis galbana* ที่มีกรดไขมัน DHA สูง (28.37%) และ *Dunaliella tertiolecta* ที่ไม่พบกรดไขมัน EPA และ DHA โดยศึกษายีน Elovl4, Elovl5,  $\Delta 5$  fatty acid desaturase (FAD) และ  $\Delta 6$  FAD พบว่ามีเพียงยีน  $\Delta 6$  FAD ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.0000001$ ) ในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสองชนิดที่แตกต่างกัน

โดยยีน  $\Delta 6$  FAD มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน ALA ให้กลายเป็น stearidonic acid (C18:4n-3, SDA) และทำหน้าที่ในขั้นตอนการเปลี่ยน tetracosapentaenoic acid (C24:5n-3, TPA) ไปเป็น tetracosahexaenoic **acid** (C24:6n-3, THA) ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ทำให้เอนไซม์  $\Delta 6$ -desaturase กลายเป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 และเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยา (rate-limiting enzyme) ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3

### 2.6.1 $\Delta 6$ fatty acid desaturase

เอนไซม์  $\Delta 6$  fatty acid desaturase ( $\Delta 6$  FAD) เป็นโปรตีนที่เกาะอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ (transmembrane protein) ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA โดย Jeennor และคณะฯ (2015) ได้เสนอแบบจำลองของเอนไซม์  $\Delta 6$  FAD ใน *Pythium* sp. ประกอบด้วยโดเมน Cyto- $b_5$  (Cytochrome- $b_5$ ) ที่ปลาย N (N-terminal) และ TMD (transmembrane) จำนวน 5 โดเมน แสดงดังรูปที่ 14 และพบว่าเอนไซม์  $\Delta 6$  FAD มีหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ที่ตำแหน่ง  $\Delta 6$  ให้กับกรดไขมัน นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเอนไซม์  $\Delta 6$  FAD ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิด ทั้ง ปู กุ้ง และหอย รวมถึงโคฟีพอด *A. royi* อย่างไรก็ตามยังไม่มี การรายงานข้อมูลยีน  $\Delta 6$  FAD ในโคฟีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย



รูปที่ 14 แบบจำลองของโปรตีน  $\Delta 6$  fatty acid desaturase ใน *Pythium* sp. โดยมีโดเมน Cyto- $b_5$  (Cytochrome- $b_5$ ) ที่ปลาย N (N-terminal) และมีโดเมน TMD (transmembrane) 5 โดเมน  
ที่มา : Jeennor และคณะฯ (2015)

## 2.7 เทคนิคพีซีอาร์ (PCR)

พีซีอาร์ หรือ Polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมในหลอดทดลองให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า (สุมาลี, 2553) โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งมีหลักการพื้นฐานคือการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ (DNA replication) อาศัยไพรเมอร์ (primer) ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอแม่แบบ เพื่อให้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) สามารถสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งจะทำให้จำนวนสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าในทุกรอบของการทำปฏิกิริยา เทคนิค PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

1) Denaturation หรือ denaturing เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ที่เป็นเกลียวคู่ (double stranded DNA) แยกออกจากกันกลายเป็นสายเดี่ยว (single strand DNA) โดย DNA สายเดี่ยวนี้อาจทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการเกิด DNA replication (วัชรี และ มนตรี, 2536) ขั้นตอนนี้จะเกิดที่อุณหภูมิสูง 95 องศาเซลเซียส (Frank, 2021)

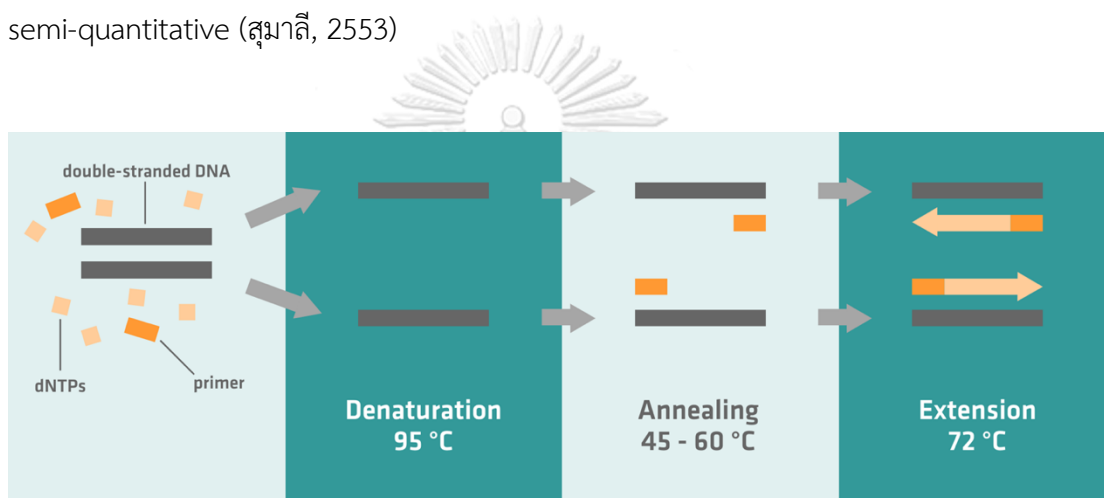
2) Annealing ไพรเมอร์ 2 สายที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สมกับปลาย 3' (3' end) ของดีเอ็นเอแม่แบบ จะเข้าไปจับตรงตำแหน่งคู่สมบนสายดีเอ็นเอแม่แบบ (วัชรี และ มนตรี, 2536) โดยมีอุณหภูมิเหมาะสมในช่วง 45-60 องศาเซลเซียส (Frank, 2021)

3) Extension หรือ extending เป็นขั้นตอนการเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทำหน้าที่ต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'→3') ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ทั้งสอง ทั้ง forward primer และ reverse primer ในทิศทาง 5'→3' โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ เช่น เอนไซม์ Taq DNA polymerase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 72 องศาเซลเซียส (วัชรี และ มนตรี, 2536)

จากขั้นตอนที่ 1-3 นับเป็นปฏิกิริยา 1 รอบ ซึ่งจะได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่หลายๆ รอบจะสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นจำนวนมาก

### 2.7.1. Reverse transcription PCR

Reverse transcription PCR หรือ RT-PCR เป็นการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมโดยมีอาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นแม่แบบ จากนั้นสังเคราะห์สายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) จากอาร์เอ็นเอด้วยปฏิกิริยา reverse transcription โดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ Oligo(dT) primer ที่จำเพาะกับอาร์เอ็นเอต้นแบบที่มีปลาย poly (A) เท่านั้น และจะใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR (วีระพงศ์, 2557) วิธีนี้นิยมใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายผ่านการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นการวัดปริมาณในแบบ semi-quantitative (สุมาลี, 2553)

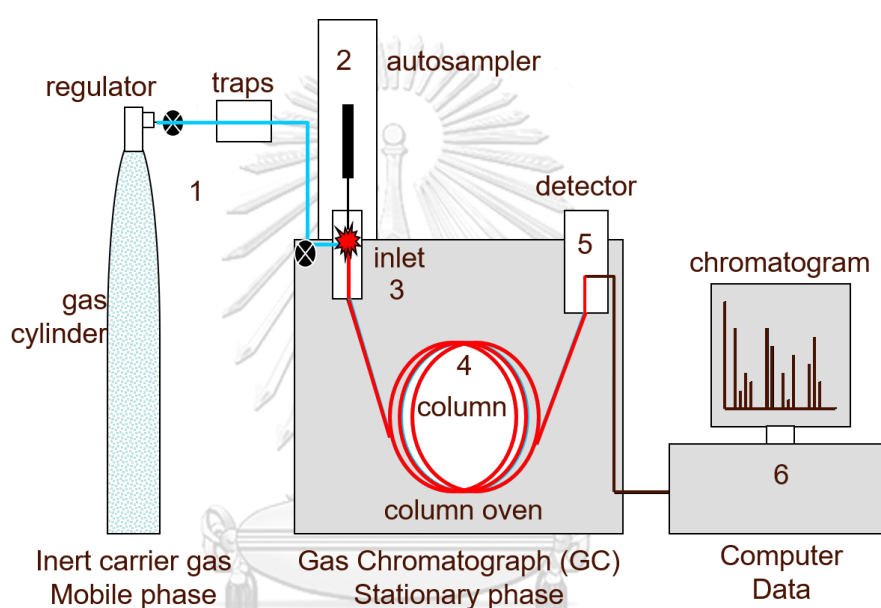


รูปที่ 15 ขั้นตอนการทำ PCR  
ที่มา : Frank (2021)

### 2.8 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี (GC)

แก๊สโครมาโทกราฟี หรือ GC เป็นวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารอินทรีย์ในตัวอย่างผสม โดยตัวอย่างหรือสารที่ต้องการวิเคราะห์ด้วย GC ต้องมีคุณสมบัติในการระเหยกลายเป็นไอได้ง่ายและมีความเสถียรต่อความร้อน เพราะการทำงานของ GC จะมีการให้ความร้อนกับสารตัวอย่างเพื่อให้สารตัวอย่างระเหยกลายเป็นไอ (Hall, 2021) จากนั้นจะทำการแยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างของสารแต่ละชนิด ทั้งสมบัติการละลายและความสามารถในการดูดซับของสารแต่ละชนิดบนเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) และเฟสอยู่กับที่ (stationary phase) (Boonlorm, 2021) เมื่อฉีดสารผสมหรือตัวอย่างที่เราสนใจเข้าเครื่อง GC สารดังกล่าว

จะเกิดการระเหยกลายเป็นไอ และจะเข้าสู่คอลัมน์โดยอาศัยแก๊สตัวพาที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ จากนั้นสารผสมแต่ละชนิดจะถูกแยกออกจากกันโดยอาศัยสมบัติการละลายและความสามารถในการดูดซับของสารในคอลัมน์ ซึ่งทำหน้าที่เป็นเฟสอยู่กับที่ หลังจากนั้นสารที่แยกได้จะออกจากคอลัมน์ตามลำดับเวลา และจะถูกตรวจวัดเพื่อบันทึกเวลา (retention time; RT) และขนาดสัญญาณของสารแต่ละชนิดออกมาในรูปของโครมาโทแกรม (chromatogram) (Boonlorn, 2021)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
Chulalongkorn University  
รูปที่ 16 แผนผังของแก๊สโครมาโทกราฟี

ที่มา : Turner และคณะ (2021)

### 2.8.1 เทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (GC-MS)

แก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC/MS) เป็นการรวมแก๊สโครมาโทกราฟี (GC) เข้ากับเครื่องแมสสเปกโตรเมตรี (MS) (Kusch, 2017) โดยเครื่อง MS จะทำหน้าที่เป็นส่วนตรวจวัด (detector) ในเครื่อง GC โดยใช้ในการวิเคราะห์สารประกอบอินทรีย์ที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้ง่าย สามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ (Boonlorn, 2021) และสามารถวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยเป็นไมโครกรัมได้

ให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้องแม่นยำ และมีประสิทธิภาพสูง มีหลักการทำงานเช่นเดียวกับ GC ทั่วไป แต่เมื่อโมเลกุลของสารในสถานะแก๊สเข้าสู่เครื่อง MS จะถูกทำให้กลายเป็นไอออนที่มีประจุบวก จากนั้นแยกไอออนออกจากกันตามค่าของประจุต่อมวล ( $m/z$ ) ของไอออนเหล่านั้น ไอออนที่แยกได้ จะถูกตรวจวัดและวิเคราะห์ผลออกเป็นแมสสเปกตรัม (mass spectrum) (Kusch, 2017) สามารถเปรียบเทียบแมสสเปกตรัมที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูลที่มีในระบบเพื่อให้ทราบชนิดของสารประกอบในตัวอย่างได้โดยไม่ต้องใช้สารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ หรือเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานได้ โดย RT ของสารที่วัดได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับ RT ของสารมาตรฐานเพื่อระบุชนิดของสารนั้นๆ ส่วนขนาดของสัญญาณหรือพื้นที่ใต้พีค (peak) จะบอกปริมาณของสารนั้นๆ ในตัวอย่าง (Boonlorn, 2021) โดยสามารถใช้ GC/MS ในการวิเคราะห์ชนิดของกรดไขมันในตัวอย่างได้ (Chauhan et al., 2014)



### บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัตถุประสงค์

##### 3.1.1 โคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH)

ไซโคพลอยด์โคพีพอด *A. royi*-TH เป็นโคพีพอดสายพันธุ์ไทย ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) โดยเลี้ยงโคพีพอดในน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มของน้ำเท่ากับ 25 ส่วนในหนึ่งพันส่วน (part per thousand, ppt) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร ทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนโคพีพอดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศโดยใช้เครื่องปั๊มลมออกซิเจน และให้แสงโดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา

##### 3.1.2 สาหร่าย *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp. และ *Chlorella* sp.

หัวเชื้อสาหร่ายที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) โดยสาหร่ายที่ใช้ในการทดลองมี 3 ชนิด ประกอบด้วย (1) สาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวน้ำเค็มขนาดเล็ก (2) สาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เป็นสาหร่ายน้ำเค็มขนาดเล็กในกลุ่มไดอะตอม และ (3) สาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. เป็นสาหร่ายสีเขียวน้ำจืดขนาดเล็ก

##### 3.1.3 ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.)

ไรแดงน้ำจืดในกลุ่ม *Moina* sp. ที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค)

##### 3.1.4 อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*)

อาร์ทีเมียสายพันธุ์ *A. salina* ที่ใช้ในการทดลองได้มากจากการเพาะไขอาร์ทีเมียที่ห้อง American eagle (USA)

## 3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

### 3.2.1 อุปกรณ์

- -20°C Freezer (Mitsubishi electric, Japan)
- -80°C Freezer (Sanyo, Japan)
- Analytical balance (Sartorius, Germany)
- Aquarium air pump
- Autoclave (TOMY, Japan)
- Automatic micropipettes P10, P20, P200 และ P1000 (Labnet International, Inc., USA)
- Centrifuge (Tomy, Japan)
- Gas chromatography-Mass spectroscopy (Trace™, Italy)
- Gel documentation (Syngene, UK)
- Gel electrophoresis system รุ่น GelMate 2000 (Toyobo, Japan)
- Handheld salinity refractometer
- Microcentrifuge (Tomy, Japan)
- Microwave
- Nano drop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermal cycler (Bio-Rad, Germany)
- Vortex mixer (Biosan, Latvia)

### 3.2.2 สารเคมี

#### สารเคมีสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)

- Chloroform
- Ethanol (Merck, Germany)
- Isopropanol
- Nuclease free water (Thermo Fisher Scientific, USA)
- TRI Reagent (MRC, USA)



#### สารเคมีสำหรับสังเคราะห์ cDNA

- Oligo(dT) primer (Thermo Fisher Scientific, USA)
  - RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ประกอบด้วย 1) 5X Reaction buffer
- 2) 10 mM dNTP mix
  - 3) RevertAid
  - 4) Ribolock

#### สารเคมีสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR

- 10X Taq Buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 100 mM dATP, dCTP, dGTP และ dTTP (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 25 mM Magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Agarose (Vivanitis, Malaysia)
- Boric acid (Merck, Germany)
- Ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Germany)
- Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (EDTA) (KemAus, Australia)
- GeneRuler 100 bp plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Tris hydroxymethyl methylamine (Vivantis, Malaysia)

#### สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์กรดไขมัน

- 37 Component FAME Mix (Supelco, USA)
- Boron trifluoride-methanol solution ( $\text{BF}_3$ -methanol)
- Dichloromethane
- Hexane
- Methanol
- Potassium chloride (KCl)
- Sodium chloride (NaCl)

### 3.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

#### 3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมัน

##### 3.3.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน

##### 3.3.1.1.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อเป็นอาหารโค

##### ฟีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ทำน้ำทะเลให้ปราศจากเชื้อโดยเครื่องสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศโดยใช้เครื่องปั๊มลมออกซิเจน และแสงโดยใช้หลอดไฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา ทำการเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นทำการขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อให้เพียงพอสำหรับนำไปเลี้ยงโคฟิพอด *A. royi*-TH โดยแบ่งสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ออกเป็น 2 ขวด ปริมาตร 2.5 ลิตร ใส่ขวดแก้วขนาด 5 ลิตร เติมหอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) และน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt จนมีปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศและแสงตลอดเวลา และทำซ้ำเช่นเดิมทุกๆ 3 วัน



รูปที่ 17 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 ภายใต้สภาวะควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส

### 3.3.1.1.2 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม

#### *Tetraselmis* sp.

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร โดยให้สาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เป็นอาหาร เลี้ยงโคพีพอดเป็นระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงโดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา กรองโคพีพอดผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร นำโคพีพอดที่กรองได้ใส่ลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ปริมาตร 2.5 ลิตร และเติมสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ปริมาตร 2.5 ลิตรทุกๆ 3 วัน เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. จำนวน 6 กรัม โดยกรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 18 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ภายใต้สภาวะควบคุมที่ 28 องศาเซลเซียส

### 3.3.1.1.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. เพื่อเป็นอาหารไรแดงน้ำจืด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ให้อากาศและแสงโดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา เลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นทำการขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. เพื่อให้เพียงพอสำหรับนำไปเลี้ยงไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. โดยแบ่งสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. ออกเป็น 2 ขวด ปริมาตร 2.5 ลิตร ใส่ขวดแก้วขนาด 5 ลิตร เติมอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) และน้ำปลอดเชื้อ จนมีปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศและแสงตลอดเวลา และทำซ้ำเช่นเดิมทุกๆ 3 วัน



รูปที่ 19 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. ในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 ภายใต้สภาวะควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงและอากาศตลอดเวลา

#### 3.3.1.1.4 การเลี้ยงไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. ด้วยสาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp.

เลี้ยงไรแดงน้ำจืดในน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร โดยให้สาหร่ายน้ำจืด *Chlorella* sp. ซึ่งเป็นสาหร่ายสีเขียวเป็นอาหาร เลี้ยงไรแดงน้ำจืดเป็นระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงตลอดเวลา กรองไรแดงน้ำจืดผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร ใส่ไรแดงน้ำจืดที่กรองได้ในน้ำปลอดเชื้อ ปริมาตร 2.5 ลิตร และเติมสาหร่ายปริมาณ 2.5 ลิตรทุกๆ วันเก็บตัวอย่างไรแดงน้ำจืด 6 กรัม โดยการกรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.1.1.5 การเตรียมอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*)

นำไขอาร์ทีเมีย (American eagle, USA) มาเพาะในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร ให้อากาศและแสงตลอดเวลา ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น เทใส่กรวยแยกสารที่มีวาล์วปิดเปิด ตั้งทิ้งไว้ให้อาร์ทีเมียและไข่ที่ไม่ได้ฝักแยกออกจากกัน โดยไขอาร์ทีเมียที่ไม่ฝักจะลอยอยู่ด้านบน และอาร์ทีเมียที่ฟักแล้วจะอยู่ด้านล่าง เก็บตัวอย่าง อาร์ทีเมีย 6 กรัม โดยการกรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและ องค์ประกอบของกรดไขมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.1.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS

วิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันของโคฟีพอด *A.royi*-TH (ข้อ 3.3.1.1.2) ไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. (ข้อ 3.3.1.1.4) และอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) (ข้อ 3.3.1.1.5) ด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) สกัดไขมันออกจากตัวอย่าง โดยเริ่มจากการบดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้เซลล์แตก เติม 2:1 (v/v) dichloromethane:methanol สำหรับสกัดไขมันออกจากตัวอย่าง นำไปวอร์เท็กซ์ (vortex) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เพื่อให้เศษเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการตกตะกอน เก็บเฉพาะส่วนใสโดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman no.1 และเติมสารละลายโพแทสเซียม คลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 0.1% ลงในส่วนใสที่กรองได้ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที สารละลายที่ได้จะเกิดการแยกชั้น โดยไขมันจะอยู่ในสารละลายส่วนล่างที่ใส ไฮโดรไลซ์กรดไขมันด้วยสารละลาย NaOH-methanol จากนั้นนำกรดไขมันที่ได้ไปทำปฏิกิริยา Methylation เพื่อเปลี่ยนกรดไขมันให้อยู่ในรูปของ Fatty acid methyl ester (FAME) ตามวิธีของ Lepage and Roy (1986) นำ FAME ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS (เครื่อง GC ยี่ห้อ Trace™ รุ่น 1310, Italy) ใช้คอลัมน์ TR-FAME ยาว 60 เมตร ขนาดเส้น ผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร สภาวะการทดลองดังนี้ ใช้แก๊สฮีเลียม (helium; He) เป็นแก๊สตัวพา ด้วยอัตรา 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที โปรแกรมควบคุม อุณหภูมิคอลัมน์ อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.50 นาที เพิ่มอุณหภูมิเป็น 180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 25 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 205 องศาเซลเซียส

ด้วยอัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาทีก และเพิ่มอุณหภูมิด้วยอัตรา 30 องศาเซลเซียสต่อนาทีก จนมีอุณหภูมิ 240 องศาเซลเซียส ให้อุณหภูมิคงที่นาน 3 นาที จากนั้นบันทึกผลเป็นโครมาโทแกรม และประเมินผลโดยเทียบกับค่า Retention time และ Mass Spectrum ขององค์ประกอบของกรดไขมันในตัวอย่างกับสารมาตรฐาน 37 Component FAME Mix (Supelco, USA) การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS ได้ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์ฮาลาล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันของโคพีพอด *A. royi*-TH, ไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. และอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; One-way ANOVA) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0

### 3.3.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ

#### 3.3.1.2.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อเป็นอาหารโคพีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt โดยเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1.1

#### 3.3.1.2.2 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อแยกระยะพัฒนาการ

โคพีพอด *A. royi*-TH สามารถแบ่งตามระยะพัฒนาการได้เป็น 3 ระยะ คือ (1) โคพีพอดระยะแรกฟัก หรือตัวอ่อนระยะนอเพเลียส (nauplius, NP) มีขนาดตัวตั้งแต่ 50-150 ไมโครเมตร (2) โคพีพอดระยะวัยรุ่น หรือระยะโคพีโพติด (copepodid, CD) มีขนาดตัวตั้งแต่ 180-275 ไมโครเมตร และ (3) โคพีพอดระยะตัวเต็มวัย (adult, AD) ประกอบด้วยโคพีพอดเพศผู้และเพศเมีย โดยมีขนาดตั้งแต่ 300 ไมโครเมตรขึ้นไป

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. โดยเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH เป็นระยะเวลา 9 วัน เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1.2 จากนั้นเก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (นอเพเลียส โคพีโพติด และตัวเต็มวัย) ระยะพัฒนาการละ 6 กรัม

โดยกรองผ่านผ้ากรองขนาด 32, 180 และ 300 ไมโครเมตร ตามลำดับ เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณ และองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.1.2.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน

เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ตามวิธีข้อ 3.3.1.1.1 โดยเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจะเก็บตัวอย่างสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายแตกตะกอน ล้างเซลล์สาหร่ายด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt อย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นเก็บสาหร่าย 6 กรัม เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS

นำตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่แยกระยะพัฒนาการ (ข้อ 3.3.1.2.2) และสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. (ข้อ 3.3.1.2.3) มาวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS ตามวิธีข้อ 3.3.1.1.6 และวิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; One-way ANOVA) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0

### 3.3.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันของโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp.

#### 3.3.1.3.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อเป็นอาหารโคฟีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1.1

#### 3.3.1.3.2 การเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp.

เลี้ยงโคฟีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมันเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1.1.2

### 3.3.1.3.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน

#### ไขมัน

เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และเก็บตัวอย่างสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. มาวิเคราะห์กรดไขมันตามวิธีข้อ 3.3.1.2.3

### 3.3.1.3.4 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เพื่อเป็นอาหาร

#### โคพีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงตลอดเวลา เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นทำการขยายปริมาณการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เพียงพอสำหรับนำไปเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH โดยแบ่งสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ออกเป็น 2 ขวด ปริมาตร 2.5 ลิตร ใส่ขวดแก้วขนาด 5 ลิตร เติมหอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) และน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt จนมีปริมาตร 5 ลิตร ให้อากาศและแสงตลอดเวลา และทำซ้ำเช่นเดิมทุกๆ 3 วัน

### 3.3.1.3.5 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม

#### *Chaetoceros* sp.

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร โดยให้สาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เป็นอาหาร เลี้ยงโคพีพอดเป็นระยะเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงตลอดเวลา กรองโคพีพอดผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร นำโคพีพอดที่กรองได้ใส่ลงในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ปริมาตร 2.5 ลิตร และเติมสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ปริมาตร 2.5 ลิตรทุกๆ 3 วัน เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. จำนวน 6 กรัม โดยกรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมัน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ





รูปที่ 20 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* ในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt ด้วยอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 ภายใต้สภาวะควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงและอากาศตลอดเวลา

### 3.3.1.3.6 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* เพื่อวิเคราะห์กรดไขมัน

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในช่วงแก้ว Duran ขนาด 5 ลิตร เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้อากาศและแสงตลอดเวลา เลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดจะเก็บตัวอย่างสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์สาหร่ายตกตะกอน ล้างเซลล์สาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* ด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt อย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นเก็บสาหร่าย 6 กรัม เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันโดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.1.3.7 การวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS

นำตัวอย่างโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis sp.* (ข้อ 3.3.1.3.2) โคฟีพอด *A. royi*-TH เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.* (ข้อ 3.3.1.3.5) สาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis sp.* (ข้อ 3.3.1.3.3) และสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros sp.*

(ข้อ 3.3.1.3.6) มาวิเคราะห์ปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันด้วย GC/MS ตามวิธีข้อ 3.3.1.1.6 และวิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0

### 3.3.2 การศึกษายีน delta-6 desaturase (ArD6D) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ของโคพีพอด *A. royi*-TH

#### 3.3.2.1 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., unpublished data) มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน (amino acid) ของยีนด้วยโปรแกรม ExPASy (<https://www.expasy.org>) ค้นหาตำแหน่งอนุรักษ์ของยีน ArD6D ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) และทำการเปรียบเทียบความเหมือนและหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (Sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

#### 3.3.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ในแต่ละระยะพัฒนาของโคพีพอด *A. royi*-TH

3.3.2.2.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อเป็นอาหารโคพีพอด  
เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ตามวิธีข้อ 3.3.1.1.1

#### 3.3.2.2.2 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะพัฒนาการ

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ตามวิธีข้อ 3.3.1.2.2 เป็นระยะเวลา 9 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกระยะพัฒนาการของโคพีพอด ได้แก่ ระยะตัวเต็มวัย, ระยะโคพีโพติด และระยะนอเพลียส ด้วยผ้ากรองขนาด 300, 180 และ 32 ไมโครเมตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ระยะพัฒนาการละ 0.5 กรัม ลงใน TRI Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 3.3.2.2.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จากโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. กลุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยเริ่มจากบดตัวอย่างโคพีพอดให้ละเอียดเพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นเติม TRI Reagent ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการวอร์เทกซ์ นาน 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออกจากสารละลาย ปิดเปิดสารละลายส่วนใสแยกใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ สกัดอาร์เอ็นเอโดยการเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมคลอโรฟอร์มกับสารละลายให้เข้ากันด้วยการวอร์เทกซ์ 2 นาที วางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารที่ได้จะแยกเป็น 2 ชั้น โดยอาร์เอ็นเอจะถูกแยกออกจากดีเอ็นเอ โปรตีน และสารอินทรีย์อื่นๆ โดยอาร์เอ็นเอจะละลายอยู่ในสารละลายส่วนบนที่ใส ปิดเปิดชั้นใสด้านบนใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่โดยไม่ให้รับกวนตะกอน เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะได้ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวอยู่ที่ก้นหลอด ปิดเปิดสารละลายใส่ทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนของอาร์เอ็นเอ ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอล (ethanol) ความเข้มข้น 75% (%v/v) ปริมาตร 1 มิลลิเมตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิดเปิดเอทานอลทิ้งและรองเอทานอลระเหยหมด ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ไปวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop 2000 spectrophotometer โดยใช้ตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจะถูกวิเคราะห์และแสดงผลออกมาในหน่วยนาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บรักษาสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป

### 3.3.2.2.4 การเตรียม cDNA

สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA) โดยใช้ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit และไพรเมอร์ Oligo(dT) เริ่มจากการเตรียมอาร์เอ็นเอของทุกตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 1,000 นาโนกรัม โดยผสมระหว่างสารสกัดอาร์เอ็นเอ, ไพร์เมอร์ Oligo(dT)

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วย Nuclease free water ให้มีปริมาตรรวม 12 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่อง Thermal cycler เมื่อครบเวลาให้แช่น้ำแข็งทันทีอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นผสมสารตามตารางที่ 6 ลงในหลอดพีซีอาร์ จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์เข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที 72 องศาเซลเซียส 15 นาที และสุดท้ายที่ 12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอคู่สม หรือ cDNA (complementary DNA) จากนั้นย้าย cDNA ที่ได้ใส่หลอดไมโครทิวบ์ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5X Reaction Buffer	4
10 mM dNTP Mix	2
Ribolock RNase inhibitor	1
RevertAid	1

### 3.3.2.2.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ด้วยเทคนิค

#### Semi-quantitative RT-PCR

ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน ArD6D ของโคฟีพอด *A. royi*-TH โดยใช้โปรแกรม Primer3Plus ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยเจือจาง cDNA ในสัดส่วน 1:10 ด้วย Nuclease free water เตรียมสารตามตารางที่ 7 โดยใช้ Forward gene primer และ Reverse gene primer ดังตารางที่ 8 จากนั้นทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 25 รอบ ของ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที และทำยสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ออกมา ขั้นตอนต่อไปนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (gel electrophoresis) โดยใช้อะกาโรส (agarose) ความเข้มข้น 1.8% (%w/v) และตรวจวัดความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide, EtBr) นำแผ่นเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel documentation ร่วมกับโปรแกรม GeneSys จะได้แถบ

ของยีน นำแถบที่ได้ไปวัดค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis คำนวณค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (relative mRNA expression) ดังสมการที่ 1 โดยใช้ Elongation factor 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) เป็นยีนควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในโคฟีพอด และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; One-way ANOVA) โดยทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0

$$\text{Relative mRNA expression} = \frac{\text{ความเข้มของแถบยีน ArD6D}}{\text{ความเข้มของแถบยีน EF1}\alpha} \quad (1)$$

ตารางที่ 7 สารเคมีที่ใช้ทำ PCR

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PCR water	11.3
10X Buffer w/(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
1 mM dNTP	2.5
Forward gene primer (F)	2.5
Reverse gene primer (R)	2.5
Taq DNA polymerase	0.2
cDNA เจือจาง 1:10	2

ตารางที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ PCR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
<b>Fatty acid desaturase</b>	
ArD6D-F	TCGCCCTTCCCATTATCTACACGC
ArD6D-R	TGTTTCGATCTGGTAATTGAGACCTCC
<b>Elongation factor 1-<math>\alpha</math> (EF1<math>\alpha</math>)</b>	
EF1 $\alpha$ -F	GTGTTGGACAAGCTGAAGTC
EF1 $\alpha$ -R	GGTCCAGTGATCATGTTCTTGATG

3.3.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp.

3.3.2.3.1 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อเป็นอาหารโคพีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ตามวิธีข้อ 3.3.1.1.1

3.3.2.3.2 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ตามวิธีข้อ 3.3.1.2.2 เป็นระยะเวลา 9 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกโคพีพอด ด้วยผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH 0.5 กรัม ลงใน TRI Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2.3.3 การเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เพื่อเป็นอาหารโคพีพอด

เตรียมหัวเชื้อสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. และเลี้ยงสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ตามวิธีข้อ 3.3.1.3.4

3.3.2.3.4 การเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน

เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ตามวิธีข้อ 3.3.1.3.5 เป็นระยะเวลา 9 วัน จากนั้นกรองเพื่อแยกโคพีพอด ด้วยผ้ากรองขนาด 32 ไมโครเมตร เก็บตัวอย่างโคพีพอด *A. royi*-TH 0.5 กรัม ลงใน TRI Reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2.3.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D

สกัดอาร์เอ็นเอออกจากตัวอย่างตามวิธีข้อ 3.3.2.2.3 นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ไปสังเคราะห์ cDNA ดังวิธีข้อ 3.3.2.2.4 จากนั้นนำ cDNA ของโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. ไปศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D เช่นเดียวกับการแสดงออกของยีนในโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการตามวิธีข้อ 3.3.2.2.5 และวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance; One-way ANOVA) โดยทำการเปรียบเทียบความ

แตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0



## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันในอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน

##### 4.1.1 การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันของ โคพีพอด ไรแดงน้ำจืด และอาร์ทีเมีย

คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันของอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนมีความสำคัญต่อพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมันจำเป็นกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA) ทั้งกรดไขมัน docosahexaenoic acid (DHA) และ eicosapentaenoic acid (EPA) ที่ส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต การพัฒนาการ และการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Matsunari et al., 2013) โดยโคพีพอด *A. royi* เป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) จึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่ได้รับความสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) เปรียบเทียบกับกรดไขมันในอาหารมีชีวิตแบบดั้งเดิมที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ (1) ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) และ (2) อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 ลักษณะของอาหารมีชีวิตที่ใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน (A) โคพีพอด *Apocyclops royi* (B) ไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. และ (C) อาร์ทีเมีย *Artemia salina* ระยะนอเพเลียส

ที่มา (A) Jørgensen and Kjær (2018), (B) Poynton และคณะฯ (2013) และ (C) Ocean Nutrition (2011)



จากการศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH, ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) และ อาร์ทีเมีย *A. salina* (ตารางที่ 9) พบว่าอาหารมีชีวิตสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนทั้งสามชนิดมีปริมาณ PUFA ที่สูง โดยโคพีพอด *A. royi*-TH พบ PUFA สูงถึง 41.00% รองลงมาคืออาร์ทีเมีย *A. salina* 37.06% และไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) 28.03% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในอาร์ทีเมีย *A. franciscana* พบกรดไขมัน PUFA 38.1% (Paulo et al., 2020) และพบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ในโคพีพอด *Apocyclops* sp. 54.23% (Cabrera et al., 2021) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *A. royi*-TH 26.04%, ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) 18.33% และอาร์ทีเมีย *A. salina* 30.17% โดยเป็นกรดไขมัน EPA 2.55%, 3.66% และ 1.59% ตามลำดับ พบกรดไขมัน DHA 4.76% ในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ไม่พบกรดไขมัน DHA ในไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) และอาร์ทีเมีย *A. salina* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis chuii* พบกรดไขมันโอเมกา-3 24.17% และกรดไขมัน DHA 4.05% (Pan et al., 2018) อย่างไรก็ตามไม่พบกรดไขมัน DHA ในไรแดง *Moina micrura* (Parakrama et al., 2012) และ *M. macrocopa* (Yan, 2011) Vannerson (2022) กล่าวว่าน่าจะพบกรดไขมัน DHA ในอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) ปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chakarborty และคณะฯ (2007) ที่พบกรดไขมัน DHA ในอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) 0.10% และ Prusińska และคณะฯ (2018) พบกรดไขมัน DHA ในอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) 0.18%

กรดไขมันกลุ่ม PUFA ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid, SC-PUFA) และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid,  $\geq C_{20}$ , LC-PUFA) จากการศึกษาพบว่าปริมาณ PUFA ในโคพีพอด *A. royi*-TH และอาร์ทีเมีย *A. salina* มีปริมาณที่สูงกว่าไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รูป 22A) โดยกรดไขมันกลุ่ม PUFA ที่พบในอาหารมีชีวิตทั้งสามชนิดเป็นกรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA เป็นหลัก โดยพบมากสุดในอาร์ทีเมีย *A. salina* รองลงมาเป็นโคพีพอด *A. royi*-TH และน้อยสุดในไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) (รูป 22B) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA ในอาหารมีชีวิตทั้งสามชนิด โดยพบ LC-PUFA มากที่สุดในโคพีพอด *A. royi*-TH ซึ่งพบปริมาณสูงกว่า LC-PUFA ที่พบในไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) และอาร์ทีเมีย *A. salina* อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) (รูป 22C)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด ไรแดงน้ำจืด และอาร์ทีเมีย\*

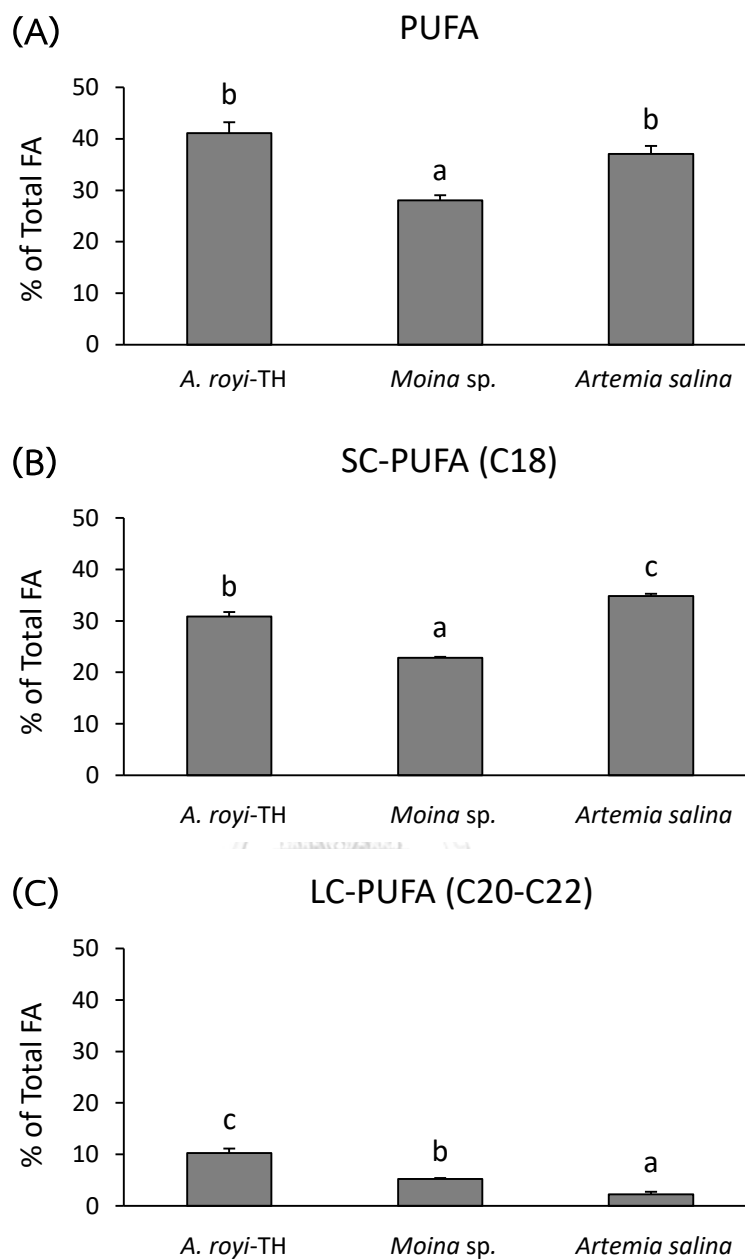
กรดไขมัน	โคฟีพอด ( <i>A. royi</i> -TH)	ไรแดงน้ำจืด ( <i>Moina</i> sp.)	อาร์ทีเมีย ( <i>Artemia salina</i> )
<b>n-3 PUFA</b>			
C18:3n-3 (ALA)	17.65±2.26 <sup>b</sup>	13.10±0.65 <sup>a</sup>	28.13±0.49 <sup>c</sup>
C20:3n-3	1.08±0.14 <sup>b</sup>	1.56±0.05 <sup>c</sup>	0.45±0.04 <sup>a</sup>
C20:5n-3 (EPA)	2.55±0.06 <sup>b</sup>	3.66±0.17 <sup>c</sup>	1.59±0.08 <sup>a</sup>
C22:6n-3 (DHA)	4.76±0.64 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.
<b>n-6 PUFA</b>			
C18:2n-6 cis (LA)	12.63±0.50 <sup>c</sup>	9.43±0.28 <sup>b</sup>	6.36±0.34 <sup>a</sup>
C18:3n-6	0.58±0.05 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.89 <sup>a</sup>
C20:2n-6	0.29±0.26 <sup>a</sup>	n.d.	0.04±0.06 <sup>a</sup>
C20:3n-6	0.25±0.04 <sup>b</sup>	n.d.	n.d.
C20:4n-6 (ARA)	1.34±0.15 <sup>b</sup>	n.d.	0.17±0.29 <sup>a</sup>
<b>ΣSFA</b>	29.62±8.57 <sup>a</sup>	28.91±0.67 <sup>a</sup>	20.69±0.89 <sup>a</sup>
<b>ΣMUFA</b>	9.04±1.23 <sup>a</sup>	23.19±0.18 <sup>b</sup>	25.27±0.98 <sup>c</sup>
<b>ΣSC_PUFA</b>	30.86±2.78 <sup>b</sup>	22.81±0.81 <sup>a</sup>	34.80±1.09 <sup>c</sup>
<b>ΣLC_PUFA</b>	10.26±0.88 <sup>c</sup>	5.22±0.22 <sup>b</sup>	2.25±0.47 <sup>a</sup>
<b>Σn-3 PUFA</b>	26.04±1.94 <sup>b</sup>	18.33±0.88 <sup>a</sup>	30.17±0.60 <sup>c</sup>
<b>Σn-6 PUFA</b>	15.09±0.22 <sup>c</sup>	9.70±0.28 <sup>b</sup>	6.88±0.99 <sup>a</sup>
<b>ΣPUFA</b>	41.12±2.12 <sup>b</sup>	28.03±1.02 <sup>a</sup>	37.06±1.56 <sup>b</sup>
<b>DHA:EPA</b>	1.87:1		

\*ปริมาณของกรดไขมันเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดย SFA: กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid); MUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid); SC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid); LC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid,  $\geq C20$ ); n-3 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 : polyunsaturated fatty acid); n-6 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 : polyunsaturated fatty acid); PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) และ n.d. คือไม่พบ

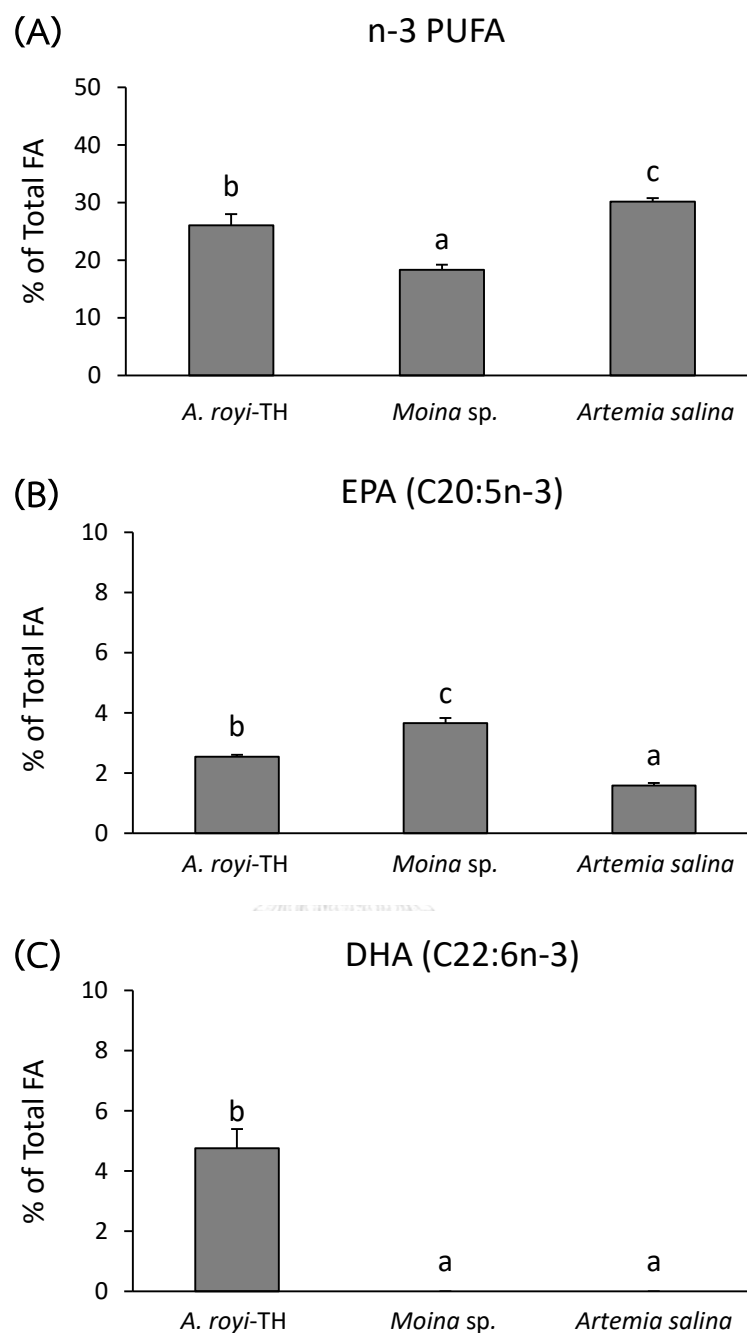
กรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 (n-3 PUFA) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดไขมัน EPA และ DHA เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ในส่วนของสมอง (cell membrane) และส่วนที่ใช้ในการมองเห็นและรับภาพ (retina) (มนทกานติ และคณะ, 2557) นอกจากนี้กรดไขมัน DHA ยังเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของสัตว์น้ำวัยอ่อน และการต้านทานโรค (Sorgeloos et al., 2001) จากรูปที่ 23A พบกรดไขมันโอเมกา-3 ปริมาณสูงในอาหารมีชีวิตทั้งสามชนิด โดยพบมากที่สุดในการที่เลี้ยง *A. salina* รองลงมาเป็นโคพีพอด *A. royi*-TH และน้อยสุดในไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยพบกรดไขมัน EPA มากที่สุดในไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) รองลงมาเป็นโคพีพอด *A. royi*-TH และน้อยสุดในการที่เลี้ยง *A. salina* (รูปที่ 23B) และจากรูป 23C พบกรดไขมัน DHA ในโคพีพอด *A. royi*-TH มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

กรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 (n-6 PUFA) โดยเฉพาะกรดไขมัน ARA ที่มีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Bessonart et al., 1999) จากการศึกษาปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 (รูปที่ 24A) พบกรดไขมันโอเมกา-6 ในอาหารมีชีวิตทั้งสามชนิด โดยพบมากที่สุดในการที่เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH เช่นเดียวกับกรดไขมัน ARA ที่พบมากที่สุดในการที่เลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH (รูปที่ 24B) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

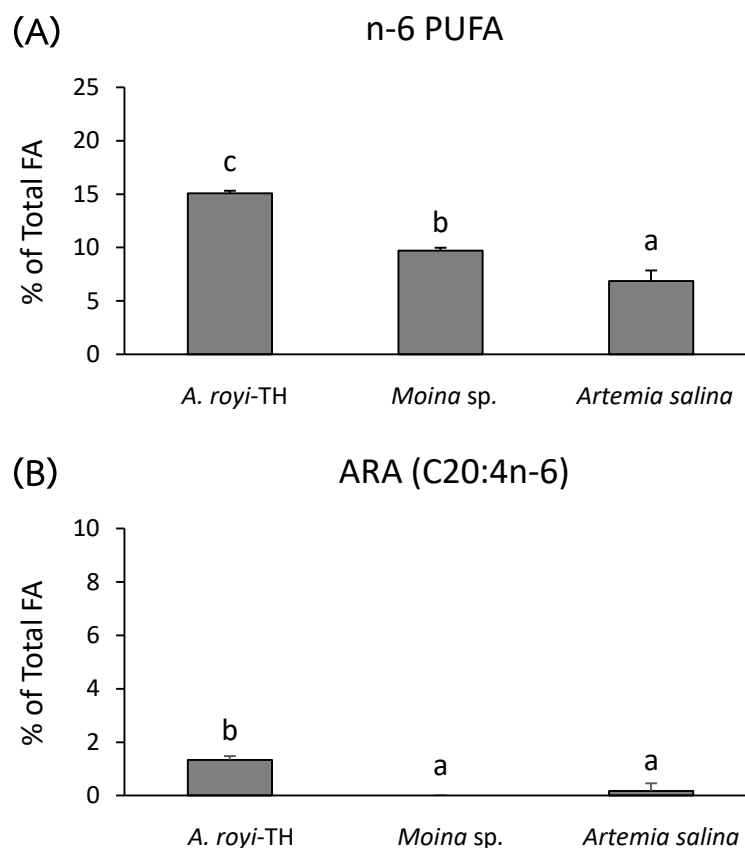
จากการศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในอาหารมีชีวิตทั้งสามชนิด ได้แก่ โคพีพอด *A. royi*-TH, ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) และอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH เป็นอาหารมีชีวิตที่มีกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA และ n-3 PUFA สูง และเป็นอาหารมีชีวิตเพียงชนิดเดียวที่พบทั้ง กรดไขมัน EPA, DHA และ ARA โดย Jin และคณะ (2017) พบว่าอัตราส่วนระหว่างกรดไขมัน DHA:EPA ส่งผลต่อการเจริญของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมของกรดไขมัน DHA:EPA อยู่ที่ 0.5-2.0 (National Research Council, 2011) จากผลการวิจัยพบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH มีอัตราส่วนระหว่างกรดไขมัน DHA:EPA เท่ากับ 1.87:1 (ตารางที่ 9) จึงทำให้โคพีพอด *A. royi*-TH เป็นสิ่งมีชีวิตที่น่าสนใจในการพัฒนาเป็นอาหารมีชีวิตสำหรับอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนต่อไป



รูปที่ 22 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของโคพีพอด *A. royi-TH*, ไรแดงน้ำจืด *Moina sp.* และอาร์ทีเมีย *Artemia salina* (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (B) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid, SC-PUFA) และ (C) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 23 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของโคฟีพอด *A. royi-TH*, ไรแดงน้ำจืด *Moina sp.* และอาร์ทีเมีย *Artemia salina* (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA) (B) Eicosapentaenoic acid (EPA) และ (C) Docosahexaenoic acid (DHA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 24 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของโคฟีพอด *A. royi-TH*, ไรแดงน้ำจืด *Moina sp.* และอาร์ทีเมีย *Artemia salina* (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 polyunsaturated fatty acid, n-6 PUFA) (B) Arachidonic acid (ARA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi-TH* ในแต่ละระยะพัฒนาการ

สัตว์น้ำวัยอ่อนระยะแรกฟักมีขนาดลำตัวและขนาดปากที่ค่อนข้างเล็ก จึงต้องการอาหารมีชีวิตที่มีขนาดตัวที่เล็ก และมีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันที่เหมาะสม จึงได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi-TH* แต่ละระยะพัฒนาการที่มีขนาดตัวที่แตกต่างกัน โดยโคฟีพอด *A. royi-TH* สามารถจำแนกตามระยะพัฒนาการได้เป็น 3 ระยะ ได้แก่ ระยะนอเพเลียส (NP) ระยะโคฟีโพดิด (CD) และระยะตัวเต็มวัย (AD) แสดงดังรูปที่ 25 โดยเลี้ยงโคฟีพอด *A. royi-TH* ด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis sp.* สาหร่ายสีเขียวที่ไม่พบกรดไขมัน DHA



รูปที่ 25 ลักษณะของโคพีพอด *Apocyclops royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ (A) โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะนอเพเลียส (Nauplius, NP) (B) โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโคพีโพดิด (Copepodid, CD) และ (C) โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะตัวเต็มวัย (Adult, AD)

ที่มา : Amparyup และคณะ (2022)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ด้วยวิธี GC/MS (ตารางที่ 10) พบกรดไขมัน PUFA สูงถึง 36.11% โดยเป็นกรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA 32.66% และ LC-PUFA 3.45% เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. พบโอเมกา-3 24.71% โดยเป็นกรดไขมัน ALA 22.22%, EPA 2.49% และไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ซึ่งสอดคล้องกับสาหร่าย *Tetraselmis chunii* ที่พบกรดไขมัน ALA 23.64%, EPA 4.15% และไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่ายชนิดนี้ (Pan et al., 2018) เช่นเดียวกับ Nielsen และคณะ (2019) ที่ไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่าย *Tetraselmis suecica* นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเมกา-6 ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. 11.40% โดยเป็นกรดไขมัน ARA เพียง 0.96%

การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ในระยะนอเพเลียส (NP) โคพีโพดิด (CD) และตัวเต็มวัย (AD) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. ด้วยวิธี GC/MS (ตารางที่ 10) พบกรดไขมัน PUFA ในโคพีพอด *A. royi*-TH ระยะ NP, ระยะ CD และระยะ AD เท่ากับ 22.50%, 38.53% และ 41.85% ตามลำดับ โดยปริมาณของ PUFA ในโคพีพอด *A. royi*-TH มีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าในโคพีพอด *Apocyclops dengizicus* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis tetrathele* พบว่ามีปริมาณของ PUFA 37.56% (Farhadian et al., 2009) โดยทั้งสามระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH (NP, CD และ AD) พบว่ามีกรดไขมัน LC-PUFA ปริมาณสูง เท่ากับ 5.27%, 7.98% และ 10.36% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอดทั้งสามระยะ พบว่ามีค่าเท่ากับ 15.58%, 25.81% และ 26.64% ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบกรดไขมัน DHA ในโคฟีพอดทุกระยะพัฒนาการ โดยพบมากที่สุดในโคฟีพอดระยะ AD 4.85% รองลงมาคือระยะ CD 3.54% และระยะ NP 2.78% นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเมกา-6 ในโคฟีพอดทั้งสามระยะ มีปริมาณเท่ากับ 6.92%, 12.72% และ 15.21% ตามลำดับ โดยพบกรดไขมัน ARA ในโคฟีพอดระยะ CD 0.95% และระยะ AD 1.31% แต่ไม่พบกรดไขมัน ARA ในโคฟีพอดระยะ NP ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cabrera และคณะ (2021) ที่พบกรดไขมัน ARA 0.91% ในฟีพอด *Apocyclops* sp. ระยะ AD

จากรูปที่ 26A พบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ปริมาณสูงในโคฟีพอด *A. royi*-TH ทั้งสามระยะพัฒนาการ โดยกรดไขมันกลุ่ม PUFA ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ทุกระยะพัฒนาการเป็นกรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA เป็นหลัก (รูปที่ 26B) อย่างไรก็ตามยังพบกรดไขมัน LC-PUFA ในโคฟีพอด *A. royi*-TH ทุกระยะ (รูปที่ 26C) โดยกรดไขมันกลุ่ม PUFA, SC-PUFA และ LC-PUFA พบมากที่สุดในระยะ AD รองลงมาเป็นระยะ CD แต่พบว่ากรดไขมันทั้งสามกลุ่มในโคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะ AD และ CD มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และพบกรดไขมันทั้งสามกลุ่มนี้น้อยที่สุดในโคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะ NP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

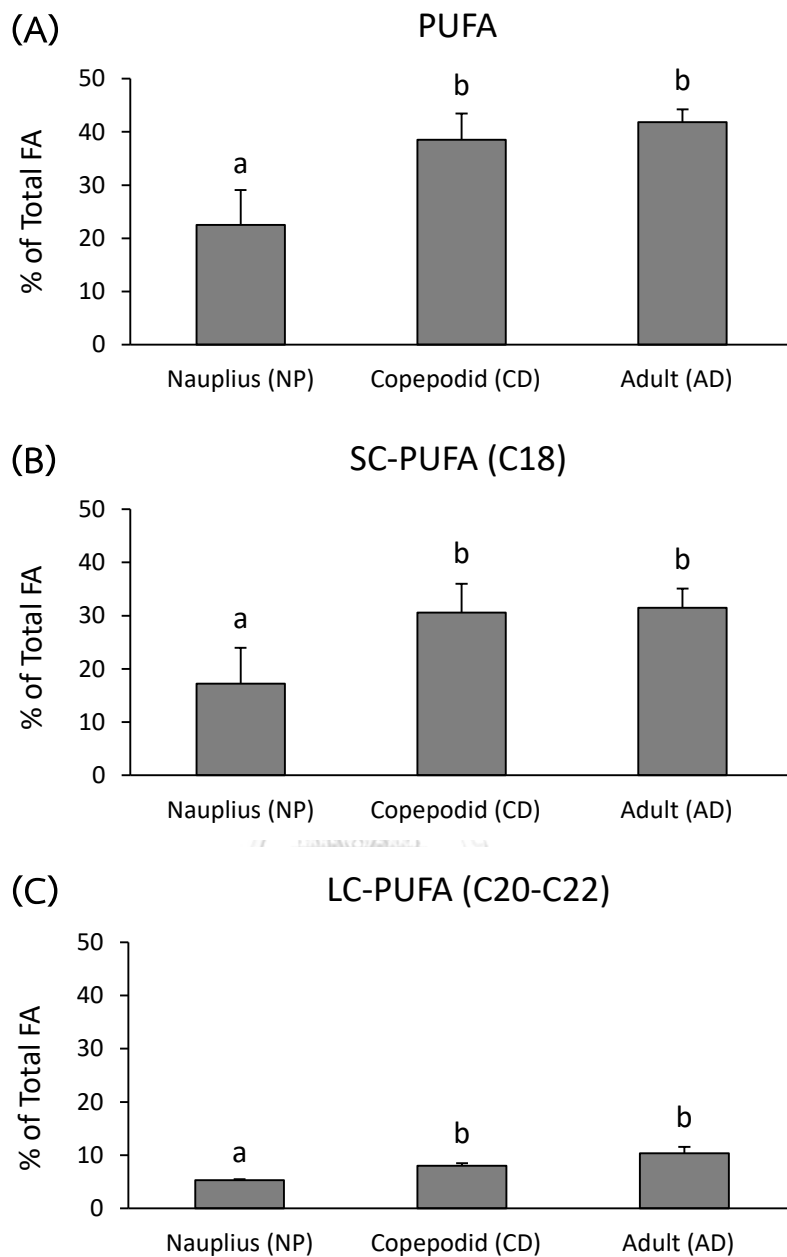
การศึกษากรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 (n-3 PUFA) ในโคฟีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ แสดงดังรูปที่ 27A พบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 สูงในโคฟีพอด *A. royi*-TH ระยะ CD และ AD โดยมีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และพบน้อยสุดในระยะ NP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้เมื่อศึกษากรดไขมันในกลุ่มโอเมกา-3 พบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ทั้งสามระยะพัฒนาการมีกรดไขมัน EPA ปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ( $p > 0.05$ ) (รูปที่ 27B) ในขณะที่กรดไขมัน DHA มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละระยะพัฒนาการ โดยพบมากที่สุดในระยะ AD รองลงมาเป็นระยะ CD และพบน้อยที่สุดในระยะ NP (รูปที่ 27C)



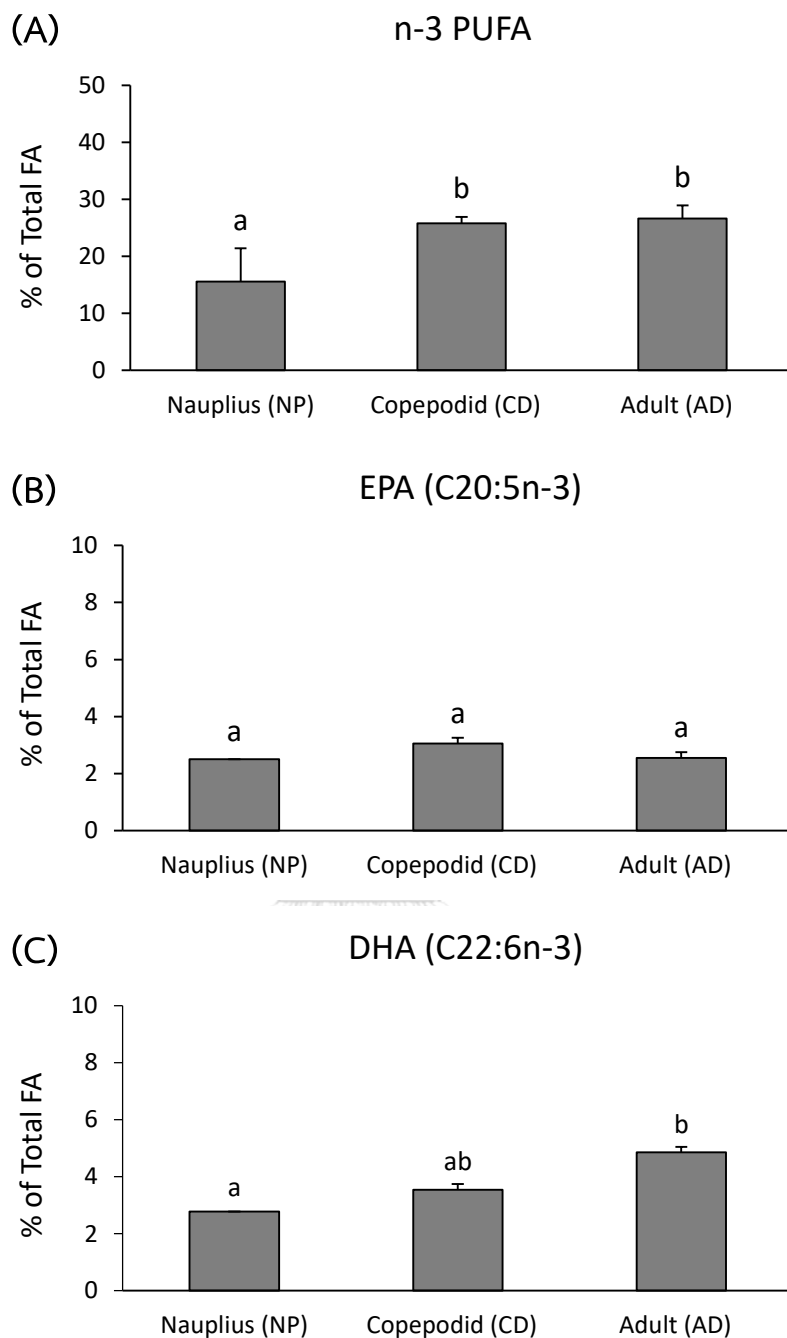
ตารางที่ 10 องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ\*

Fatty acids	<i>Tetraselmis sp.</i>	โคพีพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH		
		Nauplius (NP)	Copepodid (CD)	Adult (AD)
<b>n-3 PUFA</b>				
C18:3 n-3 (ALA)	22.22±0.97	10.31±6.04 <sup>a</sup>	18.91±1.97 <sup>b</sup>	18.10±3.01 <sup>b</sup>
C20:3 n-3	n.d.	n.d.	0.64±0.21 <sup>ab</sup>	1.15±0.10 <sup>b</sup>
C20:5 n-3 (EPA)	2.49±0.26	2.50±0.19 <sup>a</sup>	3.05±0.84 <sup>a</sup>	2.55±0.08 <sup>a</sup>
C22:6 n-3 (DHA)	n.d.	2.78±0.01 <sup>a</sup>	3.54±0.48 <sup>ab</sup>	4.85±0.88 <sup>b</sup>
<b>n-6 PUFA</b>				
C18:2 n-6 cis (LA)	9.96±1.73	6.92±0.72 <sup>a</sup>	11.09±3.43 <sup>a</sup>	12.81±0.55 <sup>a</sup>
C18:3 n-6	0.48±0.10	n.d.	0.56±0.02 <sup>b</sup>	0.59±0.06 <sup>b</sup>
C20:2 n-6	n.d.	n.d.	n.d.	0.24±0.34 <sup>a</sup>
C20:3 n-6	n.d.	n.d.	0.24±0.00 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>a</sup>
C20:4 n-6 (ARA)	0.96±0.24	n.d.	0.95±0.20 <sup>b</sup>	1.31±0.19 <sup>b</sup>
<b>ΣSFA</b>	22.74±9.46	44.58±4.06 <sup>a</sup>	21.58±1.16 <sup>a</sup>	27.10±10.42 <sup>a</sup>
<b>ΣMUFA</b>	6.25±0.37	14.20±1.12 <sup>a</sup>	9.00±2.16 <sup>a</sup>	8.86±1.68 <sup>a</sup>
<b>ΣSC_PUFA</b>	32.66±0.79	17.23±6.76 <sup>a</sup>	30.56±5.43 <sup>b</sup>	31.49±3.62 <sup>b</sup>
<b>ΣLC_PUFA</b>	3.45±0.49	5.27±0.20 <sup>a</sup>	7.98±0.50 <sup>b</sup>	10.36±1.22 <sup>b</sup>
<b>Σn-3 PUFA</b>	24.71±1.21	15.58±5.84 <sup>a</sup>	25.81±1.10 <sup>b</sup>	26.64±2.31 <sup>b</sup>
<b>Σn-6 PUFA</b>	11.40±1.42	6.92±0.72 <sup>a</sup>	12.72±3.81 <sup>ab</sup>	15.21±0.10 <sup>b</sup>
<b>ΣPUFA</b>	36.11±0.48	22.50±6.56 <sup>a</sup>	38.53±4.92 <sup>b</sup>	41.85±2.40 <sup>b</sup>
<b>DHA:EPA</b>		1.11:1	1.16:1	1.90:1

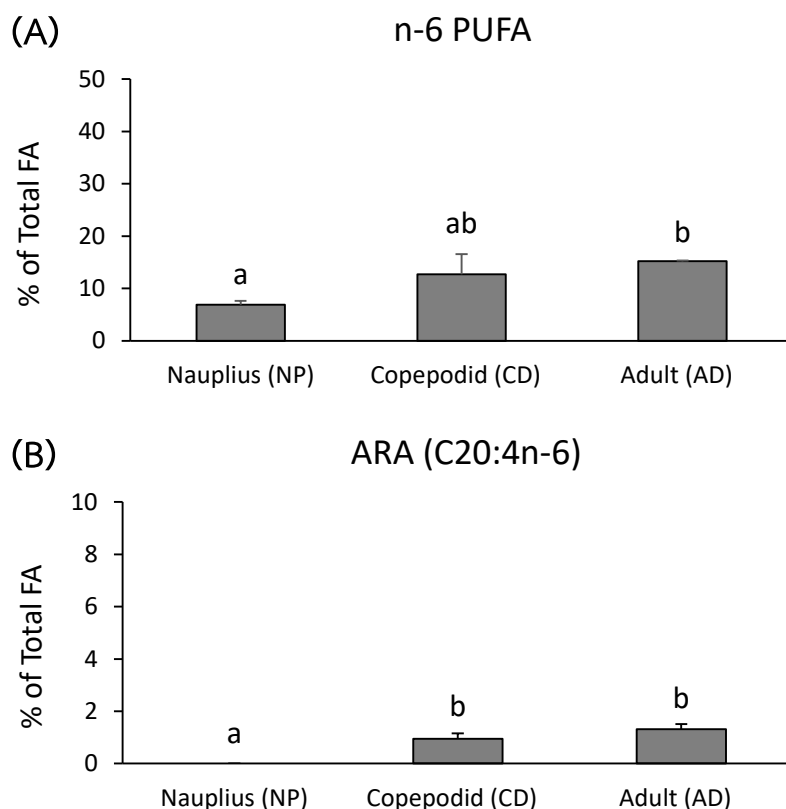
\*ปริมาณของกรดไขมันเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) แสดงในรูปของค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดย SFA: กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid); MUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid); SC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid); LC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid,  $\geq C20$ ); n-3 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 : polyunsaturated fatty acid); n-6 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 : polyunsaturated fatty acid); PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) และ n.d. คือไม่พบ



รูปที่ 26 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (B) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid, SC-PUFA) และ (C) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 27 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA) (B) Eicosapentaenoic acid (EPA) และ (C) Docosahexaenoic acid (DHA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 28 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 polyunsaturated fatty acid, n-6 PUFA) และ (B) Arachidonic acid (ARA) โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

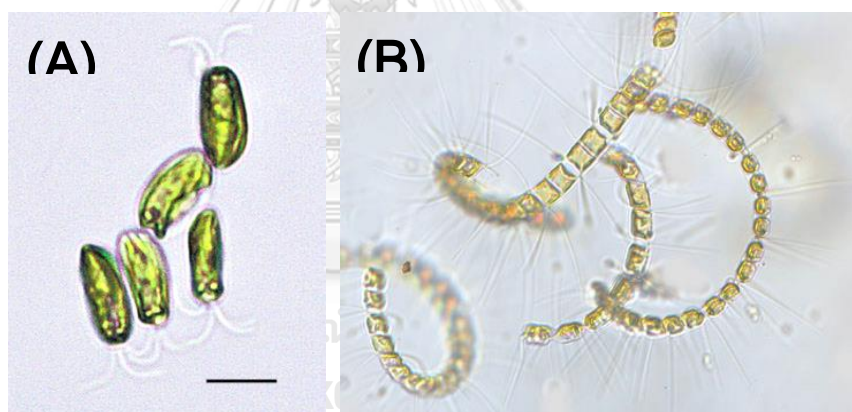
การศึกษาปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 (รูปที่ 28A) ในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ พบว่ากรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในแต่ละระยะพัฒนาการ โดยพบน้อยสุดในโคพีพอดระยะ NP และมากที่สุดในระยะ AD ในขณะที่กรดไขมัน ARA (รูปที่ 28B) ซึ่งเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ชนิดหนึ่งกลับพบแค่ในโคพีพอดระยะ CD และ AD เท่านั้น โดยพบในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และไม่พบกรดไขมันชนิดนี้ในโคพีพอดระยะ NP

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ (NP, CD และ AD) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. สาหร่ายสีเขียวที่ไม่พบกรดไขมัน DHA พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ทุกระยะพัฒนาการมีอัตราส่วนระหว่างกรดไขมัน

DHA:EPA ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นอาหารอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน (1.11-1.90:1) นอกจากนี้โคพีพอด *A. royi*-TH ทุกระยะพัฒนาการพบกรดไขมัน DHA โดยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในทุกระยะพัฒนาการ จึงเป็นไปได้ว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการมีกลไกบางอย่างที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกรดไขมัน DHA เป็นหลัก

#### 4.1.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp.

คุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันที่แตกต่างกันของสาหร่ายที่ใช้เลี้ยงโคพีพอดส่งผลต่อกรดไขมันในโคพีพอด งานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาสาหร่ายสองชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันที่ต่างกัน ได้แก่ (1) สาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. และ (2) สาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. แสดงดังรูปที่ 29 ซึ่งมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาการใช้สาหร่ายสองชนิดเป็นอาหารสำหรับโคพีพอด (Tohamy et al., 2020)



รูปที่ 29 ลักษณะของสาหร่ายที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคพีพอด *A. royi*-TH (A) สาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ (B) สาหร่าย *Chaetoceros* sp.

ที่มา (A) Borowitzka (2018) และ (B) Bryant (2015)

การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. (ตารางที่ 11) พบว่าสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มีกรดไขมันกลุ่ม PUFA สูงถึง 36.11% โดยเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 24.71% ซึ่งประกอบไปด้วยกรดไขมัน ALA 22.22% และ EPA 2.49% แต่ไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่ายชนิดนี้ (Pan et al., 2018; Nielsen et al., 2019) และพบกรด

ไขมันกลุ่มโอเมกา-6 11.40% โดยเป็นกรดไขมัน ARA เพียง 0.96% ในขณะที่สาหร่าย *Chaetoceros* sp. พบกรดไขมันกลุ่ม PUFA และโอเมกา-3 เพียง 23.62% และ 18.33% ตามลำดับ แต่กลับพบกรดไขมัน EPA สูงถึง 17.69% และพบกรดไขมัน DHA 0.65% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบกรดไขมัน EPA ในสาหร่าย *Chaetoceros muelleri* 17.15% (Vega and Saavedra, 2009) และพบกรดไขมัน DHA 1.16% ในสาหร่าย *Chaetoceros calcitrans* (Ackman et al., 1990) นอกจากนี้ยังพบกรดไขมันโอเมกา-6 ในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. 5.29% โดยเป็นกรดไขมัน ARA 3.15% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ackman และคณะ (1990) ที่พบกรดไขมัน ARA ในสาหร่าย *Chaetoceros gracilis* 3.50%

การศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่ไม่พบกรดไขมัน DHA และพบกรดไขมัน EPA ต่ำ และสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่พบกรดไขมัน EPA สูง (ตารางที่ 11) พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. (กรดไขมัน EPA ต่ำ 2.49%) มีกรดไขมันกลุ่ม PUFA สูงถึง 41.12% โดยเป็นกรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA สูงถึง 30.86% และกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA 10.26% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Farhadian และคณะ (2009) ที่พบกรดไขมันกลุ่ม PUFA 37.56% ในโคพีพอด *A. dengizicus* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. tetrahele* นอกจากนี้พบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. 26.04% โดยเป็นกรดไขมัน EPA 2.55% และกรดไขมัน DHA 4.76% ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของปวีณา และคณะ (2563) ที่พบกรดไขมัน EPA 2.93% ในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *T. suecica* และพบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 15.09% ซึ่งเป็นกรดไขมัน ARA เพียง 1.34% ในขณะที่โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. (กรดไขมัน EPA สูง 17.69%) พบกรดไขมันกลุ่ม PUFA 23.69% โดยเป็นกรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA เพียง 1.94% และกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA สูงถึง 21.66% เมื่อวิเคราะห์กรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 พบ 19.14% เป็นกรดไขมัน EPA 11.48% และกรดไขมัน DHA สูงถึง 7.58% และพบกรดไขมันโอเมกา-6 4.45% โดยเป็นกรดไขมัน ARA 2.54%

ตารางที่ 11 องค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. และ โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด\*

Fatty acids	สาหร่าย		โคพีพอด <i>Apocyclops royi</i> -TH	
	<i>Tetraselmis</i> sp.	<i>Chaetoceros</i> sp.	ArTet	ArChaeto
<b>n-3 PUFA</b>				
C18:3 n-3 (ALA)	22.22±0.97 <sup>b</sup>	n.d.	17.65±2.26 <sup>e</sup>	0.08±0.14 <sup>d</sup>
C20:3 n-3	n.d.	n.d.	1.08±0.14 <sup>e</sup>	n.d.
C20:5 n-3 (EPA)	2.49±0.26 <sup>b</sup>	17.69±4.75 <sup>a</sup>	2.55±0.06 <sup>d</sup>	11.48±3.09 <sup>e</sup>
C22:6 n-3 (DHA)	n.d.	0.65±0.23 <sup>b</sup>	4.76±0.64 <sup>d</sup>	7.58±1.12 <sup>e</sup>
<b>n-6 PUFA</b>				
C18:2 n-6 cis (LA)	9.96±1.73 <sup>b</sup>	0.89±0.31 <sup>a</sup>	12.63±0.50 <sup>d</sup>	1.68±0.31 <sup>e</sup>
C18:3 n-6	0.48±0.10 <sup>a</sup>	1.24±0.36 <sup>b</sup>	0.58±0.05 <sup>d</sup>	0.18±0.31 <sup>e</sup>
C20:2 n-6	n.d.	n.d.	0.29±0.26 <sup>e</sup>	n.d.
C20:3 n-6	n.d.	n.d.	0.25±0.04 <sup>e</sup>	0.06±0.11 <sup>d</sup>
C20:4 n-6 (ARA)	0.96±0.24 <sup>a</sup>	3.15±1.43 <sup>b</sup>	1.34±0.15 <sup>d</sup>	2.54±1.71 <sup>d</sup>
<b>ΣSFA</b>	22.74±9.46 <sup>a</sup>	27.27±4.09 <sup>a</sup>	29.62±8.57 <sup>d</sup>	38.95±6.63 <sup>d</sup>
<b>ΣMUFA</b>	6.25±0.37 <sup>a</sup>	18.41±4.67 <sup>b</sup>	9.04±1.23 <sup>d</sup>	20.69±6.65 <sup>e</sup>
<b>ΣSC_PUFA</b>	32.66±0.79 <sup>b</sup>	2.14±0.27 <sup>a</sup>	30.86±2.78 <sup>e</sup>	1.94±0.52 <sup>d</sup>
<b>ΣLC_PUFA</b>	3.45±0.49 <sup>a</sup>	21.49±5.01 <sup>b</sup>	10.26±0.88 <sup>d</sup>	21.66±2.88 <sup>e</sup>
<b>Σn-3 PUFA</b>	24.71±1.21 <sup>a</sup>	18.33±4.73 <sup>a</sup>	26.04±1.94 <sup>d</sup>	19.14±4.15 <sup>d</sup>
<b>Σn-6 PUFA</b>	11.40±1.42 <sup>b</sup>	5.29±1.70 <sup>a</sup>	15.09±0.22 <sup>e</sup>	4.45±1.93 <sup>d</sup>
<b>ΣPUFA</b>	36.11±0.48 <sup>b</sup>	23.62±5.10 <sup>a</sup>	41.12±2.12 <sup>e</sup>	23.69±3.22 <sup>d</sup>
<b>DHA:EPA</b>		0.04:1	1.87:1	0.66:1

\*ปริมาณของกรดไขมันเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด (% of total fatty acid) แสดงในรูปของ ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation) ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน ในแต่ละชุดการทดลองแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p<0.05$ ) โดย ArTet: โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp.; ArChaeto: โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp.; SFA: กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid); MUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acid); SC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid); LC-PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid); n-3 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 : polyunsaturated fatty acid); n-6 PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-

6 (omega-6 : polyunsaturated fatty acid); PUFA: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid) และ n.d. คือไม่พบ

จากรูปที่ 30A การศึกษากรดไขมันกลุ่ม PUFA ของสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. และโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด พบว่าสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มีกรดไขมันกลุ่ม PUFA สูงกว่าที่พบในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่พบกรดไขมัน PUFA สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กรดไขมันกลุ่ม SC-PUFA ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มีปริมาณสูงกว่าสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่พบกรดไขมัน PUFA สูงกว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 30B) ในขณะที่พบกรดไขมันกลุ่ม LC-PUFA สูงในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณ LC-PUFA ที่พบในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ซึ่งโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิดนี้มีแนวโน้มปริมาณของกรดไขมัน LC-PUFA เช่นเดียวกับที่พบในสาหร่าย กล่าวคือพบกรดไขมัน LC-PUFA สูงในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. และพบกรดไขมัน LC-PUFA น้อยในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงดังรูปที่ 30C

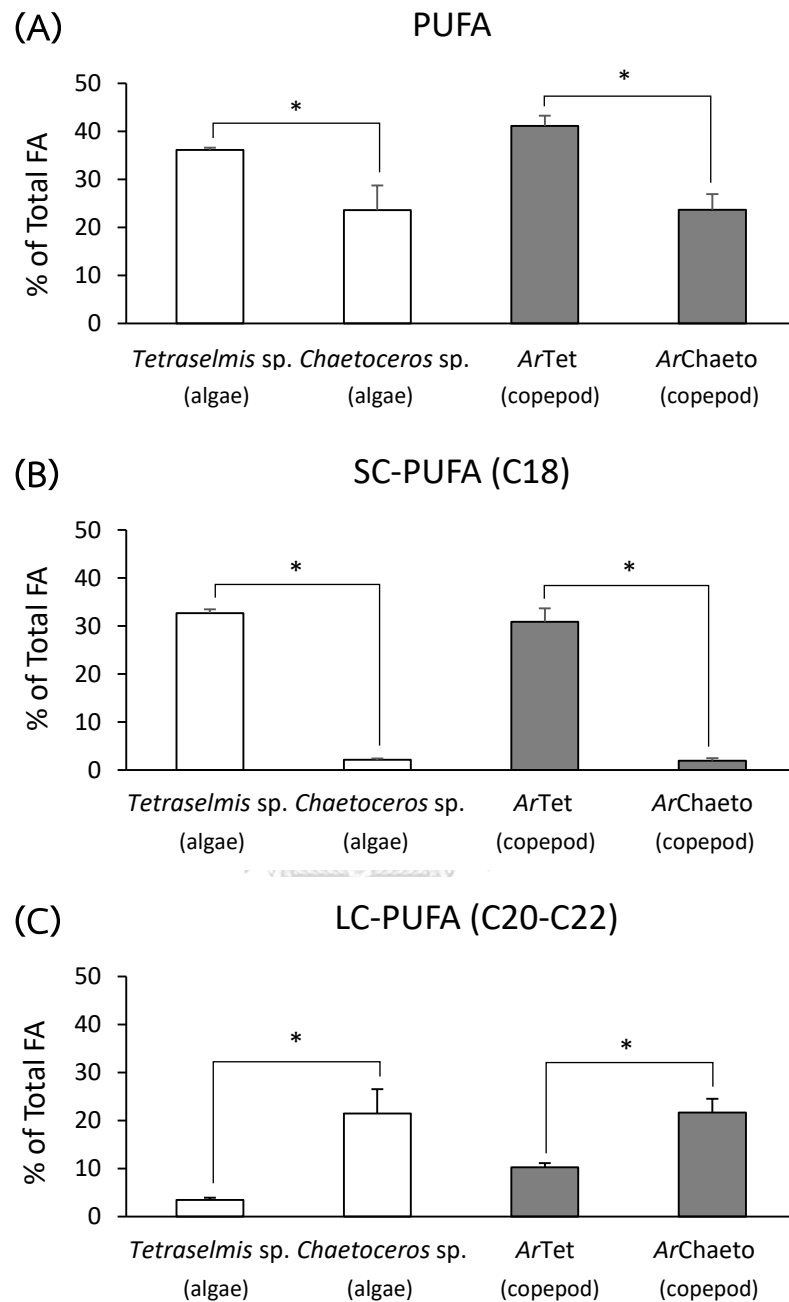
จากการศึกษากรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. และโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด พบว่ากรดไขมันโอเมกา-3 ที่พบในสาหร่ายทั้งสองชนิด (รูปที่ 31A) มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิดก็พบกรดไขมันโอเมกา-3 ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่เมื่อวิเคราะห์กรดไขมัน EPA และ DHA ซึ่งเป็นกรดไขมันโอเมกา-3 กลับพบกรดไขมัน EPA สูงในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. และโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. เมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (รูปที่ 31B) ในขณะที่พบกรดไขมัน DHA ปริมาณค่อนข้างน้อยในสาหร่าย *Chaetoceros* sp.



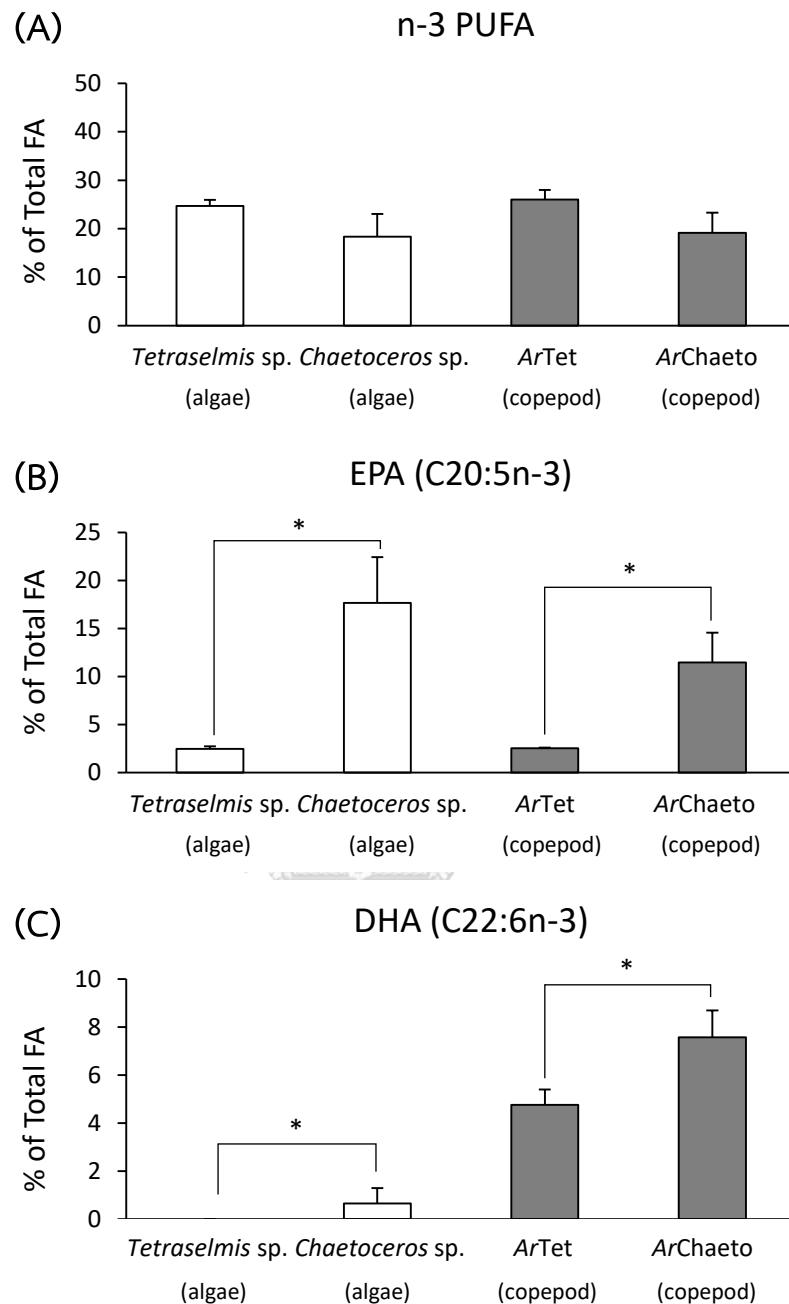
และไม่พบกรดไขมัน DHA ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. แต่กลับพบกรดไขมัน DHA ปริมาณสูงใน โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด โดยพบกรดไขมัน DHA ในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ปริมาณสูงกว่าที่พบในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงดังรูปที่ 31C

จากการศึกษากรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด แสดงดังรูปที่ 32A พบว่าสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มีปริมาณกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 สูงกว่าที่พบในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ตามลำดับ ในขณะที่พบกรดไขมัน ARA (รูปที่ 32B) ในสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ปริมาณสูงกว่าสาหร่าย *Tetraselmis* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับกรดไขมัน ARA ที่พบในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. มากกว่าที่พบในโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. แต่มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

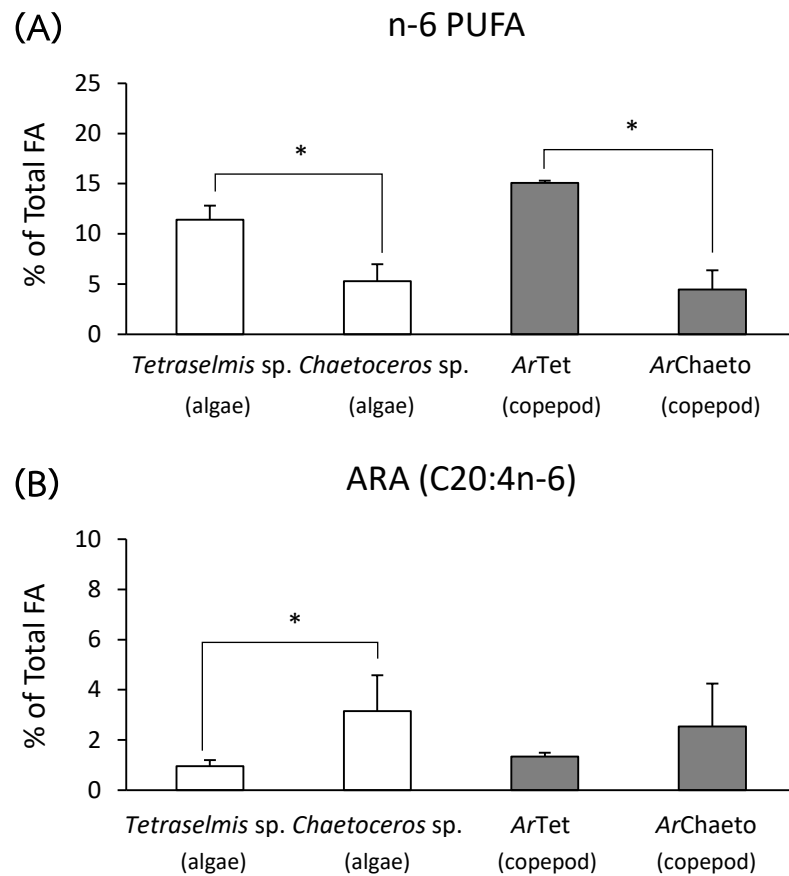
จากการศึกษาปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายสองชนิดที่มีกรดไขมันแตกต่างกัน ได้แก่ (1) สาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ (2) สาหร่าย *Chaetoceros* sp. และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด พบว่าโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่พบกรดไขมัน EPA ต่ำ (2.49%) และไม่พบกรดไขมัน DHA กลับพบ DHA สูงถึง 4.76% ในขณะที่โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่พบกรดไขมัน EPA สูง (17.69%) พบกรดไขมัน DHA สูงถึง 7.58% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณกรดไขมัน EPA ของสาหร่ายที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงโคพีพอดส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน DHA ในโคพีพอด ผ่านกลไกการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ในโคพีพอด *A. royi*-TH



รูปที่ 30 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่ม PUFA ของสาหร่าย *Tetraselmis sp.* และ *Chaetoceros sp.* และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) (B) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายสั้น (short-chain polyunsaturated fatty acid, SC-PUFA) และ (C) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสายยาว (long-chain polyunsaturated fatty acid, LC-PUFA) โดยเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 31 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-3 ของสาหร่าย *Tetraselmis sp.* และ *Chaetoceros sp.* และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองชนิด (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-3 (omega-3 polyunsaturated fatty acid, n-3 PUFA) (B) Eicosapentaenoic acid (EPA) และ (C) Docosahexaenoic acid (DHA) โดยเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 32 การเปรียบเทียบกรดไขมันกลุ่มโอเมกา-6 ของสาหร่าย *Tetraselmis sp.* และ *Chaetoceros sp.* และโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายทั้งสองพัฒนาการ (A) กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนกลุ่มโอเมกา-6 (omega-6 polyunsaturated fatty acid, n-6 PUFA) และ (B) Arachidonic acid (ARA) โดยเครื่องหมายดอกจัน (\*) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## 4.2 การศึกษาอินสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ของโคฟีพอด *A. royi*-TH

### 4.2.1 ลักษณะสมบัติของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ของโคฟีพอด *A. royi*-TH

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) ของโคฟีพอด *A. royi*-TH (Amparyup et al., unpublished data) พบว่ามี open reading frame (ORF) ขนาดเท่ากับ 1,302 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลเป็นรหัสโปรตีนที่มีขนาด 433 กรดอะมิโน (รูปที่ 33) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ArD6D ไปวิเคราะห์หาตำแหน่งอนุรักษ์ด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) พบว่าโปรตีน ArD6D ประกอบด้วยโดเมน 3 โดเมน ได้แก่ (1) cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain (Cyt-b5) ที่ปลายด้าน N (N-terminal) (2) transmembrane domain (TMD) จำนวน 5 โดเมน และ (3) fatty acid desaturase domain (FA\_desaturase) ที่ปลายด้าน C (C-terminal) แสดงดังรูปที่ 34

จากรายงานของ Li และ คณะฯ (2021) ได้ศึกษาการทำงานของโปรตีน cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain (Cyt-b5) พบว่า Cyt-b5 มีบทบาทสำคัญในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของเอนไซม์ desaturase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA และ fatty acid desaturase domain จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันกลุ่ม PUFA โดยจะเปลี่ยนพันธะเดี่ยวในสายโซ่ของกรดไขมันให้กลายเป็นพันธะคู่ (Nielsen et al., 2019)

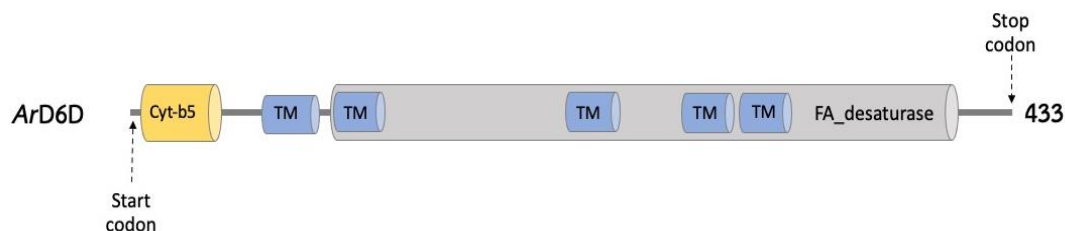
เมื่อทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน (sequence alignment) ของโปรตีน ArD6D ของโคฟีพอด *A. royi*-TH กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน desaturase ในโคฟีพอดสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTx พบว่าโปรตีน ArD6D มีความเหมือน (%identity) กับโปรตีน delta-6 fatty acid desaturase (NODE\_1\_length\_2498) ของโคฟีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไต้หวัน 99% (Nielsen et al., 2019), โปรตีน delta-5 desaturase 4 ของโคฟีพอด *Tigriopus japonicus* (AIW65593) 61% (Lee et al., 2020), โปรตีน delta-5/6a desaturase ของโคฟีพอด *Tigriopus kingsejongensis* 61% (Lee et al., 2020), โปรตีน front-end desaturase-2 ของโคฟีพอด *Tigriopus californicus* (QWC69495) 60% (Kabeya et al., 2021) และโปรตีน delta-5 desaturase ของโคฟีพอด *Paracyclopsina nana* (APH81338) 57% (Lee et al., 2017) แสดงดังตารางที่ 12 และรูปที่ 35

```

atg ccg agc cgc gtt cct gat gaa ttg att cga gta gaa gac aag ctt
M P S R V P D E L I R V E D K L
tat tct gct cag caa ctg gct aaa att cat ccc ggt gga cct tta ttc
Y S A Q Q L A K I H P G G P L F
gtc aag gca ttt gcc ggc cgt gat tca tct caa gca ttt ttg tcg tat
V K A F A G R D S S Q A F L S Y
cat cgc aaa cct ttt cct cac aat cga gcc aaa gaa gct ttt tat gct
H R K P F P H N R A K E A F Y A
gtc gat aaa tct gtc gac tac agc gaa aag gat aat caa gac ttc ctc
V D K S V D Y S E K D N Q D F L
gaa cta tgc gaa ctc att aat aag gtt tta cca aag ggg aag tcg ttt
E L C E L I N K V L P K G K S F
gct cct tgg cac tac ttt gtt aag atc gga atc tta acc ttg gtg aca
A P W H Y F V K I G I L T L V T
gtc att ttg gaa ttt cac atc cac tac act gca tct tac aaa tgg cat
V I L E F H I H Y T A S Y K W H
cta aca gct ttg ttg gga ttc cta ttt gct ctc atc ggt tta aac atc
L T A L L G F L F A L I G L N I
cag cat gac gca aat cac gga gca att tcc ttg aat ccg aac gtg aat
Q H D A N H G A I S L N P N V N
cga ttt ctt gga acc ttc cag aac tgg atc ggt ggc agt gcc att tca
R F L G T F Q N W I G G S A I S
tgg atc cat caa cat gtt gtc cag cat cac atc cac acg aac gat gtc
W I H Q H V V Q H H I H T N D V
agg ctc gat ccg gat att gct ctc gag ttt tac gtg aga ttg aat ccg
R L D P D I A L E F Y V R L N P
acg cat cct ctg ctc aag ttt caa cta ttc cag tac ttc tat ttt ttc
T H P L L K F Q L F Q Y F Y F F
atc ctt atc gcg ttt tac ggc gtc ctc aag gtt gtt cta tcc att gag
I L I A F Y G V L K V V L S I E
gat gtc ctt tct tgg aaa cat tac act ccg atg tcg cgt ctt ctt aaa
D V L S W K H Y T P M S R L L K
agc tac caa tcc ttt gaa gtc ttg ggc tca gca gtc ttc atg ctt aga
S Y Q S F E V L G S A V F M L R
tgg atc gcc ctt ccc att atc tac acg ccg gac gga agg tgg tgg atc
W I A L P I I Y T P D G R W W I
tcc tta gtg aac ata ctg cct atg gct atg gtg gcc ggc tat tac ctg
S L V N I L P M A M V A G Y Y L
tct ttc ttc ttc aca atc agc cac aac ttt aga ggt gtc cac atg cac
S F F F T I S H N F R G V H M H
gag gac act aga aga gaa acg aac caa aag aac tcc ttc ctc tac aat
E D T R R E T N Q K N S F L Y N
cag gtt gtt tct tcc tca aac gtc ggt ggt tcg ctt tgt ttt cta
Q V V S S S N V G G S W L C F L
aat gga ggt ctc aat tac cag atc gaa cat cat ctt ttt cct cgg ata
N G G L N Y Q I E H H L F P R I
aat cac aca cat tat ccg aca atc gca cca cac gtt aag aaa ttt tgc
N H T H Y P T I A P H V K K F C
gat gag cgc aag att ccc tac gtc cat ttc aca acc atc gac gca aac
D E R K I P Y V H F T T I D A N
ctt cgt gcg tgc atc aaa cac cta atg gac atg gga gaa agt gag atg
L R A C I K H L M D M G E S E M
ccg aat tcg gtt gtt atg gag aag gcg gca act aaa atg ccc att gtt
P N S V V M E K A A T K M P I V
tca taa
S -

```

รูปที่ 33 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *ArD6D* ของโคพีพอด *A. royi*-TH ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ExPasy กรดอะมิโนแสดงด้วยตัวย่อบรรทัดล่างของนิวคลีโอไทด์แต่ละโคดอน (codon) การแรเงาสีเทาเข้มแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain ตัวอักษรหนาแสดงถึง transmembrane domain การแรเงาสีเทาอ่อนแสดงถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ fatty acid desaturase domain ตำแหน่งของ forward gene primer แสดงด้วยการขีดเส้นใต้ และ reverse gene primer แสดงด้วยการขีดเส้นใต้สองเส้น



รูปที่ 34 โดเมนของโปรตีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH ความยาวของลำดับกรดอะมิโนแสดงด้วยตัวเลขด้านขวามือ ตำแหน่งของ cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain แสดงด้วยสี่เหลี่ยมสีเหลือง ตำแหน่งของ transmembrane domain แสดงด้วยสี่เหลี่ยมสีฟ้า ตำแหน่งของ fatty acid desaturase domain แสดงด้วยสี่เหลี่ยมสีเทา โดย Cyt-b5: cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain; TM: transmembrane domain; FA\_desaturase: fatty acid desaturase domain

จากรายงานของ Nielsen และคณะ (2019) ที่ศึกษาขึ้นที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ได้หวน ได้รายงานไว้ว่าโปรตีน delta-6 fatty acid desaturase (NODE\_1\_length\_2498) ของโคพีพอด *A. royi* มีกิจกรรมของ  $\Delta$ 6-desaturase ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดไขมัน tetracosapentaenoic acid (C24:5n-3, TPA) ไปเป็นกรดไขมัน tetracosahexaenoic acid (C24:6n-3, THA) ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา  $\beta$ -oxidation แล้วกลายเป็นกรดไขมัน DHA (C22:6n-3) ตามวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันของ Sprecher (2000) และจากการศึกษาการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ในโคพีพอด *T. californicus* พบว่าโปรตีน front-end desaturase-2 (QWC69495) มีกิจกรรมของ  $\Delta$ 4-desaturase ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนกรดไขมัน docosapentaenoic acid (C22:5n-3, DPA) ให้กลายเป็นกรดไขมัน DHA (Kabeya et al., 2021)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH และการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน พบว่ายีน ArD6D น่าจะเกี่ยวข้องกับวิธีการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA โดยมีกิจกรรมของ  $\Delta$ 6-desaturase ดังนั้นจึงศึกษาระดับการแสดงออกของยีน ArD6D ในโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ เพื่อให้เข้าใจการทำงานของยีน ArD6D เพิ่มมากขึ้น

ตารางที่ 12 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรตีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH กับโปรตีนในกลุ่ม desaturase ในโคพีพอดสายพันธุ์อื่นๆ\*

Similarity (%)	Identity (%)					
	ArD6DTH	ArD6DTW	TjD5D4	TkD5/6Da	TcFed2	PnD5D
<b>ArD6DTH</b> ( <i>Apocyclops royi</i> -TH)	-	99	61	61	60	57
<b>ArD6DTW</b> ( <i>Apocyclops royi</i> -TW) (NODE_1_length_2498)	100	-	61	61	60	57
<b>TjD5D4</b> ( <i>Tigriopus japonicus</i> ) (AIW65593)	76	76	-	83	92	66
<b>TkD5/6Da</b> ( <i>Tigriopus kingsejongensis</i> ) (Lee et al., 2020)	76	76	89	-	81	67
<b>TcFed2</b> ( <i>Tigriopus californicus</i> ) (QWC69495)	76	76	96	89	-	66
<b>PnD5D</b> ( <i>Paracyclopsina nana</i> ) (APH81338)	75	75	83	81	82	-

\*ArD6DTH: delta-6 fatty acid desaturase ของโคพีพอด *Apocyclops royi*-TH; ArD6DTW: delta-6 fatty acid desaturase ของโคพีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ใต้หวัน; TjD5D4: delta-5 desaturase 4 ของโคพีพอด *Tigriopus japonicus*; TkD5/6Da: delta-5/6a desaturase ของโคพีพอด *Tigriopus kingsejongensis*; TcFed2: front-end desaturase-2 ของโคพีพอด *Tigriopus californicus*; PnD5D: delta-5 desaturase ของโคพีพอด *Paracyclopsina nana*



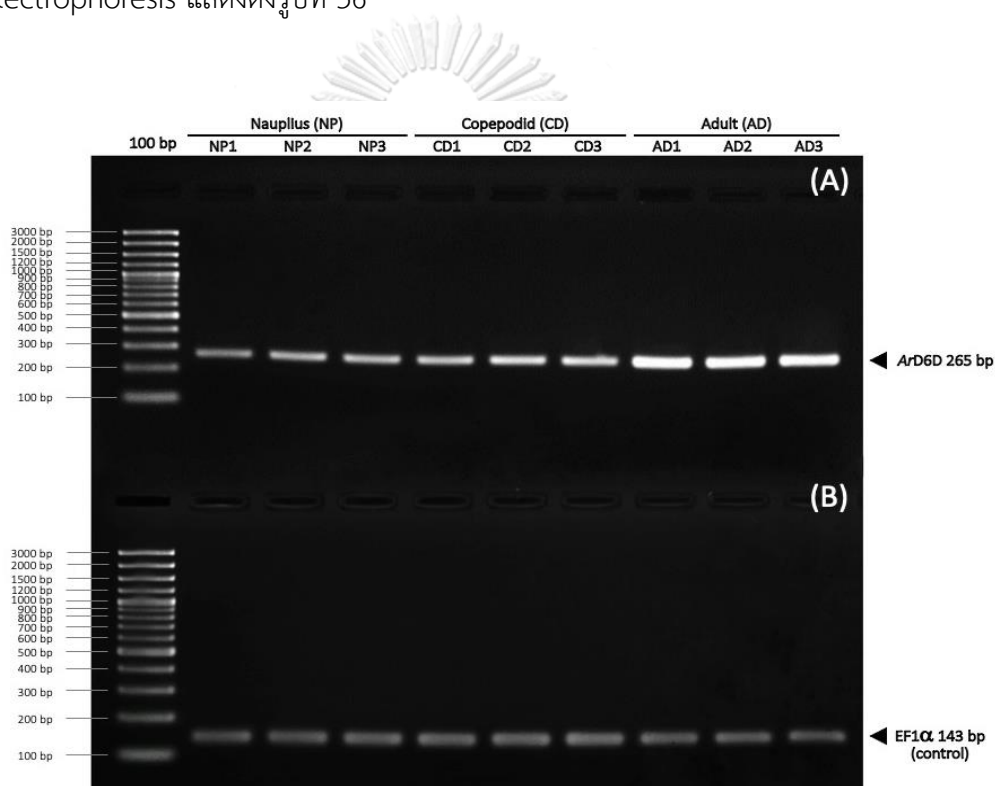
	Cyt-b5 domain			
ArD6DTH	-----MPSRVDELIRVEDKLYSAQQLAKIHGGPLFVKAFAGRDSQAFLSYHRKP	52		
ArD6DTW	-----MPSRVDELIRVEDKLYSAQQLAKIHGGPLFVKAFAGRDSQAFLSYHRKP	52		
PnD5D	-----MEPDHGVMDKKHIRVEGKIYSAEKLAELHGGPLFIQAFSGRDASQAFLSYHRRO	55		
TkD5/6Da	-----M-ASDLSPESIRVEDKIYSARLLAELHGGPLFVQAFAGRDASTAFILYHRRO	52		
TjD5D4	-----MAP-NSEIHPESIRVEDRIYSAKKLAEFHGGPLFIKAFSGRDASQAFLTYHRRO	54		
TcFed2	MPSREMAP-NSEIHPESIRVENKVYSAKKLADLHGGPLFIKAFSGRDASQAFLTYHRRO	59		
	Cyt-b5 domain	TMD		
ArD6DTH	FPHNRAKEAFYAVDKSVDYSEKDNQDFLELCELINKVLPKGSFAPWHYFVKIGILTTLVT	112		
ArD6DTW	FPHNRAKEAFYAVDKSVDYSEKDNQDFLELCELINKVLPKGSFAPWHYFVKIGILTTLVT	112		
PnD5D	FPHKRAEPAYISDDTTVSHDPQDHADFLCQRVDKVLPRMKSFAPWHYYIKVAFILGSA	115		
TkD5/6Da	FPHQRAAPAFQSKDESVOYSPDDHADFIELCERVVKVLPKGSFAPWHYFVKVGVILGAA	112		
TjD5D4	FPHQRAQEAFAFERVDQTVTYSTDDHADFIELCERIEKVLPRNKSFAPWHYYVKVAFIMGTV	114		
TcFed2	FPHQRVKEAFESTDETVTYSTDHADFIDLCEKIEKILPRSKSFAPWHYYVKVAFIMGSV	119		
	TMD	TMD	FAD domain	
ArD6DTH	VILEFHIHYTASYKWHLTALLGFLFALIGLNIQHDANHGAI SLNPNVNRFLGTFQNWIGG	172		
ArD6DTW	VILEFYIHYTASYKWHLTALLGFLFALIGLNIQHDANHGAI SLNPNVNRFLGTFQNWIGG	172		
PnD5D	FGLBLYMHINRAYSVYLSALVGLFYALIGLNIQHDANHGAI SRNPWNRLIGMSQNWIGG	175		
TkD5/6Da	FTLEAYMHLTQSYRWFLFAIMGLLYALIGLNIQHDANHGAI SRNPWNRLVLTGSQNWIGG	172		
TjD5D4	FCLBAYMHMTKSYNQLFAVMGWFYALIGLNIQHDANHGAI SRNPVINRVLGASQNWIGG	174		
TcFed2	FSLBAYMHYTKSYNQLFAVMGWFYALIGLNIQHDANHGAI SRNPVINRVLGASQNWIGG	179		
	FAD domain	TMD		
ArD6DTH	SATSWIHQHVQHHIHTNDVRLDPDIALEFYVRLNPTHPLLKFQLFQYFYFFILIAFYGV	232		
ArD6DTW	SATSWIHQHVQHHIHTNDVRLDPDIALEFYVRLNPTHPLLKFQLFQYFYFFILIAFYGV	232		
PnD5D	SSISWIHQHVQHHIHTNLERDPIAGNAYIRLNPQKLMRFHIVQHVYFFFLMAYYGF	235		
TkD5/6Da	SATAWIHQHVQHHIHTNDIHLDPDISGTYIRLNELKPLKLYHVVQHIYFFFLALYGF	232		
TjD5D4	SATAWIHQHVQHHIHTNDVHLDPDISGSMYIRLNELKPLKLYHVVQHIYFFFLALYGF	234		
TcFed2	SATAWIHQHVQHHIHTNDVHLDPDIAGSIYIRLNELKPLKLYHVVQHIYFFFLALYGF	239		
	TMD	FAD domain	TMD	TMD
ArD6DTH	LKVLSIEDVLSWKHYTPMSRLLKSYQSFEVLGSAVFMRLRWIALPIIYTPDGRWWISLVN	292		
ArD6DTW	LKVLSIEDVLSWKHYTPMSRLLKSYQSFEVLGSAVFMRLRWIALPIIYTPDGRWWISLVN	292		
PnD5D	SVVIQTVDNILKGGHHTMSVLLGPHRAFEAVTSALFILRWMVLPVYLIG---SMTLLH	292		
TkD5/6Da	SIVIQSLENNVSGSHHTPMSPLPKPHRVFTFTWVLFITRWVVLPAVQTG---SLSVLLQ	289		
TjD5D4	SVVQVQSLNENNVSGAHTPMSPLPKPHRVFTFMWVSLFFLRWVITPVYQTG---TFLTLLN	291		
TcFed2	SIVIQSLENNVSGAHTPMSPLPKPHRVFTFMWVSLFFLRWVITPVYQTG---TFLTLLH	296		
	TMD	FAD domain		
ArD6DTH	ILPMAMVAGYYLSFFFTISHNFRGVHMHEDTRRETNQKNSFLYNQVVSNNVGGSWLCFL	352		
ArD6DTW	ILPMAMVAGYYLSFFFTISHNFRGVHMHEDTRRETNQKNSFLYNQVVSNNVGGSWLCFL	352		
PnD5D	TVPMYIVAGYYLAFFFTISHNFRGVHMHEDTRRGFNKSKSFLYNQVVTSSNVGGAFLCML	352		
TkD5/6Da	TLPLYMVAGYYLAFFFSISHNFRGVHMHEDTRTPSNKDSFLYKQVVSNNVGGSLCFM	349		
TjD5D4	TLPMYVAGYYLAFFFSISHNFRGVHMHEDTRTPSNKESFLYKQVVSNNVGGSLCFM	351		
TcFed2	SLPMYVAGYYLAFFFSISHNFRGVHMHEDTRTPSNKESFLYKQVVSNNVGGSLCFM	356		
	FAD domain			
ArD6DTH	NGGLNYQIEHHLFPRINHTHYPTIAPHVKKFCDEKIPYVHFTTIDANLRACIKHLMDMG	412		
ArD6DTW	NGGLNYQIEHHLFPRINHTHYPTIAPHVKKFCDEKIPYVHFTTIDANLRACIKHLMDMG	412		
PnD5D	NGGLNYQIEHHLFPRIQHSHYPKIAPVIRAFCEKGIPIYVHFDSENEMASCVKHILDLG	412		
TkD5/6Da	NGGLNYQIEHHLFPRISHYYPKIAPTVEFCKEKNIPYVHFTPLGENIRSCQHLWDMG	409		
TjD5D4	NGGLNYQIEHHLFPRINHTHYPKIAPTVMKAFCKEKKIPYVHFTPTIGENIRSCQHLWDMG	411		
TcFed2	NGGLNYQIEHHLFPRISHYYPKIAPTVMKAFCKEKNIPYVHFTPTIGENIRSCQHLWDMG	416		
ArD6DTH	ESEMENSVMKAATKMPIVS	433		
ArD6DTW	ESEMENSVMKAATKMPIVS	433		
PnD5D	NNVNPVHITMISAAN-----	427		
TkD5/6Da	SHETPKNATIQAAKTMLAH--	428		
TjD5D4	SHETPKNATIQAAKTMLAH--	430		
TcFed2	SNETPKNATIQAAKTLLVN--	435		

รูปที่ 35 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนเพื่อเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างโปรตีน ArD6D ของโคฟีพอด *A. royi*-TH (ArD6D-TH) กับโปรตีน desaturase อื่นๆ กรดอะมิโนที่เหมือนกันในทุกโปรตีนแสดงด้วยการแรเงาสีเทาเข้ม กรดอะมิโนที่เหมือนกันในโปรตีนตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปแสดงด้วยการแรเงาสีเทาอ่อน การแรเงาสีฟ้าแสดงตำแหน่งกรดอะมิโนที่แตกต่างกันของ ArD6D-TH และ ArD6D-TW โดย ArD6DTH: delta-6 fatty acid desaturase ของโคฟีพอด *Apocyclops royi*-TH; ArD6DTW: delta-6 fatty acid desaturase ของโคฟีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ใต้หวัน; PnD5D: delta-5 desaturase ของโคฟีพอด *Paracyclops nana*; TkD5/6Da: delta-5/6a desaturase ของโคฟีพอด *Tigriopus kingsejongensis*; TjD5D4: delta-5 desaturase 4 ของ

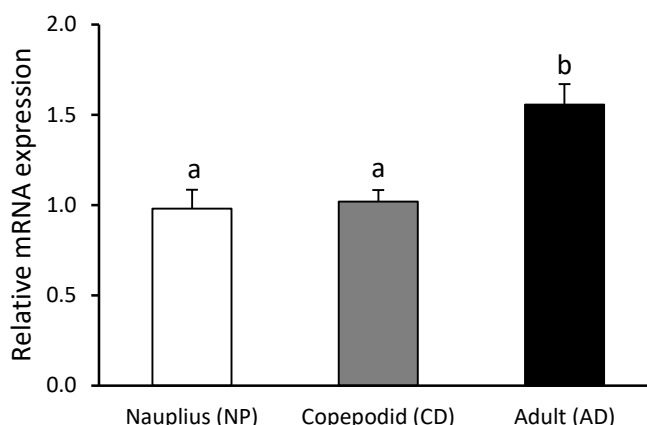
โคพีพอด *Tigriopus japonicus*; TcFed2: front-end desaturase-2 ของโคพีพอด *Tigriopus californicus*

#### 4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ

เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน ArD6D เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน elongation factor 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) เป็นยีนควบคุม จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีน ArD6D ด้วยวิธี Gel electrophoresis แสดงดังรูปที่ 36



รูปที่ 36 การแสดงออกของยีน ArD6D ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ (A) การแสดงออกของยีน ArD6D และ (B) การแสดงออกของยีน EF1 $\alpha$  ซึ่งเป็นยีนควบคุม ซึ่งตรวจสอบด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดย M: 100 bp DNA marker; NP: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะนาอเพลียส; CD: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะโคพีโพดิท; AD: โคพีพอด *A. royi*-TH ระยะตัวเต็มวัย



รูปที่ 37 ระดับการแสดงออกของยีน *ArD6D* ของโคพีพอด *A. royi*-TH ในแต่ละระยะพัฒนาการ โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

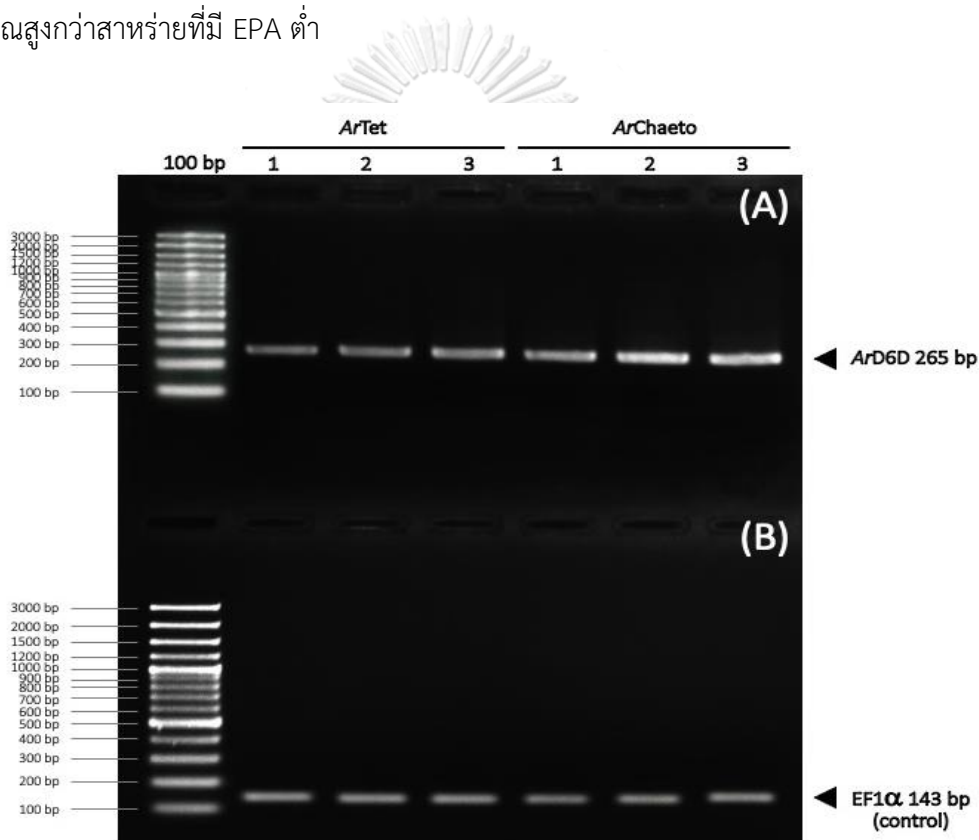
ผลการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *ArD6D* ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 พบว่ายีน *ArD6D* มีการแสดงออกที่สูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะ AD ของโคพีพอด *A. royi*-TH เมื่อเทียบกับระยะ NP และระยะ CD แสดงดังรูปที่ 37 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์กรดไขมันพบว่าการแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคพีพอด *A. royi*-TH ระยะ AD มีระดับแสดงออกสูงที่สุด และแสดงออกน้อยในโคพีพอด *A. royi*-TH ระยะ CD และ NP ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของกรดไขมัน DHA ที่มีค่าเท่ากับ 4.85%, 3.54% และ 2.78% ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน *ArD6D* ในการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ของโคพีพอด *A. royi*-TH แต่ละระยะพัฒนาการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

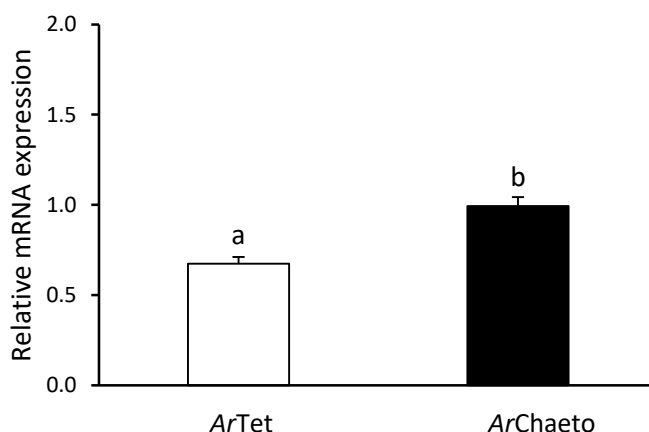
#### 4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน *ArD6D* ของโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp.

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *ArD6D* ของโคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสองชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันที่ต่างกัน ได้แก่ (1) สาหร่าย *Tetraselmis* sp. สาหร่ายสีเขียวที่พบกรดไขมัน EPA ต่ำ และไม่พบกรดไขมัน DHA และ (2) สาหร่าย *Chaetoceros* sp. สาหร่ายสีเหลืองอมน้ำตาล ที่พบกรดไขมัน EPA สูง ด้วยวิธี Gel electrophoresis (รูปที่ 38) พบว่าระดับการแสดงออกของยีนที่วิเคราะห์ได้จากโปรแกรม Gel Pro 3.1 โคพีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. มีระดับการแสดงออกที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ

เปรียบเทียบกับโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ( $p < 0.05$ ) แสดงดังรูปที่ 38 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษากรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายสองชนิดนี้ โดยโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. พบกรดไขมัน DHA สูงถึง 7.58% ในขณะที่โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. พบกรดไขมัน DHA 4.76% จากที่ไม่พบกรดไขมันชนิดนี้ในสาหร่าย *Tetraselmis* sp. แสดงให้เห็นว่าคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกันของสาหร่ายส่งผลต่อปริมาณและองค์ประกอบของกรดไขมันในโคฟีพอด *A. royi*-TH โดยคาดว่าสาหร่ายที่มี EPA สูงจะทำให้โคฟีพอด *A. royi*-TH สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ปริมาณสูงกว่าสาหร่ายที่มี EPA ต่ำ



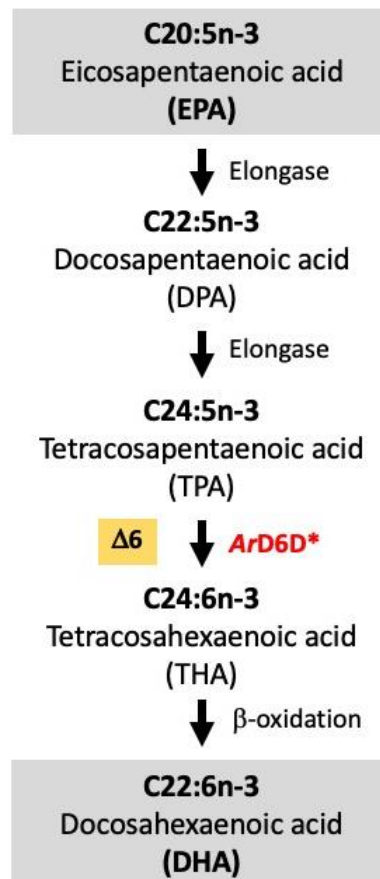
รูปที่ 38 การแสดงออกของยีน *ArD6D* ของโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. (A) การแสดงออกของยีน *ArD6D* และ (B) การแสดงออกของยีน *EF1α* ซึ่งเป็นยีนควบคุม ซึ่งตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดย M: 100 bp DNA marker; ArTet: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp.; ArChaeto: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp.



รูปที่ 39 ระดับการแสดงออกของยีน ArD6D ของโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดย ArTet: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp.; ArChaeto: โคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp.

ระดับการแสดงออกของยีน delta-6 desaturase (ArD6D) มีการแสดงออกที่สูงในระยะ AD ของโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. (ที่ไม่พบกรดไขมัน DHA) ระดับการแสดงออกของยีน ArD6D ที่เพิ่มขึ้นนี้สอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกรดไขมัน DHA และเมื่อทำการเปรียบเทียบสาหร่ายสองชนิดที่มีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันที่แตกต่าง ได้แก่ สาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่พบกรดไขมัน EPA ต่ำ และไม่พบกรดไขมัน DHA และสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ที่พบกรดไขมัน EPA สูง พบว่าการแสดงออกของยีน ArD6D มีการแสดงออกที่สูงในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แสดงดังรูปที่ 39 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน DHA ที่เพิ่มสูงขึ้นในโคฟีพอด *A. royi*-TH ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ทำให้ทราบว่า การแสดงออกของยีน ArD6D ตอบสนองต่อคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันในสาหร่ายที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนหลายสายพันธุ์ รวมถึงปู *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2013), *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), *Portunus trituberculatus* (Wang et al., 2014) กุ้งลือบสเตอร์ *Sagmariasus verreauxi* (Shu-Chien et al., 2017) และกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017) ที่พบว่ายีน delta-6 desaturase เป็นยีนที่ตอบสนองต่อคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันของอาหาร และสามารถสันนิษฐานได้ว่ายีน ArD6D มีกิจกรรมของ  $\Delta 6$ -desaturase ซึ่งทำหน้าที่ในการเติมพันธะคู่ให้กับ

กรดไขมัน TPA ให้กลายเป็น THA ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาต่อได้เป็นกรดไขมัน DHA ในวิธีการสังเคราะห์กรดไขมันของโคพีพอด *A. royi*-TH แสดงดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 วิธีการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ของโคพีพอด *A. royi*-TH

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมันของโคฟีพอด *Apocyclops royi* สายพันธุ์ไทย (*A. royi*-TH) และศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน โอเมกา-3 ในโคฟีพอด จากผลการทดลองพบว่าโคฟีพอด *A. royi*-TH เป็นแหล่งของกรดไขมันจำเป็น ทั้ง PUFA, EPA และ DHA โดยพบกรดไขมันดังกล่าวปริมาณสูงกว่าที่พบในอาหารมีชีวิตชนิดอื่นๆ ได้แก่ อาร์ทีเมีย (*A. salina*) และไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) นอกจากนี้โคฟีพอดทั้ง 3 ระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะนอเพเลียส (NP), ระยะโคฟีโพดิติ (CD) และระยะตัวเต็มวัย (AD) พบกรดไขมัน DHA ปริมาณที่สูง โดยพบน้อยสุดในโคฟีพอดระยะ NP และมากที่สุดในระยะ AD ตามลำดับ ซึ่งโคฟีพอดทุกระยะพัฒนาการมีศักยภาพในการนำไปใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน และพบว่าโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Chaetoceros* sp. (EPA สูง) มีปริมาณกรดไขมัน DHA ที่สูงกว่าโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายน้ำเค็ม *Tetraselmis* sp. (EPA ต่ำ) ทำให้ทราบว่าองค์ประกอบของกรดไขมันในสาหร่ายที่แตกต่างกันส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน DHA ในโคฟีพอด จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *ArD6D* ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันโอเมกา-3 ในโคฟีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ พบว่ายีน *ArD6D* มีระดับการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นในระยะ AD ซึ่งสอดคล้องกับกรดไขมัน DHA ที่เพิ่มสูงขึ้นในโคฟีพอดระยะ AD แสดงให้เห็นว่ายีน *ArD6D* อาจทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ของโคฟีพอด และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *ArD6D* ในโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และ *Chaetoceros* sp. พบว่าระดับการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. สอดคล้องกับปริมาณกรดไขมัน DHA ที่พบมากในโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Chaetoceros* sp. ทำให้ทราบว่ายีน *ArD6D* เป็นยีนที่ตอบสนองต่อองค์ประกอบของกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยปริมาณกรดไขมัน EPA ส่งผลต่อปริมาณกรดไขมัน DHA ที่พบในโคฟีพอด ซึ่งข้อมูลในเชิงลึกที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโคฟีพอดเชิงพาณิชย์ของไทยในอนาคต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาระดับห้องปฏิบัติการ ภายใต้สภาวะควบคุมต่างๆ หากต้องการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ระบบการเลี้ยง และสภาวะในการเลี้ยงโคฟีพอด และสาหร่าย เพื่อให้สามารถเลี้ยงโคฟีพอดและสาหร่ายปริมาณมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ และต้นทุนต่ำ





บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ภาษาไทย

กรมประมง. 2561. การเพาะเลี้ยงไรแดง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://www.fisheries.go.th/sf-chiangrai/cultivate/rai.htm>. [22 พฤษภาคม 2565]

ปวีณา ตปนีย์วรวงค์, อภิญญา อยู่สบาย, พรารณา ปานทอง, ปาริชาติ ชุมทอง, จันทรจักรัส วัฒนะโชติ และ มะลิวัลย์ คุดะโค. 2563. องค์ประกอบกรดไขมันของไซโคลพอยด์โคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายชนิดแตกต่างกัน. *วารสารแก่นเกษตร*, 48(1) : 101-108.

มนทกานติ ท้ามดิน, อาคม สิงหนุญ, ชัชวาลี ชัยศรี และ ไพบุลย์ บุญลิปตานนท์. 2557. ผลของการเสริม *Mortierella alpina* เพื่อเป็นแหล่งกรดไขมัน อะแรซีโดนิก (20:4n-6) ในไรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ต่อองค์ประกอบ กรดไขมัน การเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และพยาธิสภาพของ ปลากระรังเสื่อ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775) วัยอ่อน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2557. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง. 28 หน้า.

วัชรีย์ อรรถทิพพหลคุณ และ มนต์รี อรรถทิพพหลคุณ. 2536. เทคโนโลยีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยมหิดล.

วีระพงษ์ ลุฑิตานนท์. 2557. เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์. กรุงเทพมหานคร : ดีทีริโอ.

ศุภย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งตรัง. 2556. แปลงกักต่อน. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [https://www.fisheries.go.th/cstrang/index.php?option=com\\_content&view=frontpage&Itemid=49&limitstart=5](https://www.fisheries.go.th/cstrang/index.php?option=com_content&view=frontpage&Itemid=49&limitstart=5) [22 พฤษภาคม 2565]

สุมาลี ตั้งประดับกุล. 2553. ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร : แมคกรอ-ฮิล.

สุภาพร ตั้งสิทธิวัฒน์, เกรียงศักดิ์ เผด็จภัย, อภิชาติ เต็มวิซชากร, ปริญญา สุทธินนท์ และ สุริยะ แผงดี. 2561. การเพาะพันธุ์และอนุบาลปลาเก๋าปะการัง *Epinephelus corallicola* (Valenciennes, 1828). ตราด : สถานีวิจัยและพัฒนาประมงทะเลจังหวัดตราด กองวิจัยและพัฒนาประมงทะเล กรมประมง.

## ภาษาอังกฤษ

Ackman, R.G., and Ratnayake, W.M.N. 1990. Fatty Acid Composition of Three Cultured Algal Species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) Used as Food for Bivalve Larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 21(2) : 122-130.

Algae Research and Supply. 2018. Copepod: Life cycle. [Online]. Available from: <https://algaeresearchsupply.com/pages/copepods-life-cycle> [2022, May 15]

Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C., and Powtongsook, S., 2022. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*. *Aquaculture Reports*, 23, 101064.

Arora, M., Anil, A.C., Leliaert, F., Delany, J., and Mesbahi, E. 2013. *Tetraselmis indica* (Chloprodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. *European Journal of Phycology*, 48 : 61-78.

Aqua Scaping Lab. 2017. Artemia nauplii: breeding and administration of brine shrimp. [Online]. Available from: <http://www.aquascapinglab.com/en/2017/06/22/artemia-salina-allevamento-e-somministrazione-dei-naupli/> [2022, May 19]

**Balian, E.V., Segers, H., Lévêque, C., and Martens, K. 2008. The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia*, 595(1) : 627-637.**

Barroso, M.V., de Carvalho, C.V.A., Antoniassi, R., and Cerqueira, V.R. 2013. Use of the copepod *Acartia tonsa* as the first live food for larvae of the fat snook *Centropomus parallelus*. *Aquaculture*, 388-391 : 153-158.

- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernández-Cruz, C.M., González, M.M., and Fernández-Palacios, H. 1999. Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Aquaculture*, 179 : 265-275.
- Boonlorm, R. 2021. Gas Chromatography-Mass Spectrometry; GC-MS. [Online]. Available from: <https://www.scispec.co.th/learning/index.php/blog/chromatography/gas-chromatography-mass-spec-trometry-gc-ms> [2022, May 30]
- Borowitzka, M.A. 2018. Chapter 3 - Biology of Microalgae. In Microalgae in Health and Disease Prevention, pp. 23-72. Academic Press.
- Boyen, J., Fink, P., Mensens, C., Hablützel, P.I., and De Troch, M. 2020. Fatty acid bioconversion in harpacticoid copepods in a changing environment: a transcriptomic approach. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Science*, 375 : 20190645.
- Bryant, P.J. 2015. Centric Diatom *Chaetoceros* sp. [Online]. Available from: <https://na-thistoc.bio.uci.edu/Diatoms/Chaetoceros/index.htm> [2022, May 15]
- Busch, K.E.T., Peruzzi, S., Tønning, F., and Falk-Petersen, I.B. 2011. Effect of prey type and size on the growth, survival and pigmentation of cod (*Gadus morhua*, L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 17 : e595–e603.
- Cabrera, R.M.A., Reyes, W.A.G., Ramos, L.F., Huamán, G.A.Y., Soto, A.R., and Velásquez, A.F.N. 2021. Effect of time in culture on fatty acid composition of copepods *Tisbe* sp. and *Apocyclops* sp.. *Journal of the World Aquaculture Society*, 53 : 475-484.

- Campbell, L., Gaonkar, C.C., and Henrichs, D.W. 2022. Integrating imaging and molecular approaches to assess phytoplankton diversity. In Advances in Phytoplankton Ecology, pp. 159-190. Elsevier Inc.
- Center for Freshwater Biology. 2011. Moina macrocopa. [Online]. Available from: [http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FMoinidae/GMoina/Moina\\_macrocopa/moinamacrocopa.html](http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCladocera/FMoinidae/GMoina/Moina_macrocopa/moinamacrocopa.html) [2022, May 15]
- Chakarborty, R.D., Chakarborty, K., and Radhakrishnan, E.V. 2007. Variation in fatty acid composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker's yeast for use in larviculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10) : 4043-4051.
- Chauhan, A., Goyal, M.K., and Chauhan, P. 2014. Review Article Open Access GC-MS Technique and its Analytical Applications in Science and Technology. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 5(6).
- Chemistry Glossary. 2018. Fatty acid. [Online]. Available from: <https://glossary.periodni.com/glossary.php?en=fatty+acid> [2022, May 30]
- Chen, K., Li, E., Li, T., Xu, C., Xu, Z., Qin, J.G., and Chen, L., 2017. The expression of the  $\Delta 6$  fatty acyl desaturase-like gene from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under different salinities and dietary lipid compositions. *Journal of shellfish research*, 36 : 501–509.**
- Criel, G.R.J., and Macrae, T.H. 2002a. Reproductive Biology of *Artemia*. In Artemia: Basic and Applied Biology, pp. 39-128.
- Criel, G.R.J., and Macrae, T.H. 2002b. *Artemia* Morphology and Structure. In Artemia: Basic and Applied Biology, pp. 1-37.

- Conceição, L.E.C., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., and Dinis, M.T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture Research*, 41(5) : 613–640.
- Conway, D.V.P. 2012. Identification of the copepodite developmental stages of twenty-six North Atlantic copepods (revised edition). Plymouth, United Kingdom : Marine Biological Association of the United Kingdom Occasional Publications.
- Courtesy University of Uta, Genetic Science Learning Center. 2018. The brine shrimp of great salt lake. [Online]. Available from: <https://wildaboututah.org/the-brine-shrimp-of-great-salt-lake/> [2022, May 28]
- Das, P., Mandal, S.C., Bhagabati, S.K., Akhtar, M.S., and Singh, S.K. 2012. Important live food organisms and their role in aquaculture. *Frontiers in Aquaculture*, : 69-86.
- Desvillettes, C., Bourdier, G., and Breton, J.C. 1997. On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosahexaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on microalgae. *Journal of Plankton Research*, 19 : 273–278.**
- Dhanker, R., and Hwang, J.S. 2013. Predation by *Apocyclops royi* (Cyclopoid: Copepod) on ciliates and rotifers. *Journal of Marine Science and Technology (Taiwan)*, 21 : 246–251.
- Dhont, J., Dierckens, K., Støttrup, J., Van Stappen, G., Wille, M., and Sorgeloos, P. 2013. Rotifers, *Artemia* and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In Advances in Aquaculture Hatchery Technology, pp. 157–202.
- Drillet, G., Frouël, S., Sichlau, M.H., Jepsen, P.M., Højgaard, J.K., Joarder, A.K., and Hansen, B.W., 2011. Status and recommendations on marine copepod cultivation for use as live feed. *Aquaculture*, 315(3-4) : 155–166.

El-khodary, G.M., Mona, M.M., El-sayed, H.S., and Ghoneim, A.Z. 2020. Phylogenetic identification and assessment of the nutritional value of different diets for a copepod species isolated from Eastern Harbor coastal region. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46 : 173–180.

Farhadian, O., Yuso, F.M., and Mohamed, S. 2009. Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrathele*. *Aquaculture Research*, 40 : 74–82.

Frank, M. 2021. Simple PCR tips that can make or break your success. [Online]. Available from: <https://www.integrabiosciences.com/china/en/blog/article/simple-pcr-tips-can-make-or-break-your-success> [2022, May 28]

Forro Korovchinsky, N.M., Kotov, A.A., and Petrusek, A. 2008. Global diversity of cladoceran (Cladocera; crustacean) in freshwater animal diversity assessment. *Hydrobiologia*, 595 : 177–184.

Garrido, D., Kabeya, N., Hontoria, F., Navarro, J.C., Reis, D.B., Martín, M.V., Rodríguez, C., Almansa, E., and Monroig, O. 2019. Methyl-end desaturases with  $\Delta^{12}$  and  $\omega^3$  regioselectivities enable the de novo PUFA biosynthesis in the cephalopod *Octopus vulgaris*. *BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864 : 1134-1144.

Glencross, B.D. 2009. Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Reviews in Aquaculture*, 1 : 71–124.

Gréve., H.V.S. 2019. Is This Tiny Copepod the Key to Sustainably Producing Omega-3s?. [Online]. Available from: <https://hakaimagazine.com/news/is-this-tiny-copepod-the-key-to-sustainably-producing-omega-3s/> [2022, May 15]

- Guillard, R.R.L. 1973. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W. L., Charley, M. M. (Eds.), Culture of Marine Invertebrate Animals, pp. 29-60. New York : Plenum Press.
- Hall, H. 2021. What is Gas Chromatography. [Online]. Available from: <https://www.worldonline.com/what-is-gas-chromatography/> [2022, May 30]
- Hasle, G.R., and Syvertsen, E.E. 1997. Marine diatoms. In Tomas, C.R. (ed.), Identifying Marine Phytoplankton, pp. 5-385. San Diego, USA : Academic Press, Inc.
- Hickman, C.P., Keen, S.L., Eisenhour, D.J., Larson, A., and Anson, H.I. 2017. Integrated principles of zoology. Europe : Mcgraw-hill Education.
- Jacobsen, S., Nielsen, K.K., Kristiansen, R., Grønkjær, P., Gaard, E., and Steingrund, P. 2020. Diet and prey preferences of larval and pelagic juvenile Faroe Plateau cod (*Gadus morhua*). *Marine Biology*, 167 : 122.
- Jia, J., Liu, X., Li, L., Lei, C., Dong, Y., Wu, G., and Hu, G. 2018. Transcriptional and Translational Relationship in Environmental Stress: RNAseq and ITRAQ Proteomic Analysis Between Sexually Reproducing and Parthenogenetic Females in *Moina micrura*. *Frontiers in Physiology*, 9 : 812.
- Jin, M., Monroig, O ´., Lu, Y., Yuan, Y., Li, Y., Ding, L., Tocher, D.R. and Zhou, Q. 2017. Dietary DHA/EPA ratio affected tissue fatty acid profiles, antioxidant capacity, hematological characteristics and expression of lipid-related genes but not growth in juvenile black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*). *PLoS ONE*, 12(4) : e0176216.
- Jeennor, S., Cheawchanlertfa, P., Suttiwattanakul, S., Panchanawaporn, S., Chutrakul, C., and Laoteng, K. 2015. The codon-optimized  $\Delta^6$ -desaturase gene of *Pythium* sp. as an empowering tool for engineering n3/n6 polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *BMC Biotechnology*, 15 : 82.



- John, C.J.A., Abatzopoulos, T.J., and Marian, P.M. 2004 Characterization of a new parthenogenetic *Artemia* population from Thamaraikulam, India. *Journal of Biological Research*, 2 : 63-74.
- Johnson, W.S., Allen, D.M., and Fylling, M. 2012. Zooplankton of the Atlantic and Gulf Coasts: A Guide to Their Identification and Ecology (2nd ed.). Johns Hopkins University Press.
- Jørgensen, K. N. and Kjaer, K.G.W. 2018. The mass cultivation potential of the cyclopoid copepod *Apocyclops royi*. Master's Thesis, Department of Science and Environment, Faculty of Science, Roskilde University.**
- Kabeya, N., Fonseca, M.M., Ferrier, D.E.K., Navarro, J.C., Bay, L.K., Francis, D.S., Tocher, D.R., Castro, L.F.C., and Monroig, O´. 2018. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Science advances*, 4 : eaar6849.
- Kabeya, N., Ogino, M., Ushio, H., Haga, Y., Satoh, S., Navarro, J.C., and Monroig, O´. 2021. A complete enzymatic capacity for biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n-3) exists in the marine Harpacticoida copepod *Tigriopus californicus*. *Open Biology*, 11 : 200402.
- Kashiwagi, S. and Huang, P.L. 2012. Dietary Supplements and Cardiovascular Disease: What is the Evidence and What Should We Recommend?. In Cardiovascular Risk Factors, pp 449-464.
- Kusch, P. 2017. Application of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS) in failure analysis in the automotive industry. *Engineering failure analysis*, 82 : 726-732.

- Lavens, P., and Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Viale delle Terme di Caracalla, Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Lee, K.W., Park, H.G., Lee, S.M. and Kang, H.K. 2006. Effects of diets on growth of brackish water cyclopoid copepod *Paracyclops nana* Smirnov. *Aquaculture*, 256 : 346-353.
- Lee, M.C., Choi, B.S., Kim, M.S., Yoon, D.S., Park, J.C., Kim, S., and Lee, J.S. 2020. An improved genome assembly and annotation of the Antarctic copepod *Tigriopus kingsejongensis* and comparison of fatty acid metabolism between *T. kingsejongensis* and the temperate copepod *T. japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 100703.
- Lee, S.W., Lee, M.C., Puthumana, J., Park, J.C., Kang, S., Han, J., Shin, K.H., Park, H.G., Om, A.S., and Lee, J.S. 2017. Effects of temperature on growth and fatty acid synthesis in the cyclopoid copepod *Paracyclops nana*. *Fisheries Science*, 83 : 725-734.
- Lepage, G., and Roy, C.C. 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-120.
- Li, W., Li, P., Zhou, X., Situ, J., Lin, Y., Qiu, J., Yuan, Y., Xi, P., Jiang, Z., and Kong, G. 2021. A Cytochrome B<sub>5</sub>-Like Heme/Steroid Binding Domain Protein, PLCB5L1, Regulates Mycelial Growth, Pathogenicity and Oxidative Stress Tolerance in *Peronophythora litchi*. *Frontiers of Plant Science*, 12 : 783438.
- Lin, Z., Hao, M., Zhu, D., Li, S., and Wen, X. 2017. Molecular cloning, mRNA expression and nutritional regulation of a  $\Delta 6$  fatty acyl desaturase-like gene of mud crab, *Scylla paramamosain*. *Comparative***

***Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 208–209 : 29–37.***

- Lindshield, B. 2018. Kansas State University Human Nutrition (FNDH 400) Flexbook.  
Manhattan, New York : New Prairie Press.
- Lundgren, V. 2011. Phytoplankton defense mechanism against grazing: the role of grazing infochemicals. Doctoral dissertation, Department of Biology and Environmental Science, Faculty of Health and Life Sciences, Linnaeus University.
- Marini, F. 2002. The Breeder's Net: Artemia Nauplii As A Food Source. [Online]. Available from: <https://reefs.com/magazine/the-breeder-s-net-artemia-nauplii-as-a-food-source/> [2022, June 5]
- Mauchline, J., Blaxter, J.H.S., Douglas, B., and Tyler, P.A. 1998. The Biology of Calanoid Copepods: The Biology of Calanoid Copepods. (J. M. John Blaxter, Bruce Douglas, Paul Tyler, Ed.). In Advances in marine biology (1st ed., Vol. 33). Academic Press.
- Moghadasian, M.H., and Shahidi, F. 2017. Fatty acids. In International Encyclopedia of Public Health (2nd ed), pp. 114-122.
- Monroig, O ´., and Kabeya, N. 2018. Desaturases and elongases involved in polyunsaturated fatty acid biosynthesis in aquatic invertebrates: a comprehensive review. *Fisheries Science*, 84 : 911–928.
- Monti. 2018. Harpacticoid. Tigriopus Californicus. [Online]. Available from: <http://blog.coralwonders.com/algae-reactor/attachment/18958/> [2022, May 30]
- Mubarak, A.S., Jusadi, D., Junior, M.Z., and Suprayudi, M.A. 2019. Maximum density in the *Moina macrocopa* culture able to produce parthenogenesis in female offspring. In IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 236, 012013.

Nanton, D.A., and Castell, J.D. 1998. The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp. for use as a live food for marine fish larvae. *Aquaculture*, 163 : 251–261.

National Research Council. 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, pp. 102–125. Washington, DC : National Academies Press.

Nielsen, B.L.H., Gøtterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J. and Jepsen, P.M. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biology Open*, 1-12.

Nielsen, B.L.H., Gréve, H.V.S., and Hansen, B.W., 2020. Biochemical adaptation by the tropical copepods *Apocyclops royi* and *Pseudodiaptomus annandalei* to a PUFA-poor brackish water habitat. *Marine Ecology - Progress Series*, 655 : 77–89.

Nielsen, B.L.H., Gréve, H.V.S., and Hansen, B.W., 2021. Cultivation success and fatty acid composition of the copepods of *Apocyclops royi* and *Pseudodiaptomus annandalei* fed on monospecific diets with varying PUFA profiles. *Aquaculture Research*, 52 : 1127–1138.

Novikov, A. 2018. *Cyclops kolensis*. [Online]. Available from: <https://www.inaturalist.org/photos/57761877> [2022, May 30]

Ocean Nutrition. 2011. Instant Baby Brine Shrimp. [Online]. Available from: <https://www.oceannutrition.eu/products.aspx?Product=instant-baby-brine-shrimp> [2022, May 15]

Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., and Carnevali, O. 2008. The use of harpacticoids copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, 274 : 347–352.

Pan, Y.J., Sadovskaya, I., Hwang, J.S. and Souissi, S. 2018. Assessment of the fecundity, population growth and fatty acid composition of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda) fed on different microalgal diets. *Biology Nutrition*, 24 : 970-978.

Parakrama, M.G.I.S., Rawat, K.D., Venkateshwarlu, G., and Reddy, A.K. 2012. Supply of Astaxanthin and its combinations through live feed (*Moina micrura*) enrichment affects the growth, survival and fatty acid profile of *Macrobrachium rosenbergii* larvae. *Journal of the National Aquatic Resources Research and Development Agency*, 41 : 44-58.

Parrish, C.C. 2013. Lipids in marine ecosystems. *ISRN Oceanography*, 604045.

**Parrish, C.C., French, V.M., and Whiticar, M.J. 2012. Lipid class and fatty acid composition of copepods (*Calanus finmarchicus*, *C. glacialis*, *Pseudocalanus* sp., *Tisbe furcata* and *Nitokra lacustris*) fed various combinations of autotrophic and heterotrophic protists. *Journal of Plankton Research*, 34 : 356–375.**

Paulo, M.C., Cardoso, C., Coutinho, J., Castanho, S., and Bandarra, N.M. 2020. Microalgae solution of rotifers and artemia: scope for the modulation of the fatty acid profile. *Heliyon*, 6 : e05415.

Piper, T. 2019. *Artemia Franciscana*, length: 1 cm, dark-field. [Online]. Available from: [https://www.microscopy.org/awards/micrograph\\_gallery\\_2019/viewer.cfm?tid=54](https://www.microscopy.org/awards/micrograph_gallery_2019/viewer.cfm?tid=54) [2022, May 15]

Poynton, S.L., Dachsel, P., Lehmann, M.J., and Steinberg, C.E.W. 2013. Culture of the cladoceran *Moina macrocopa*: Mortality associated with flagellate infection. *Aquaculture*, 416-417 : 374-379.

- Prusińska, M., Khudyi, O., Kolman, R., Khuda, L., Duda, A., Wiszniewski, G., Marchenko, M., and Kushniryk, O. 2018. Impact of a polyunsaturated fatty acid supplement on enriching the nutritional value of brine shrimp nauplii, *Artemia sp.* *Fisheries & Aquatic Life*, 26 : 173-184.
- Prusova, I., Smith, S.L., and Popova, E. 2012. Calanoid Copepods of the Arabian Sea Region. Muscat, Oman : Sultan Qaboos University Publications.
- Rajkumar, M., and Vasagam, K.P.K. 2006. Suitability of the copepod, *Acartia clausi* as a live feed for Seabass larvae (*Lates calcarifer* Bloch): compared to traditional live-food organisms with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture*, 261 : 649–658.
- Reigh, R.C., and Stickney, R.R. 1989. Effects of purified dietary fatty acids on the fatty acid composition of freshwater shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 77 : 157–174.**
- Shu-Chien, A.C., Han, W.Y., Carter, G.C., Fitzgibbon, Q.P., Simon, C.J., Kuah, M.K., Battaglione, S.C., Codabaccus, B.M., and Ventura, T. 2017. Effect of dietary lipid source on expression of lipid metabolism genes and tissue lipid profile in juvenile spiny lobster *Sagmariasus verreauxi*. *Aquaculture*, 479 : 342–351.
- Sorgeloos, P., Dhert, P., and Candreva, P. 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp. in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200 : 147-159.

Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486 : 219–231.

Støttrup, J.G. 2000. The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*, 31 : 703–711.

Støttrup, J.G. 2003. Production and nutritional value of copepods. *Live Feeds in Marine Aquaculture*, 145-205.

Suhaimi, H., Yuslan, A., Azani, N., Habib, A., Liew, H.J., and Rasdi, N.W. 2022. Effect of dietary enhanced *Moina macrocopa* (Straus, 1820) on the growth, survival and nutritional profiles of hybrid Nile tilapia fry. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 48 : 67-73.

The Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. 2015. UTEX LB 232 *Tetraselmis chuii*. [Online]. Available from: <https://utex.org/products/utex-lb-0232?variant=30992157179994#details> [2022, May 30]

Tohamy, W.E., Qin, J., Aziz, N.A., Ghobashy, A.E., and Dorgham, M. 2020. Suitable algal species and density for the culture of copepod *Gladioferens imparipes* as a potential live food for fish larvae. *Aquaculture International*.

Toledo, J.D., Golez, M.S., and Ohno, A. 2005. Studies on the use of copepods in the semi- intensive seed production of grouper *Epinephelus coioides*. In Lee, C.S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), Copepods in Aquaculture, pp. 169–182. Oxford : Blackwell Publishing.

Turchini, G.M., Nichols, P.D., Barrow, C., and Sinclair, A.L. 2012. Jumping on the Omega-3 Bandwagon: Distinguishing the Role of Long-Chain and Short-Chain Omega-3 Fatty Acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(9) : 795-803.

Turner, D. 2021. Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC. [Online]. Available from: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168> [2022, May 30]

Vega, J.M.P. and Saavedra, M.D.P.S. 2009. The Biochemical Composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an Agricultural Fertilizer. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(4) : 556-560.

Vannerson, B. 2022. Supplementing Newly Hatched Artemia. [Online]. Available from: <https://www.brineshrimpdirect.com/about-us/articles/enriching-brine-shrimp/> [2022, May 15]

Vengadeshperumal, N.P., Rajkumar, D.M., Perumal, P., Vijayalakshmi, S., and Balasubramanian, T. 2010. Laboratory Culture and Biochemical Characterization



- of the Calanoid Copepod, *Acartia Southwelli* Sewell, 1914 and *Acartia Centrura* Giesbrecht, 1889. *Advances in Biological Research*, 4(2) : 97-107
- Vijverberg, J., and Frank, TH.H. 1976. The chemical composition and energy contents of copepods and cladocerans in relation to their size. *Freshwater Biology*, 6 : 333-345.
- Walter, T.C., and Boxshall, G. 2022. World of Copepods Database. [Online]. Available from: <https://www.marinespecies.org/copepoda/> [2022, June 4]
- Wang, H.M.D., Li, X.C., Lee, D.J., and Chang, J.S. 2017. Potential biomedical applications of marine algae. *Bioresource Technology*, 244(2) : 1407-1415.
- Wang, W., Wu, X., Liu, Z., Zheng, H., and Cheng, Y. 2014. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PLoS One*, 9 : e84921.**
- Williamson, C.E., and Reid, J.W. 2001. Copepoda. In Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates, second ed., pp. 915–954. New York : Academic Press.
- Yan, L.J. 2011. Fatty acid enrichment and potential food source for *Moina macrocopa* cultivation. Master's Thesis, Department of Bioscience and Chemistry, Faculty of Engineering and Science, Universiti Tunku Abdul Rahman.
- Yang, Z., Guo, Z., Ji, L., Zeng, Q., Wang, Y., Yang, X., and Cheng, Y. 2013. Cloning and tissue distribution of a fatty acyl  $\Delta 6$ -desaturase-like gene and effects of dietary**

lipid levels on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry & Molecular Biology*, 165 : 99–105.

Yuslan, A., Najuwa, S., Hagiwara, A., Ghaffar, M.A., Suhaimi, H., and Rasdi, A.W. 2021. Production Performance of *Moina macrocopa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera) Cultured in Different Salinities: The Effect on Growth, Survival, Reproduction, and Fatty Acid Composition of the Neonates. *Diversity*, 13, 105.



## ภาคผนวก ก

## การเตรียมอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2

อาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงสาหร่ายหรือไดอะตอม ประกอบด้วยสารละลาย 4 ส่วน ได้แก่ (1) สารละลาย A : Nitrate and phosphate stock solution (2) สารละลาย B : Silicate stock solution (3) สารละลาย C : Trace metal stock solution และ (4) สารละลาย D : Vitamins stock solution โดยเตรียมสารละลายแต่ละส่วนดังตารางที่ 13 จากนั้นผสมสารเคมีที่เตรียมไว้ให้รวมเป็นเนื้อเดียวกันในน้ำทะเลปลอดเชื้อความเค็ม 25 ppt จนได้ปริมาตร 1 ลิตร

ตารางที่ 13 การเตรียมอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2

สาร	ปริมาณ (กรัม)
<b>สารละลาย A : Nitrate and phosphate stock solution (1 ลิตร)</b>	
$\text{NaNO}_3$	84.15
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6.00
$\text{Fe}_2\text{Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.90
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10.00
<b>สารละลาย B : Silicate stock solution (1 ลิตร)</b>	
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	33.00
<b>สารละลาย C : Trace metal stock solution (1 ลิตร)</b>	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.96
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.40
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.26
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	36.00
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.00
<b>สารละลาย D : Vitamins stock solution (1 ลิตร)</b>	
Vitamin B1	0.40
Vitamin B12	0.002 มิลลิกรัม

ภาคผนวก ข  
ผลงานตีพิมพ์ใน Proceedings



## องค์ประกอบของกรดไขมันและการแสดงออกของยีน methyl-end desaturases ในโคพีพอด

*Apocyclops royi*

Fatty acid composition and gene expression of methyl-end desaturases in copepod

*Apocyclops royi*ศุภกานต์ สังข์แก้ว<sup>a</sup>, วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี<sup>b,c</sup>, ปิติ อัมพารย์<sup>b,c</sup>, จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก<sup>a,\*</sup>Supakarn Sungkaew<sup>a</sup>, Walaiporn Charoensapsri<sup>b,c</sup>, Piti Amparyup<sup>b,c</sup>, Chanprapa Imjongjirak<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330<sup>b</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120<sup>c</sup>ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330<sup>a</sup>Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand<sup>b</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani 12120, Thailand<sup>c</sup>Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

\*Corresponding author. E-mail address: chanprapa.i@chula.ac.th

## บทคัดย่อ

โคพีพอด *Apocyclops royi* จัดอยู่ในกลุ่มของครัสเตเชียนขนาดเล็ก มีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นอาหารมีชีวิตในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์กรดไขมันโดยใช้แก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปกโตรสโกปี ค้นพบว่าทุกระยะของ *A. royi* ได้แก่ นอเพลียส โคพีพอดิต และตัวเต็มวัย ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. มี LC-PUFA ในปริมาณสูงรวมถึง DHA และ EPA นอกจากนี้ยังได้ค้นพบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน methyl-end desaturases ใหม่ 2 ยีน ได้แก่ ArO3D-1 และ ArO3D-2 จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตม เมื่อวิเคราะห์โปรตีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 พบว่ามีความเหมือนกับยีน O3D-1 และ O3D-2 ของโคพีพอด *Tigriopus californicus* เท่ากับ 72% และ 73% ตามลำดับ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนพบว่ายีนมีการแสดงออกในทุกระยะพัฒนาการ และแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 ยีนอาจทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ของโคพีพอด *A. royi*

คำสำคัญ: กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน, โคพีพอด, ดีแซตทูเรส

## Abstract

Copepod *Apocyclops royi* is a group of small crustaceans, which plays an important role as major live feed in the aquaculture industry. In this study, analysis of the fatty acid contents using gas chromatography/mass spectroscopy analysis indicated that all copepod stages (nauplius, copepodid and adult stages) of a Thai culture of *A. royi* fed *Tetraselmis* sp. contained high levels of LC-PUFAs, including docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA). Moreover, two novel full-length cDNA of methyl-end desaturases (ArO3D-1 and ArO3D-2) of *A. royi* were identified through transcriptome database. ArO3D-1 and ArO3D-2 proteins exhibited 72% and 73% similarity to O3D-1 and O3D-2 of the copepod *Tigriopus californicus*, respectively. Gene expression analysis showed that ArO3D-1 and ArO3D-2 were universally expressed in all different stages and also upregulated in the adult stages, suggesting the possible function of these genes in LC-PUFA biosynthesis pathway of copepod *A. royi*.

Keywords: Copepod, Desaturase, Polyunsaturated fatty acids (PUFA)

### คำนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยมีความสำคัญอย่างมากทั้งแง่การส่งออกและการบริโภค เนื่องจากปัจจุบันมีการบริโภคอาหารทะเลเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ความต้องการอาหารทะเลเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ต้องมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น แต่การอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนเป็นปัญหาคอขวดที่สำคัญต่อการเพิ่มผลผลิต เนื่องจากอาหารอนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ใช้อยู่ปัจจุบัน เช่น โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย มีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันโอเมกา-3 ที่ต่ำมาก และยังคงส่งผลให้ลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตต่ำ

โคพิพอดเป็นหนึ่งในอาหารธรรมชาติที่มีความสำคัญได้แก่การอนุบาลลูกพันธุ์สัตว์น้ำ โคพิพอดจัดเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน มีวงจรชีวิตสั้น ประกอบด้วย 3 ระยะ ตัวอ่อนระยะเนอเพลียด ระยะวัยรุ่นโคพิพอดโต และระยะตัวเต็มวัย โคพิพอดไซโคลอพอยด์ *Apocyclops royi* เป็นชนิดที่พบในประเทศไทย สามารถเพาะเลี้ยงได้ มีขนาดเล็ก และมีวงจรชีวิตสั้น (ปวีณา และคณะ, 2563) นอกจากนี้ความโดดเด่นของขนาดตัวที่เล็กเหมาะสมกับขนาดของปากสัตว์น้ำวัยอ่อน และยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โคพิพอดสามารถผลิตกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acids หรือ PUFAs) โดยเฉพาะ docosahexaenoic acid (DHA; C22:6n-3) และ eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5n-3) ได้ โดยโคพิพอดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นอาหารมีชีวิตสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน เพื่อรองรับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ถึงแม้ว่าโคพิพอดจะมีความสำคัญต่อการเป็นอาหารมีชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยสามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิดทั้งลูกปลาและลูกกุ้ง (พงศธร, 2558) อย่างไรก็ตามการใช้โคพิพอดในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำยังขาดความเข้าใจทางด้านชีววิทยาโมเลกุลของโคพิพอด

ปัจจุบันได้มีรายงานการศึกษาจีโนมและทรานสคริปโตมของโคพิพอด *A. royi* โดยมีขนาดประมาณของจีโนมเท่ากับ 450 Mb (Jorgensen et al., 2019) ต่อมาได้มีการค้นพบยีนในกลุ่ม fatty acid elongase (ELO) และ fatty acid desaturase (FAD) จำนวน 4 ยีน (Elov14, Elov15, Fad Δ5 และ Fad Δ6) ที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมกา-3 (Nielsen et al., 2019) โดยกลไกการสร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (PUFA) ของสิ่งมีชีวิตเป็นกลไกที่ซับซ้อนและประกอบด้วยเอนไซม์หลักหลายชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปัจจุบันยังขาดข้อมูลกลไกการสังเคราะห์ PUFA ของโคพิพอด การศึกษากลไกการสร้างกรดไขมันในโคพิพอดมีความจำเป็นอย่างมากต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโคพิพอดให้มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยโคพิพอดจะใช้เอนไซม์ดีแซตทูเรส (FAD) ในการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นในกลุ่ม PUFA ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเติมพันธะคู่เข้าที่ตำแหน่งจำเพาะบนสายเอซิลของกรดไขมัน ดังนั้นการศึกษายีนดีแซตทูเรสที่แสดงออกในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพิพอดจะช่วยบ่งบอกแนวทางการทำงานของเอนไซม์ดีแซตทูเรสที่มีความสำคัญในแต่ละระยะ ซึ่งจะนำไปสู่การเลือกใช้สับสเตรทจากสารร่ายที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงโคพิพอด ที่จะนำไปสู่การจัดการการเพาะเลี้ยงโคพิพอดให้มีคุณค่าทางโภชนาการมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดไขมัน และการแสดงออกของยีน methyl-end desaturases (ArO3D-1 และ ArO3D-2) เป็นยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันในโคพิพอด ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยจะช่วยให้สามารถเข้าใจความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในกลไกการสังเคราะห์กรดไขมันของโคพิพอดต่อองค์ประกอบของกรดไขมันในโคพิพอด เพื่อใช้ในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโคพิพอดเชิงพาณิชย์ของไทย

การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 60

สาขาวิทยาศาสตร์

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเลี้ยงสาหร่ายและโคพีพอดเพื่อเก็บตัวอย่าง

ทำการเตรียมหัวเชื้อสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในอาหารสูตรกิลลาร์ด F/2 (Guillard, 1973) ที่เตรียมจากน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 20 นาที ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C ให้อากาศและแสงโดยใช้หลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดเวลา ทำการเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน และนำสาหร่ายมาเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 15 วัน ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 25 ppt เก็บตัวอย่างโคพีพอดแต่ละระยะพัฒนาการ (นอเพเลียส โคพีพอดิต และ ตัวเต็มวัย) โดยใช้ผ้ากรองไมครอนที่มีขนาดรูผ้า (Pore size) 33, 180 และ 300 ไมครอนเมตร เพื่อแยกโคพีพอดแต่ละระยะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากนั้นล้างโคพีพอด แช่แข็งในตู้ -80°C เพื่อวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

### การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi*

ทำการเลี้ยงโคพีพอด *A. royi* ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt โดยให้สาหร่าย *Tetraselmis* sp. เป็นอาหารเป็นเวลา 15 วัน จากนั้นทำการแยกระยะโคพีพอด ได้แก่ ตัวเต็มวัย (AD), โคพีพอดิต (CD) และนอเพเลียส (NP) ด้วยผ้ากรองขนาด 300, 180 และ 33 ไมครอนเมตร ตามลำดับ ทำการล้างโคพีพอดในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt อย่างน้อย 2 ครั้ง จากนั้นนำตัวอย่างโคพีพอดไปวิเคราะห์หาชนิดและสัดส่วนของกรดไขมันด้วยเทคนิควิเคราะห์ GC/MS analysis วิเคราะห์ผลโดยการทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยข้อมูลที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS

### การค้นหาและวิเคราะห์ยีน methyl-end desaturases (ArO3D-1 และ ArO3D-2)

ค้นหาข้อมูลของยีน ArO3D-1 (GenBank accession number: GHAJ01031023) และ ArO3D-2 (GHAJ01060007) จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของโคพีพอด *A. royi* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีนด้วยโปรแกรม ExPASy (<https://www.expasy.org>) ทำนายโดเมนของโปรตีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

### การสกัด RNA และเตรียม cDNA

ทำการสกัด total RNA จากทั้งสามระยะของโคพีพอด *A. royi* (กลุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำ) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอ TRIzol™ Reagent ทำการย่อยดีเอ็นเอที่เจือปนออกด้วยเอนไซม์ DNase I วิเคราะห์ความเข้มข้นและตรวจสอบคุณภาพของตัวอย่าง RNA ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) และสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ ImProm-II™ Reverse Transcription System Kit (Promega) เพื่อนำมาใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR

### การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน

ทำการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีน ArO3D-1 (F: AGGGTGAGGATGTTCTTGGTA และ R: TCATTGCACTTCTCACAAGGT) และ ArO3D-2 (F: ACGAGATCTTCTACCCCGTGAG และ R: CCCAAGATAAGTCCA

AGCCAAG) โดยใช้โปรแกรม Primer3Plus ตรวจสอบการแสดงออกของยีน โดยใช้ cDNA ของโคพีพอดทั้ง 3 ระยะการพัฒนากการ (ระยะนอเพเลียส ระยะโคพีโพติด และระยะตัวเต็มวัย) ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้โปรแกรมดังนี้ 94°C 1 นาที ตามด้วย 25 รอบ ของ 94°C 30 วินาที, 55°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที และท้ายสุดที่ 72°C 5 นาที ขั้นตอนต่อไปนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยใช้ 1.8% Agarose gel ย้อมด้วย Ethidium bromide (EtBr) นำแผ่นเจลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gel documentation ร่วมกับโปรแกรม GeneSys จะได้แถบของยีน จากนั้นนำแถบที่ได้ไปวัดค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) ด้วยโปรแกรม Gel Pro 3.1 simple analysis และคำนวณค่าการแสดงออกของยีน (Relative mRNA expression) โดยใช้ Elongation factor 1- $\alpha$  (F: GTGTTGGACAAGCTGAAGTC และ R: GGTCCAGTGATCATGTTCTTGATG) เป็นยีนควบคุม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในโคพีพอดแต่ละระยะ

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์กรดไขมันในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp.

จากการศึกษาปริมาณของกรดไขมันของโคพีพอด *A. royi* ทั้ง 3 ระยะที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ด้วยวิธี GC/MS พบปริมาณของ PUFA ของโคพีพอด *A. royi* ในระยะนอเพเลียส (NP), ระยะโคพีโพติด (CD) และระยะตัวเต็มวัย (AD) มีค่าเท่ากับ 22.5%, 37.59% และ 42.0% ตามลำดับ โดยปริมาณของ PUFA ในโคพีพอดมีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในโคพีพอด *A. dengizicus* ที่เลี้ยงด้วย *Tetraselmis tetrahele* พบว่ามีปริมาณของ PUFA (37.56%) (Farhadian et al., 2009) โดยทั้งสามระยะพัฒนาการของโคพีพอดพบว่ามี LC-PUFA อยู่ในปริมาณที่สูง เท่ากับ 5.27%, 9.43% และ 10.51% ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าของกรดไขมันโอเมกา-3 ในโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ พบว่า มีค่าเท่ากับ 15.58%, 25.25% และ 26.64% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบกรดไขมัน DHA (C22:6 n-3) ในโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ โดยใน ระยะตัวเต็มวัย (AD) พบมากที่สุด (4.85%) รองลงมาคือระยะวัยรุ่นโคพีโพติด (CD) (4.23%) และระยะตัวอ่อนนอเพเลียส (NP) (2.78%) ในขณะที่กรดไขมันโอเมกา-6 ของโคพีพอดทั้ง 3 ระยะ มีปริมาณ 6.92%, 12.34% และ 15.36% ตามลำดับ โดยพบกรดไขมัน ARA (C20:4 n-6) ในโคพีพอดระยะวัยรุ่นโคพีโพติด (CD) (1.11%) และระยะ ตัวเต็มวัย (AD) (1.31%) แต่ไม่พบในโคพีพอดระยะตัวอ่อนนอเพเลียส (NP) แสดงดัง Table 1



**Table 1** Fatty acid analysis in the three developmental stages (nauplius; NP), copepodid; CD, and adult; AD) of the cyclopoid copepod *A. royi* fed with *Tetraselmis* sp.

Fatty acids	Copepod <i>Apocyclops royi</i>		
	NP	CD	AD
n-3 PUFA			
C18:3 n-3 (ALA)	10.31±6.04	17.14±0.53	18.10±3.01
C20:3 n-3	Not detect	0.79±0.21	1.15±0.10
C20:5 n-3 (EPA)	2.50±0.19	3.10±0.76	2.55±0.08
C22:6 n-3 (DHA)	2.78±0.01 <sup>a</sup>	4.23±0.49 <sup>a,b</sup>	4.85±0.88 <sup>b</sup>
n-6 PUFA			
C18:2 n-6 cis (LA)	6.92±0.72 <sup>a</sup>	10.47±2.55 <sup>a,b</sup>	12.81±0.55 <sup>b</sup>
C18:3 n-6	n.d.	0.56±0.02	0.59±0.06
C20:2 n-6	n.d.	n.d.	0.39±0.13
C20:3 n-6	n.d.	0.21±0.00 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>
C20:4 n-6 (ARA)	n.d.	1.11±0.42	1.31±0.19
∑SC_PUFA	17.23±6.76	28.16±2.04	31.49±3.62
∑LC_PUFA	5.27±0.20 <sup>a</sup>	9.43±0.35 <sup>b</sup>	10.51±1.01 <sup>b</sup>
∑n-3 PUFA	15.58±5.84	25.25±0.59	26.64±2.31
∑n-6 PUFA	6.92±0.72 <sup>a</sup>	12.34±2.98 <sup>a,b</sup>	15.36±0.30 <sup>b</sup>
∑PUFA	22.50±6.56 <sup>a</sup>	37.59±2.39 <sup>b</sup>	42.00±2.61 <sup>b</sup>

Note: Data represents the mean±standard deviation of triplicate samples. Means with different lowercase letter (shown above) are significantly different ( $p < 0.05$ ; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests). n.d.= Not detected.

#### การศึกษายีน และการแสดงออกของยีน *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* ของโคพีพอด *A. royi*

ผลจากการวิเคราะห์ยีนในกลุ่ม methyl-end desaturases ของโคพีพอด *A. royi* ค้นพบยีนจำนวน 2 ยีน ประกอบด้วย *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าทั้ง 2 ยีนเป็นยีนใหม่ที่ยังไม่มีรายงานในโคพีพอด *A. royi* (Nielsen et al., 2019) ซึ่งได้รายงานการค้นพบยีนจำนวน 4 ยีน ในกลุ่ม fatty acid elongase (ELO) และ fatty acid desaturase (FAD) ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นในกลุ่มโอเมกา-3 (Nielsen et al., 2019) ผลจากการวิเคราะห์ยีน *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* ในโคพีพอด *A. royi* พบว่าประกอบด้วย Open reading frame (ORF) ขนาด 1,149 และ 1,233 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 382 และ 410 กรดอะมิโน ตามลำดับ จากการวิเคราะห์หาโดเมนที่มีความสำคัญด้วยโปรแกรม SMART พบว่า *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* ประกอบด้วย FAD domain จำนวน 1 โดเมน แสดงใน Fig. 1 ซึ่งเป็นลักษณะสมบัติเฉพาะสำคัญของเอนไซม์ FAD เหมือนกับการรายงานการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน FAD ในโคพีพอดชนิดอื่นๆ (Nielsen et al., 2019; Kabeya et al., 2021) ผลจากการเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล (GenBank) ด้วยโปรแกรม BLASTP พบว่ายีน *ArO3D-1* และ *ArO3D-2* มีความ

เหมือนกับยีน methyl-end desaturase-1 (O3D-1) และ methyl-end desaturase-2 (O3D-2) ของโคพีพอด *Tigriopus californicus* โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 72% และ 73% ตามลำดับ จากรายงานของ Kabeya et al. (2021) พบว่ายีน O3D-1 อยู่ในกลุ่ม methyl-end desaturase ที่มี  $\Delta 12$ ,  $\Delta 15$  และ  $\Delta 17$  desaturase activity ในขณะที่ยีน O3D-2 อยู่ในกลุ่ม methyl-end desaturase ที่มี  $\Delta 15$ ,  $\Delta 17$  และ  $\Delta 19$  desaturase activity (Kabeya et al., 2021)



Fig. 1 Multiple alignment of deduced amino acid sequence of methyl-end desaturases (ArO3D-1 and ArO3D-2) of copepod *A. royi* with TcO3D-1 and TcO3D-2 of copepod *T. californicus*

Note: Gray highlights indicate complete conservation in two species of copepod

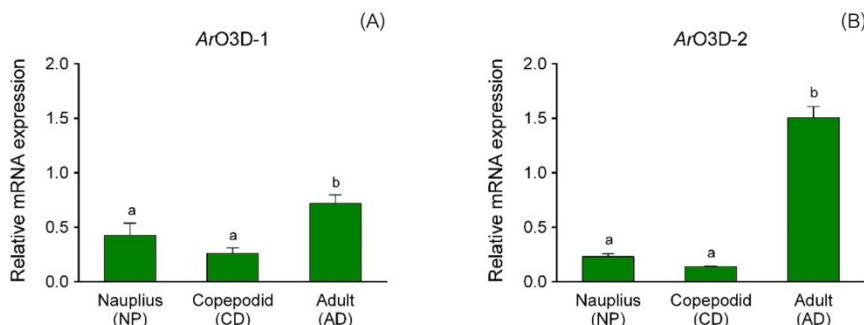


Fig. 2 Gene expression analysis of ArO3D-1(A) and ArO3D-2(B) mRNA in various developmental stages of copepod *A. royi*

Note: The expression profile from the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages were analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis. The elongation factor 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) served as an internal control in all analyzes. Data represents the mean $\pm$ standard deviation (error bars) of triplicate samples. Means with different lowercase letter (above each bar) are significantly different ( $p < 0.05$ ; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests).

เมื่อทำการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะพัฒนาการของโคพีพอด *A. royi*-TH ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน elongation factor 1- $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) เป็นยีนควบคุม ผลการศึกษาพบว่า ยีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 มีการแสดงออกที่สูงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระยะตัวเต็มวัย (AD) ของโคพีพอด *A. royi* เมื่อเทียบกับระยะนาอพลีซิส (NP) และระยะโคพีพอดิด (CD) ดัง

แสดงใน Fig. 2(A) และ Fig. 2(B) ตามลำดับ จากรายงานการศึกษาของ Lenz et al. (2014) ค้นพบว่ายีน delta-9 desaturase (D9D) ของโคพีพอด *Calanus finmarchicus* มีการแสดงออกที่สูงในระยะเวลา CD เมื่อเทียบกับระยะ AD (ตัวเต็มวัยเพศเมีย) อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์พบว่า D9D เป็นเอนไซม์ที่สร้างกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่เดี่ยว (monounsaturated fatty acid: MUFA) โดยทำหน้าที่แตกต่างจากกลุ่มของเอนไซม์ O3D ที่ทำหน้าที่สร้างกรดไขมัน PUFA เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์กรดไขมันพบว่าการแสดงออกของยีน ArO3D-1 และ ArO3D-2 ในระยะ AD (แสดงออกสูง) และ ระยะ NP (แสดงออกน้อย) มีความสอดคล้องกับปริมาณของ PUFA โดยมีค่าเท่ากับ 42.0% (AD) และ 22.5% (NP) ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทของยีนทั้งสองในการสังเคราะห์ PUFA อย่างไรก็ตามการศึกษาขั้นต่อไปในเชิงลึกของการทำงานของ ArO3D-1 และ ArO3D-2 จะทำให้ทราบหน้าที่ของยีนทั้งสองในการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ในโคพีพอด *A. royi* มากยิ่งขึ้น

### สรุป

ผลจากการศึกษาวิจัยประสบความสำเร็จในการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันและค้นพบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนของโคพีพอด *A. royi* สายพันธุ์ไทย พบว่าโคพีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ทั้ง 3 ระยะ ได้แก่ ระยะนอเพลียส (NP), ระยะโคพีโพติด (CD) และระยะตัวเต็มวัย (AD) พบว่ามี LC-PUFA อยู่ในปริมาณที่สูง 5.27%, 9.43% และ 10.51% ตามลำดับ และได้ค้นพบยีนใหม่ 2 ยีน ได้แก่ ArO3D-1 และ ArO3D-2 พบว่ามีการแสดงออกเพิ่มสูงขึ้นในระยะตัวเต็มวัย แสดงให้เห็นว่าทั้ง 2 ยีน อาจทำหน้าที่ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA ของโคพีพอด *A. royi* ซึ่งข้อมูลในเชิงลึกที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงโคพีพอดเชิงพาณิชย์ของไทยในอนาคต

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (P2050332), สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สัญญาเลขที่ วช.อ.(อ)(ภส)/49/2564) และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัญญาเลขที่ RCU\_F\_64\_004\_23)

### เอกสารอ้างอิง

- ปวีณา ตปนียวรงค์, อภิญญา อยู่สบาย, ปราวรณา ปานทอง, ปาริชาติ ชุมทอง, จันทรจักรัส วัฒนะโชติ, มะลิวัลย์ คุตะโค. 2563. องค์ประกอบของกรดไขมันของไซโคลพอยด์โคพีพอด *Apocyclops royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายชนิดแตกต่างกัน. วารสารแก่นเกษตร 48: 101–108.
- พงศธร จันทรรัตน์. 2558. การเพาะเลี้ยงโคพีพอดเพื่อการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนในโรงเพาะฟัก. วารสารเกษตร 32: 225–239.
- Farhadian, O., Yuso, F.M., Mohamed, S. 2009. Nutritional values of *Apocyclops dengizicus* (Copepoda: Cyclopoida) fed *Chaetoceros calcitrans* and *Tetraselmis tetrahele*. Aquac. Res. 40: 74–82.
- Guillard, R.R.L. 1973. Culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. New York, NY, USA.

- Jørgensen, T.S., Nielsen, B.L.H., Petersen, B., Browne, P.D., Hansen, B.W., Hansen, L.H. 2019. The whole genome sequence and mRNA transcriptome of the tropical cyclopoid copepod *Apocyclops royi*. *G3-Genes Genom Genet.* 9, 1295–1302.
- Kabeya, N., Ogino, M., Ushio, H., Haga, Y., Satoh, S., Navarro, J.C., Monroig, Ó. 2021. A complete enzymatic capacity for biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n–3) exists in the marine Harpacticoida copepod *Tigriopus californicus*. *Open Biol.* 11, 200402.
- Lenz, P.H., Roncalli, V., Hassett, R.P., Wu, L.S., Cieslak, M.C., Hartline, D.K., Christie, A.E. 2014. De novo assembly of a Transcriptome for *Calanus finmarchicus* (Crustacea, Copepoda) – the dominant zooplankter of the North Atlantic Ocean. *PLoS One* 9, e88589.
- Nielsen, B.L.H., Gøtterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J., Jepsen, P.M. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biol. Open.* 8: bio038331.

## ภาคผนวก ค

## ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร Aquaculture Reports

Aquaculture Reports 23 (2022) 101064



Contents lists available at ScienceDirect

## Aquaculture Reports

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aqrep](http://www.elsevier.com/locate/aqrep)Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*

Piti Amparyup<sup>a,b,\*</sup>, Supakarn Sungkaew<sup>c,1</sup>, Walaiporn Charoensapri<sup>a,b</sup>,  
Paveena Tapaneyaworawong<sup>a,b</sup>, Parichat Chumtong<sup>a,b</sup>, Patchari Yocawibun<sup>a,b</sup>,  
Prarthana Pantong<sup>a,b</sup>, Ratre Wongpanya<sup>d</sup>, Chanprapa Imjongjirak<sup>c,\*\*</sup>,  
Sorawit Powtongsook<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand

<sup>b</sup> Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>c</sup> Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok 10330, Thailand

<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Ngamwongwan Road, Bangkok 10900, Thailand

## ARTICLE INFO

Keywords:  
Copepod  
*Apocyclops royi*  
PUFA  
Elongase  
Desaturase

## ABSTRACT

Copepod *Apocyclops royi* can biosynthesize long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) when fed low-PUFA precursors. Previously, two elongases and two desaturases in the n-3 PUFA biosynthetic pathway were identified from *A. royi*. However, the complete PUFA biosynthesis pathway in this copepod species is poorly understood. Here, we report 13 genes, of which nine are novel genes, encoding PUFA biosynthesis-related enzymes belonging to the fatty acid desaturases (ArD6D, ArD5D, ArD4D, ArO3D-1, and ArO3D-2) and elongases (Elov1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8) families identified from a Thai culture of *A. royi* (*A. royi*-TH). Identification of the fatty acid contents using gas chromatography/mass spectroscopy analysis indicated that the copepodid and adult stages were high in PUFAs, with omega-3 fatty acids, while the nauplius stage had the lowest level of PUFAs. Moreover, all copepod stages of *A. royi*-TH fed *Tetraselmis suecica* contained higher levels of LC-PUFAs, including docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), than the microalgae fatty acid content, which was deficient in omega-3 DHA. Changes in transcript expression levels were determined in three developmental stages of *A. royi*-TH. Interestingly, the increased gene expression of the fatty acid desaturases (ArD6D, ArD5D, ArD4D, ArO3D-1, and ArO3D-2) and elongases (ArElov1, 4, 5, 6, and 7) in the adult stages was reflected in the increased fatty acid concentration of DHA and EPA in the adult stages compared with the other developmental stages, suggesting the possible function of these genes for LC-PUFA synthesis in the different copepod developmental stages. These results indicate that the nauplius, copepodid, and adult stages are capable of synthesizing DHA from low PUFA through a LC-PUFA biosynthesis pathway.

## 1. Introduction

Copepods are a group of small crustaceans that play a pivotal role as consumers of primary producers and as major live prey for many aquatic species in natural food webs (Dhont et al., 2013; Williamson and Reid, 2001). The use of copepods has been reported for larval rearing of a

number of marine fish species (Busch et al., 2011; McEvoy et al., 1998; Ogle et al., 2005; Olivotto et al., 2008; Payne et al., 2001; Rajkumar and Vasagam, 2006; Shields et al., 1999; Toledo et al., 2005). According to their high nutritional value and wide range of sizes and swimming motions, copepods are considered as a promising potential live feed for marine larviculture (Dhont et al., 2013; Drillet et al., 2011; Støttrup,

\* Corresponding author at: Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani 12120, Thailand.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [piti.amp@biotec.or.th](mailto:piti.amp@biotec.or.th) (P. Amparyup), [chanprapa.i@chula.ac.th](mailto:chanprapa.i@chula.ac.th) (C. Imjongjirak).

<sup>1</sup> These two authors contributed equally to this work and share the first authorship.

<https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2022.101064>

Received 16 November 2021; Received in revised form 23 February 2022; Accepted 25 February 2022

Available online 28 February 2022

2352-5134/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

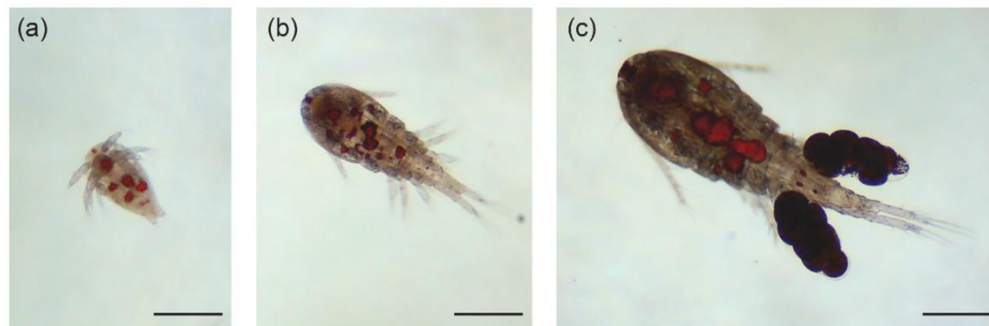


Fig. 1. Representative microscope images showing the morphology of the nauplius (a), copepodid (b), and adult (c) developmental stages of Oil Red O-stained *A. royi*-TH. Scale bars represent 200  $\mu$ m.

Table 1  
Nucleotide sequences of the primers used.

Primers	Sequences (5'-3')	Purpose
Fatty acid desaturase		
D6D-F	TCGCCCTCCATTATCTACACGG	RT-PCR
D6D-R	TGTTTCGATCTGGTAATTGAGACCTCC	RT-PCR
D5D-F	CGTTGTCTACATCATCAGGTGGGT	RT-PCR
D5D-R	GTGTGGCTTGACTGGTCTTCTCGTG	RT-PCR
D4D-F	CGATCGGAATCCATTCTCAGT	RT-PCR
D4D-R	GTTGAACGAAAGCTGAATCACG	RT-PCR
O3D-1-F	ACGAGATCTTCTACCCGCTGAG	RT-PCR
O3D-1-R	CCCAAGATAAGTCCAAGCCAAG	RT-PCR
O3D-2-F	AGGGTGAGGATGTTCTTGGTA	RT-PCR
O3D-2-R	TCATTGCCACTTCTCACAAAGT	RT-PCR
D5D-TW-F	GCTGCTCTTTTCGGATTGCA	RT-PCR
D5D-TW-R	CCGAAGCTGGCTATTTATGT	RT-PCR
Elongation of very long fatty acids protein (Elov)		
Elov1-F	CCGATAGCCCGAAAGCTTTACTTA	RT-PCR
Elov1-R	ACGTTGAGGAAACCAAGAAGGAG	RT-PCR
Elov2-F	ACGGTCAATTGCTTAGTTCACGTC	RT-PCR
Elov2-R	AGCATGAGGAGGCTTGTATCAGA	RT-PCR
Elov3-F	TTCGATTTCTTCCAGGTGGTCA	RT-PCR
Elov3-R	CACTGGGTACGCACAGTCTCT	RT-PCR
Elov4-F	AGTTCCTCGAATGTTGACTCGT	RT-PCR
Elov4-R	TAGTAGCCGTCATGAGGACGTGAA	RT-PCR
Elov5-F	GGAATCCAACCTTCTTGGAAAGAGAC	RT-PCR
Elov5-R	GTTGGGATATACAGCCTAGGTAC	RT-PCR
Elov6-F	GTATCACCATTGACCGTTCTGTTG	RT-PCR
Elov6-R	ATCTGATAGGCCAGAGCTGACTA	RT-PCR
Elov7-F	GATGTGTGCCCTACGTCTAC	RT-PCR
Elov7-R	GCTTTGGGTTGTCGAGTAGT	RT-PCR
Elov8-F	ATGGCTTACAATGCTTTCAGGTC	RT-PCR
Elov8-R	GACACGTTGCGAACTTTTCTCTG	RT-PCR
Elongation factor 1- $\alpha$ (EF1 $\alpha$ )		
EF1 $\alpha$ -F	GTGTTGGACAAGCTGAAGTC	RT-PCR
EF1 $\alpha$ -R	GGTCCAGTATCATGTTCTTGATG	RT-PCR

## 2000).

Certain essential fatty acids, especially omega-3 (n-3) long-chain ( $\geq$  C20) polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA), are essential nutrients that are considered important drivers of ecosystem health and stability (Parrish, 2013). Their significance not only impacts on animal growth, but also on other facets, including reproduction, immunity, and ion balance regulation and product quality (Glencross, 2009). Previous studies have shown that many invertebrates possess enzymes that contribute to LC-PUFA production (Kabeya et al., 2018; Monroig and Kabeya, 2018). In particular, the desaturases and elongases are key enzymes that play essential roles in the PUFA biosynthesis by aquatic invertebrates.

Three types of major enzymes that participate in the pathways of *de novo* and trophic upgrading of PUFA, namely methyl-end (or  $\omega$ x)

desaturases, fatty acyl (front-end) desaturases (Fads), and elongation of very long-chain fatty acid (Elov) proteins (commonly known as elongases), have been characterized from many invertebrate species, including sponges, cnidarians, molluscs, annelids, crustaceans (including copepods), rotifers, echinoderms, and non-vertebrate chordates (amphioxus and sea squirt) (Kabeya et al., 2018; Monroig and Kabeya, 2018). In copepods, a previous study reported that methyl-end desaturase genes were exclusively found in the specific orders of Siphonostomatoida, Cyclopoida, and Harpacticoida, but not in Calanoida copepods, while the presence of front-end desaturases, as demonstrated by the ability to bioconvert eicosapentaenoic acid (EPA) to docosahexaenoic acid (DHA), has been suggested in the calanoids *Calanus finmarchicus* and *Drepanopus forcipatus* and the cyclopoid *Cyclops strenuus* (Monroig and Kabeya, 2018).

Although genomic and transcriptomic resources are available for several Harpacticoida, including *Tisbe holothuriae* (BioProject PRJEB23629), *Tigriopus californicus* (Schoville et al., 2012), *Tigriopus japonicus* (Kim et al., 2015), *Tigriopus kingsejongensis* (Kim et al., 2016; Lee et al., 2020a), and *Platychelipus littoralis* (Boyen et al., 2020), and Cyclopoida (*Paracyclops nana*) (Lee et al., 2020b), there is no evidence demonstrating the functional role of these enzymes in the LC-PUFA biosynthetic pathways. Interestingly, a recent study in the harpacticoid copepod *T. californicus* revealed that the complete n-3 LC-PUFA biosynthetic pathways exist in a copepod, with 13 genes encoding for two  $\omega$ x desaturases, five front-end desaturases, and six elongases being identified and functionally characterized (Kabeya et al., 2021). However, the molecular mechanism underlying the PUFA biosynthesis in copepods remains largely uninvestigated.

The cyclopoid *Apocyclops royi* is a tropical copepod that is suspected to possess the capability to biosynthesize n-3 LC-PUFA from short-chain PUFAs (Nielsen et al., 2019, 2020, 2021; Pan et al., 2018). Transcripts coding for four putative front-end desaturase and elongase enzymes, including Fad  $\Delta$ 5, Fad  $\Delta$ 6, Elov14, and Elov15, have been identified and assumed to function in the n-3 PUFA biosynthetic pathway (Nielsen et al., 2019). However, their exact function remains to be experimentally characterized. In this study, we identified 13 n-3 LC-PUFA biosynthesis-related genes encoding for methyl-end desaturase, front-end desaturase, and elongase enzymes from a Thai culture of the cyclopoid copepod *A. royi* (*A. royi*-TH). We analyzed the transcript expression levels and fatty acid compositions in the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages of *A. royi*-TH that had been fed on *Tetraselmis suecica*, a green microalgae that is deficient in DHA. Knowledge of the gene expression and fatty acid profile in these different development life stages of *A. royi*-TH may provide novel insights into n-3 LC-PUFA biosynthesis and metabolism in invertebrates, and may alter or enhance more efficient PUFA production to supply the demand from

**Table 2**  
Molecular characteristics of the genes and their predicted protein products in the LC-PUFA biosynthetic pathways of the cyclopoid copepod *Apocyclops royi*.

Gene name	CDS /ORF	Closest gene (% amino acid similarity) (ACNO)	Conserved domains	Putative Biological Functions/ Reference sources
<b>Fatty acid desaturase</b>				
ArD6D	1302 bp/ 433 aa	<i>Tigriopus californicus</i> front-end desaturase-2 (76%) (QWC69495)	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain, Five transmembrane domains, and FA_desaturase domain	Front-end desaturase: $\Delta 6$ fatty acid desaturase activity (Nielsen et al., 2019) $\Delta 4$ desaturase activity (Kabeya et al., 2021)
ArD5D	1317 bp/ 438 aa	<i>Paracyclopsina nana</i> delta5 desaturase (76%) (APH81338)	Cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain, Five transmembrane domains, and FA_desaturase domain	Front-end desaturase: $\Delta 5$ fatty acid desaturase activity (Lee et al., 2017b) $\Delta 6$ fatty acid desaturase activity (Nielsen et al., 2019)
ArD4D	1026 bp/ 341 aa	<i>Tigriopus japonicus</i> delta4-desaturase (86%) (AIW65589)	Sphingolipid desaturase domain, Four transmembrane domains, and FA_desaturase domain	Front-end desaturase: $\Delta 4$ desaturase activity (Lee et al., 2020b)
ArO3D-1	1149 bp/ 382 aa	<i>T. californicus</i> methyl-end desaturase-1 (72%) (QWC69499)	Five transmembrane domains and FA_desaturase domain	Methyl-end desaturase: $\Delta 12$ , $\Delta 15$ , and $\Delta 17$ desaturase activities (Kabeya et al., 2021)
ArO3D-2	1233 bp/ 410 aa	<i>T. californicus</i> methyl-end desaturase-2 (73%) (QWC69500)	Six transmembrane domains and FA_desaturase domain	Methyl-end desaturase: $\Delta 15$ , $\Delta 17$ , and $\Delta 19$ desaturase activities (Kabeya et al., 2021)
<b>Elongation of very long fatty acids protein (Elovl)</b>				
ArElovl1	873 bp/ 290 aa	<i>P. nana</i> elongase-1 (86%) (APH81340)	Five transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2017b)
ArElovl2	831 bp/ 276 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-2 (79%) (QWC69490)	Seven transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl3	858 bp/ 285 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-1 (73%) (QWC69489)	Seven transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl4	903 bp/ 300 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-6	Seven transmembrane domains and ELO domain	Elovl4 (Nielsen et al., 2019) Elongase

**Table 2 (continued)**

Gene name	CDS /ORF	Closest gene (% amino acid similarity) (ACNO)	Conserved domains	Putative Biological Functions/ Reference sources
		(67%) (QWC69501)		activity towards C18, C20, and C22:5n-3, but not C22:4n-6 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl5	723 bp/ 240 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-4 (76%) (QWC69492)	Six transmembrane domains and ELO domain	Elovl5 (Nielsen et al., 2019) Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)
ArElovl6	879 bp/ 292 aa	<i>T. japonicus</i> elongase-2 (78%) (AIW65585)	Seven transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2020b)
ArElovl7	879 bp/ 292 aa	<i>P. nana</i> elongase-1 (82%) (APH81340)	Five transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity (Lee et al., 2017b)
ArElovl8	771 bp/ 256 aa	<i>T. californicus</i> fatty acid elongase-5 (79%) (QWC69493)	Five transmembrane domains and ELO domain	Elongase activity towards C18 and C20, but not C22 (Kabeya et al., 2021)

aquaculture.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Identification of PUFA biosynthesis-related genes and sequence analysis

To identify genes involved in the PUFAs biosynthesis, nucleotide sequences encoding for desaturase and elongase enzymes were retrieved from the copepod *Apocyclops royi* (*A. royi*-TH) transcriptome (Amparyup et al., unpublished data). Sequence similarity searches were performed using the BLASTx program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The nucleotide and predicted amino acid sequences of the candidate genes were analyzed using the ExPASy program (<https://www.expasy.org/>) (The deduced amino acid sequences were shown in Fig. S1). A conserved domain search was performed using the SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). The TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) software was used to predict transmembrane domain (TMD) helices. Multiple sequence alignments were performed using the Clustal Omega program (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### 2.2. Development stages and sample preparation of the copepod *A. royi*-TH

The *A. royi*-TH was originally isolated from Chanthaburi province, Thailand, and maintained at the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, under controlled laboratory conditions at 28 °C in an aerated 5-L vessel containing sterile seawater at a salinity of 25 ppt (SSW), was used in this study (Fig. 1). Copepods were fed three times a week *ad libitum* with the green microalgae *Tetraselmis suecica*. To prepare samples for gene

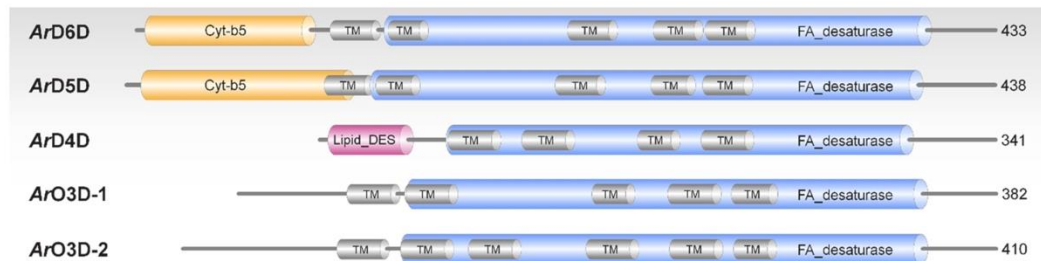


Fig. 2. Domain organization of fatty acid desaturases from *A. royi*-TH. The total number of amino acid residues is shown on the right. The cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain is indicated by yellow color. The transmembrane domain is indicated by gray color. The FA\_desaturase domain is indicated by blue color. The sphingolipid desaturase domain is indicated by pink color. Cyt-b5, cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain; TM, transmembrane domain; FA\_desaturase, FA\_desaturase domain; Lipid\_DES, sphingolipid desaturase domain.

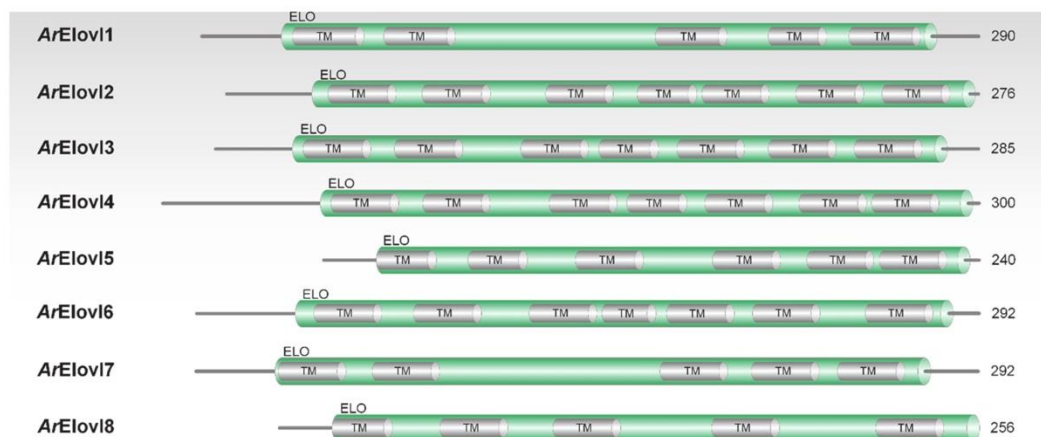


Fig. 3. Domain organization of elongation of very long fatty acids protein (Elov1) from *A. royi*-TH. The total number of amino acid residues is shown on the right. The transmembrane domain is indicated by gray color. The ELO domain is indicated by green color. TM, transmembrane domain; ELO, ELO domain.

expression analysis, three independently replicated *A. royi*-TH cultures were transferred to SSW for an additional 3 h to allow gut evacuation. Approximately 500 individuals from each of the three major development stages (NP, CD, and AD) were collected separately.

### 2.3. RNA isolation and cDNA synthesis of *A. royi*-TH developmental stages

Immediately after sampling, the *A. royi*-TH were homogenized in TRIzol™ Reagent (Invitrogen) with a glass tissue grinder and then the total RNA was extracted following the manufacturer's instructions. To eliminate residual genomic DNA contamination, each sample was treated with RNase-free DNase I (Promega). The RNA concentration and purity were measured with a NanoDrop (Thermo Scientific), and then 500 ng of the total RNA was used as the template to synthesize the first-strand cDNA with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's protocol. The cDNA samples of each developmental stage were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The amplification ability of the cDNA was evaluated by PCR amplification of the elongation factor 1- $\alpha$  gene (*ArEF1 $\alpha$* ).

### 2.4. Gene expression analysis

To investigate the expression patterns of the 14 desaturase and elongase genes identified from the present study (Fig. S1 and Table 1), we measured the transcript expression levels in each developmental stage of the copepod by semi-quantitative RT-PCR (sqRT-PCR). Gene-specific PCR primers (Table 1) for each gene were designed using the Primer3Plus program and the PCR reactions were performed on three replicates as previously described (Amparyup et al., 2009). Amplification products were analyzed by 1.8% (w/v) agarose gel electrophoresis after staining with ethidium bromide. The *EF1 $\alpha$*  gene, a housekeeping gene, was used as a reference control in all RT-PCR experiments. All experiments were performed in triplicate (about 500 copepods in each replicate).

### 2.5. Fatty acid composition analysis

To analyze the fatty acid profiles of each developmental stage of the copepod using gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) analysis, the lipids were extracted as previously reported (Lepage and Roy, 1986), but with some modifications. Firstly, each copepod sample was ground with 2:1 (v/v) dichloromethane: methanol and incubated at room temperature for 1 h. The mixture was then filtered with filter



**Table 3**  
The fatty acid compositions of the microalgae *Tetraselmis suecica* and the three developmental stages of the cyclopoid copepod *Apocyclops royi*-TH fed with *T. suecica*.

Fatty acid	Microalgae <i>T. suecica</i>	Copepod <i>A. royi</i> -fed <i>T. suecica</i>		
		Nauplius (NP)	Copepodid (CD)	Adult (AD)
SFA				
C8:0	–	–	0.01	0.02
C10:0	–	–	0.01	0.02
C12:0	0.03	–	0.13	0.20
C13:0	0.10	–	–	–
C14:0	0.36	4.49	0.62	0.68
C15:0	–	–	0.44	0.44
C16:0	22.06	30.82	18.54	19.43
C17:0	–	3.09	–	–
C18:0	11.12	9.05	13.48	11.69
C20:0	–	–	0.13	0.19
C23:0	–	–	0.17	0.16
C24:0	–	–	1.14	1.64
ΣSFA	33.67	47.45	43.70	34.47
MUFA				
C14:1	0.39	–	–	–
C16:1	0.62	10.82	1.18	1.78
C22:2	–	–	–	–
C22:5	–	–	0.58	0.70
C18:1n-9 cis	5.62	4.17	7.09	7.04
C20:1n-9	–	–	0.55	0.52
ΣMUFA	6.63	14.99	9.40	10.04
n-3 PUFA				
C18:3n-3	21.35	–	16.76	15.97
C20:3n-3	–	1.61	0.94	1.08
C20:5n-3 (EPA)	2.21	2.63	2.56	2.49
C22:6n-3 (DHA)	–	2.78	4.57	5.47
n-6 PUFA				
C18:2n-6 cis	11.86	6.41	12.27	12.42
C18:3n-6	0.36	–	0.57	0.54
C20:2n-6	–	–	0.39	0.48
C20:3n-6	–	–	0.21	0.26
C20:4n-6 (ARA)	0.76	–	1.40	1.44
ΣSC-PUFA	33.57	6.41	36.01	28.93
ΣLC-PUFA	2.97	7.02	10.07	11.22
Σn-3 PUFA	23.56	7.02	24.83	25.01
Σn-6 PUFA	12.98	6.41	14.84	15.14
ΣPUFA	36.54	13.43	39.67	40.15

SFA: saturated fatty acid; MUFA: monounsaturated fatty acid; SC-PUFA: short-chain polyunsaturated fatty acid; LC-PUFA: long-chain polyunsaturated fatty acid ( $\geq C20$ ); n-3 PUFA: omega-3 polyunsaturated fatty acid; n-6 PUFA: omega-6 polyunsaturated fatty acid; PUFA: polyunsaturated fatty acid.

paper (No. 1, Whatman, Clifton, NJ), and 0.1 M KCl was added to the filtrate. After centrifugation, the lower (organic) phase was harvested for subsequent methylation. Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared by transesterification of the lipid extracts following the method of Lepage and Roy (1986). FAMES were collected and fatty acids were profiled commercially by GC/MS analysis service (Halal Science Center, Chulalongkorn University, Thailand).

### 3. Results

#### 3.1. Characterization of desaturase and elongation of very long fatty acids protein genes from the *A. royi*-TH transcriptome

To uncover the PUFA biosynthesis pathway of the copepod *A. royi*, the nucleotide sequences encoding the putative desaturases and elongation of very long fatty acids protein (Elovl) were retrieved from the *A. royi*-TH transcriptome (Amparyup et al., unpublished data). In this study, the full-length ORF sequences of five desaturase genes (*ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*) and eight elongase genes

(*ArElovl1*, *ArElovl2*, *ArElovl3*, *ArElovl4*, *ArElovl5*, *ArElovl6*, *ArElovl7*, and *ArElovl8*) of the copepod *A. royi* were characterized (Table 2).

Among the five desaturases, the BLASTx searches revealed that two of them (*ArD6D* and *ArD5D*) were previously known genes (Nielsen et al., 2019), while the remaining three genes, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*, were novel putative desaturase encoded enzymes (Table 2). Surprisingly, *ArD6D* displayed a high amino acid sequence similarity (76%) to *Tigriopus californicus* front-end desaturase-2 (QWC69495) that exhibited *in vitro*  $\Delta 4$  desaturase activity (Kabeya et al., 2021), while *ArD5D* showed 76% similarity to *Paracyclopina nana* delta5 desaturase (APH81338). Moreover, the primary sequence of both *ArD6D* and *ArD5D* exhibited the typical features of front-end desaturases involved in PUFA synthesis. The *ArD6D* and *ArD5D* proteins have a characteristic fused cytochrome b5-like Heme/Steroid binding domain at their N-terminus, five TMDs, and a FA\_desaturase domain (Fig. 2). Analysis of the obtained novel desaturase sequences showed that *ArD4D* displays the highest sequence similarity (86%) to *Tigriopus japonicus* delta4-desaturase (AIW65589). Interestingly, the *ArD4D* is composed of an N-terminal sphingolipid desaturase domain, four TMDs, and a C-terminal FA\_desaturase domain (Fig. 2). For *ArO3D-1*, the sequence analysis demonstrated that it exhibited 72% similarity to *T. californicus* methyl-end desaturase-1 (QWC69499), while *ArO3D-2* exhibited 73% similarity to *T. californicus* methyl-end desaturase-2 (QWC69500). The characteristics of both *ArO3D-1* and *ArO3D-2* contain a conserved domain of the methyl-end desaturase that is comprised of the respective five and six TMDs and a FA\_desaturase domain (Fig. 2).

With respect to the elongase genes, all sequences were BLASTx searched against the NCBI database. The results showed that two genes (*ArElovl4* and *ArElovl5*) have been reported previously (Nielsen et al., 2019), while the remaining six genes, including *ArElovl1*, *ArElovl2*, *ArElovl3*, *ArElovl6*, *ArElovl7*, and *ArElovl8*, are novel genes (Table 2). The BLASTx searches also revealed that *ArElovl6* showed the highest sequence similarity (78%) with the elongases-2 of *T. japonicus* (AIW65585). The cDNA sequences encoding for *ArElovl1* and *ArElovl7* were found to display 86% and 82% sequence similarity with *P. nana* elongases (APH81340), respectively, while *ArElovl2*, *ArElovl3*, and *ArElovl8* had the highest sequence similarities with *T. californicus* fatty acid elongase-2 (QWC69490; 79%), *T. californicus* fatty acid elongase-1 (QWC69489; 73%), and *T. californicus* fatty acid elongase-5 (QWC69493; 79%), respectively.

Further *in silico* analysis was conducted to predict whether these *A. royi* elongases were transmembrane proteins. The prediction showed that the *ArElovl2*, *ArElovl3*, *ArElovl4*, and *ArElovl6* encoded putative proteins with seven TMDs and an ELO domain, whereas *ArElovl1*, *ArElovl7*, and *ArElovl8* have five TMDs and an ELO domain. Additionally, *ArElovl5* contains six TMDs and an ELO domain (Fig. 3).

#### 3.2. Fatty acid analysis in the different developmental stages of *A. royi*-TH

It is well known that fatty acids have many important functions in the normal development and energy storage in copepods (Pond, 2012). Thus, the fatty acid compositions in three developmental stages (NP, CD, and AD) of *A. royi*-TH fed with the microalga *T. suecica* were examined, and the results are summarized in Table 3. In general, the fatty acids of copepods were categorized into saturated fatty acids (SFAs), comprised of 47.45%, 43.70%, and 34.47% of the total fatty acids in the NP, CD, and AD stages, respectively; monounsaturated fatty acids (MUFAs), comprised of 14.99%, 9.40%, and 10.04%, respectively; and PUFAs, comprised of 13.43%, 39.67%, and 40.15%, respectively. For MUFA, the NP stage also contained a higher level of palmitoleic acid (C16:1), at 10.82%, compared to others.

Of the overall detected PUFAs, the CD (39.67%) and AD (40.15%) stages were high in PUFAs, with omega-3 fatty acids (24.83% and 25.01%, respectively), while the NP stage (13.43%) had the lowest levels of PUFAs. Moreover, most *A. royi*-TH fed with *T. suecica* contained

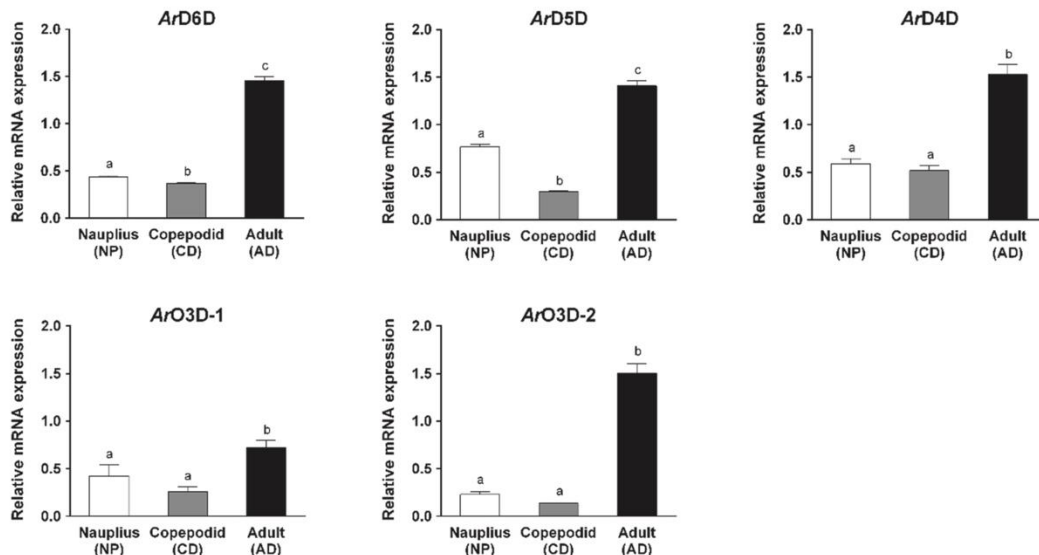


Fig. 4. Developmental expression profile of the indicated fatty acid desaturase mRNA in *A. royi*-TH. The expression profile from the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages were analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis. The elongation factor 1- $\alpha$  gene (*ArEF1 $\alpha$* ) served as an internal reference gene. Data represents the mean  $\pm$  standard deviation (error bars) of triplicate samples. Means with different lowercase letter (above each bar) are significantly different ( $P < 0.05$ ; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests).

a higher level of LC-PUFAs compared to the fatty acid content of *T. suecica*. The LC-PUFAs of each copepod stage (NP, CD, and AD stages) were 7.02%, 10.07%, and 11.22%; with a fairly high DHA (C22:6n-3) content at 2.78%, 4.57%, and 5.47%, and EPA (C20:5n-3) at 2.63%, 2.56%, and 2.49%, respectively.

### 3.3. Gene expression profiles in different developmental stages of *A. royi*-TH

Little is known about the relationship between the gene expression levels of fatty acid desaturase and elongase genes and the fatty acid composition profiles during the developmental stages in copepods. In the present study, in order to identify potential genes involved in the PUFA biosynthesis during copepod development, we analyzed their relative expression patterns in NP, CD, and AD developmental stages using sqRT-PCR (Figs. 4 and 5). The results indicated that five desaturase genes (*ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*) and four elongase genes (*ArElov14*, *ArElov15*, *ArElov16*, and *ArElov17*) were significantly up-regulated in AD compared to NP and CD stages. For *ArElov13*, the transcript level was significantly up-regulated in both the AD and CD stages compared to that for the NP. However, the transcript levels of *ArElov11*, *ArElov12*, and *ArElov18* genes were not significantly different between the three different developmental stages of *A. royi*-TH. Interestingly, the previously reported expression of *ArD5D*-TW (Nielsen et al., 2019) was not detected in *A. royi*-fed *T. suecica* in this study, even when using RT-PCR.

## 4. Discussion

Based on the nutritional value, copepods are potentially the most important live feed for marine hatcheries due to their rich content of PUFAs that have important impacts on animal health (Støttrup, 2000). To date, several studies have shown that copepods have metabolic pathways involved in the biosynthesis of fatty acid synthesis that can

produce the omega-6 and omega-3 series of LC-PUFAs (Kabeya et al., 2021; Nielsen et al., 2019, 2020, 2021; Pan et al., 2018). Understanding the molecular pathway of PUFA biosynthesis is critical for establishing strategies that allow further physiological manipulation of PUFA levels in copepods. According to Nielsen et al. (2019), *A. royi* is able to synthesize n-3 LC-PUFA using the *Elov14*, *Elov15*, *Fad  $\Delta$ 5*, and *Fad  $\Delta$ 6* enzymes. However, evidence supporting the molecular mechanisms of the PUFA biosynthesis pathway in the cyclopoid copepod *A. royi* are not completely understood.

In this study, we report the characterization of the genes involved in PUFA biosynthesis by *A. royi*-TH (the *A. royi* species/cultivar used in this study). Based on our analysis, 13 PUFA synthesis-related genes, including five desaturases (*ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*) and eight elongases (*ArElov11*, *ArElov12*, *ArElov13*, *ArElov14*, *ArElov15*, *ArElov16*, *ArElov17*, and *ArElov18*), were identified. This suggests that there are multienzyme complexes of PUFA biosynthesis in *A. royi*. These data are in agreement with those observed previously (Kabeya et al., 2021), where a complete set of multienzyme complexes composed of seven desaturases (*Fed1*, *Fed2*, *Fed3*, *Fed4*, *Fed5*,  $\omega$ 1, and  $\omega$ 2) and six elongases (*Elo1*, *Elo2*, *Elo3*, *Elo4*, *Elo5*, and *Elo6*) for LC-PUFA biosynthesis were reported in the marine harpacticoid copepod *T. californicus*.

In this study, 13 full-length ORF of three front-end desaturases (*ArD6D*, *ArD5D*, and *ArD4D*), two methyl-end desaturases (*ArO3D-1* and *ArO3D-2*), and eight elongases (*ArElov11*, *ArElov12*, *ArElov13*, *ArElov14*, *ArElov15*, *ArElov16*, *ArElov17*, and *ArElov18*) were successfully identified in *A. royi*-TH. The molecular characteristics of these genes are shown in Table 2; the results suggested that these enzymes belong to the fatty acid desaturases (*ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*) and elongases (*ArElov1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, and 8) families. Interestingly, different expression patterns of five desaturases (*ArD6D*, *ArD5D*, *ArD4D*, *ArO3D-1*, and *ArO3D-2*) and five elongases (*ArElov13*, *ArElov14*, *ArElov15*, *ArElov16* and *ArElov17*) were observed in different developmental stages of *A. royi*-TH. These transcript expression levels were down-

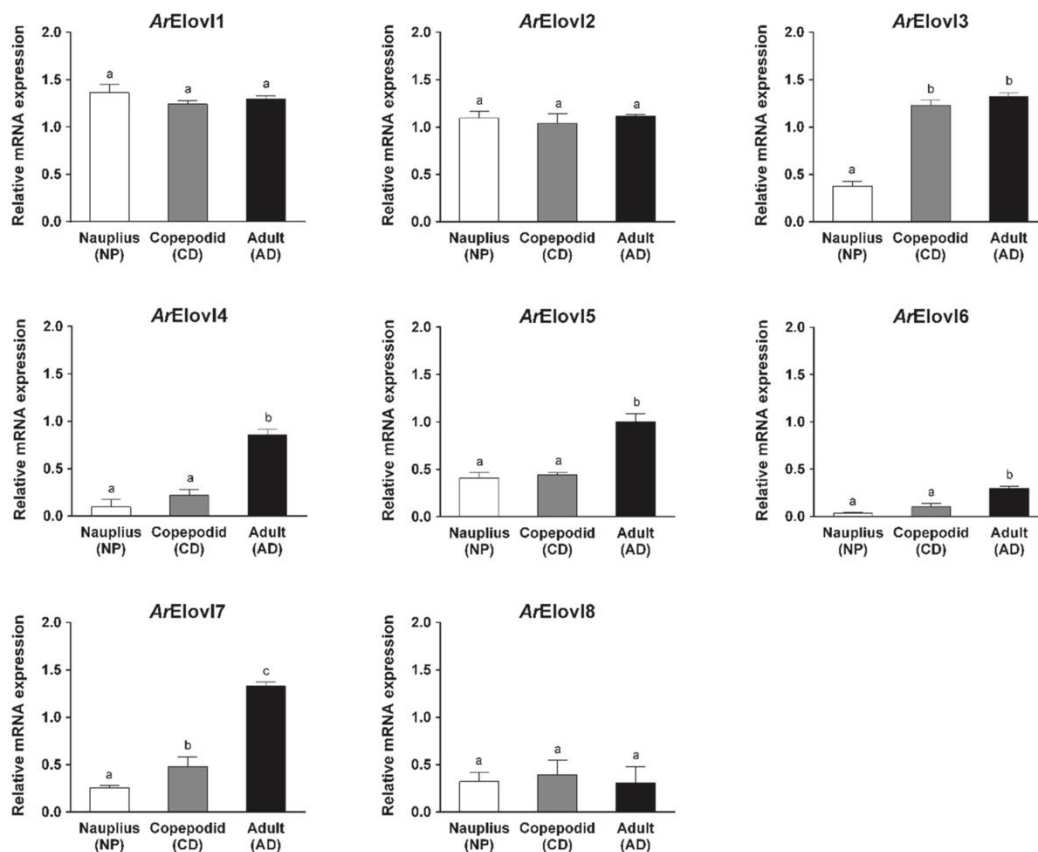


Fig. 5. Developmental expression profile of the indicated elongation of very long fatty acids protein (Elovl) mRNA in *A. royi*-TH. The expression profile from the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages were analyzed by semi-quantitative RT-PCR analysis. The elongation factor 1- $\alpha$  gene (*ArEF1 $\alpha$* ) served as an internal reference gene. Data represents the mean  $\pm$  standard deviation (error bars) of triplicate samples. Means with different lowercase letter (above each bar) are significantly different ( $P < 0.05$ ; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests).

regulated in the NP and CD developmental stages, but were up-regulated in the AD stage, except for *ArElovi3* which was up-regulated in both the AD and CD stages, suggested that these genes are the principal candidate desaturase and elongase genes for PUFA synthesis and their expression is likely to be crucial to guarantee the very high level of DHA in AD stage of *A. royi*-TH fed with *T. suecica* (lacks a DHA content).

In contrast, three elongases (*ArElovi1*, *ArElovi2*, and *ArElovi8*) showed no significant differential expression among all three developmental stages of *A. royi*-TH. However, the highly conserved nature and expression of these elongases in all three developmental stages suggests their role in the lipid biosynthetic pathway. In this research, we propose a model for PUFA biosynthesis in *A. royi* (Fig. 6), based on the analysis of their amino acid sequences for homology and gene expression profiles.

In a previous report, based on gene expression in response to diets containing a high DHA content (*Isochrysis galbana*) and a lack of DHA and EPA content (*Dunaliella tertiolecta*) (Nielsen et al., 2019), it seemed that two different desaturases ( $\Delta 6$  desaturase, a homolog of the *ArD6D*, and  $\Delta 6$  desaturase isoform 1, a homolog of the *ArD5D*) were the main genes. Thus, the typical front-end desaturase-like domain cytochrome b5 contributes to the n-3 PUFA biosynthesis.

For Fad  $\Delta 5$  of *A. royi*, transcriptome annotation from *A. royi*-TH (this

study) using the BLASTx program revealed that the *A. royi*-TH homolog of *A. royi*-TW Fad  $\Delta 5$  was not present. In order to identify Fad  $\Delta 5$  genes in *A. royi*-TH, specific primers for this gene were designed. Interestingly, Fad  $\Delta 5$  transcripts were not detected in all developmental stages of *A. royi*-TH fed with *T. suecica* (data not shown), suggesting that this gene is not directly involved in the PUFA synthesis by *A. royi*-TH, which is not congruent with that previously reported in *A. royi*-TW (the *A. royi* species/cultivar reported previously (Nielsen et al., 2019)).

The fatty acid profiles in three developmental stages of *A. royi* obtained in this study is novel and also likely to be highly important for copepod production. The fatty acid composition in *A. royi*-TH fed with *T. suecica* had a higher level of SFAs than MUFAs and PUFAs in all three developmental stages, which is in accord with previous studies on the copepod *Apocyclops dengizicus* fed with *Tetraselmis tetraethele*, which contained a higher level of SFAs (41.2%) than MUFAs (13.02%) and PUFAs (37.56%) (Farhadian et al., 2009).

Palmitic acid (C16:0) was the predominant fatty acid in all three developmental stages of *A. royi*-TH fed *T. suecica* (NP, 30.82%; CD, 18.54%; and AD, 19.43%), similar to that reported previously for *A. royi* fed with *D. tertiolecta* and *T. suecica* at 22.7% and 21.23% palmitic acid, respectively (Nielsen et al., 2019). The second most abundant fatty acid

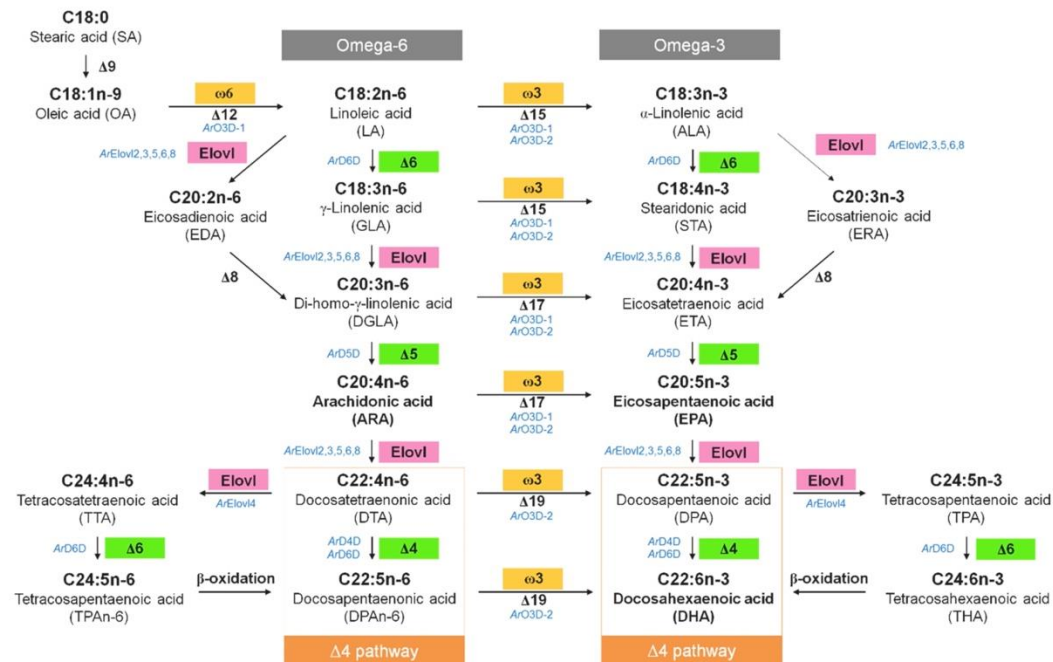


Fig. 6. Proposed biosynthesis pathway of long-chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) in the copepod *A. royi*. Desaturation reactions catalyzed by front-end desaturases (ArD6D, ArD5D, and ArD4D) and methyl-end desaturases (ArO3D-1 and ArO3D-2) are indicated by green and yellow colors, respectively. Elongation reactions mediated by elongation of very long-chain fatty acid proteins (ArElov1, ArElov2, ArElov3, ArElov4, ArElov5, ArElov6, ArElov7, and ArElov8) are indicated by pink color.

was linolenic acid (18:3n-3), which is an essential fatty acid belonging to the omega-3 fatty acids, and was highest in the CD (16.76%) and AD (15.97%) stages, but was not present in the NP stage. Compared to the PUFA values previously reported for *A. royi*-TH fed with *T. suecica* (53.37%) (Nielsen et al., 2019), the PUFA content was lower in this study (40.15%). However, a higher SC-PUFA content was found in two stages of *A. royi*-TH in the current study (CD, 36.01%; AD, 28.93%) compared to the previous study (14.79%). Although copepods can synthesize PUFAs, such as EPA and DHA, using the desaturase and elongase activities in the PUFA biosynthetic pathway, the dietary composition (fatty acid profile of algae) and culture conditions (salinity, temperature or cell density) can significantly impact on the fatty acid composition of the total lipids in copepods (Lee et al., 2017a; Rasdi et al., 2016).

The transcript expression level of ArD4D desaturase was highlighted since it exhibited an expression pattern similar to ArD6D, showing that these two genes were up-regulated in the AD stage of *A. royi*-TH fed with *T. suecica* (lacks a DHA content). This increased expression corresponded to a significant rise in the LC-PUFA composition. According to gene expression in response to nutritionally rich diets, sphingolipid  $\Delta 4$  desaturases ( $\Delta 4$  FAD) and  $\Delta 6$  FAD in the prawn *Macrobrachium nipponense* were up-regulated by linolenic acid (ALA, 18:3n-3)-rich diets (Luo et al., 2018). Similarly, the expression of  $\Delta 6$  desaturase-like genes in several crustacean species, including crab *Eriocheir sinensis* (Yang et al., 2013), *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2017), crab *Portunus trituberculatus* (Wang et al., 2014), lobster *Sagmariasus verreauxi* (Shu-Chien et al., 2017), and shrimp *Litopenaeus vannamei* (Chen et al., 2017), were also found to be nutritionally responsive genes, suggested that the role of these genes in LC-PUFA biosynthesis.

In summary, in the present study we successfully identified and

characterized a number of possible conserved desaturase and elongase genes that are likely to be involved in PUFA biosynthesis in the copepod *A. royi*. Differentially expressed genes were found between the NP/CD stages and the AD stages of *A. royi* (ArD6D, ArD5D, ArD4D, ArO3D-1, ArO3D-2, ArElov1, 4, 5, 6, and 7), although three elongases (ArElov1, ArElov2, and ArElov8) were not differentially expressed. At the same time, the high level of desaturase and elongase expression in the AD stage of copepod development, in accordance with the process of LC-PUFA accumulation, indicates that PUFA from *T. suecica* (lack DHA) is actively converted into LC-PUFA (high DHA), probably due to the high desaturase and elongase activity. However, further in-depth analysis on the *in vivo/in vitro* functional role of these enzymes in the PUFA biosynthesis pathway in *A. royi* is required to better understand the relationship between the metabolic enzyme level and fatty acid composition in copepod development, which is important in the design of dietary microalgae to improve culture methods for copepods as live feed for aquaculture hatcheries.

#### CREdIT authorship contribution statement

**Piti Amparyup:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Supakarn Sungkaew:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation. **Walaiporn Charoensapsri:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Paveena Tapaneeyaworawong:** Investigation. **Parichat Chumtong:** Investigation. **Patchari Yocawibun:** Investigation. **Prathana Pantong:** Investigation. **Ratree Wongpanya:** Formal analysis.



*P. Amparyup et al.*

*Aquaculture Reports 23 (2022) 101064*

on its expression in the hepatopancreas of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*).  
Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 165, 99–105.

## ภาคผนวก ง

## ผลงานตีพิมพ์ในวารสาร Developmental and Comparative Immunology

Developmental and Comparative Immunology 135 (2022) 104464



Contents lists available at ScienceDirect

## Developmental and Comparative Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/devcompimm](http://www.elsevier.com/locate/devcompimm)RNA-seq transcriptome analysis and identification of the theromacin antimicrobial peptide of the copepod *Apocyclops royi*Piti Amparyup<sup>a,b,\*</sup>, Supakarn Sungkaew<sup>c</sup>, Walaiporn Charoensapsri<sup>a,b</sup>, Parichat Chumtong<sup>a,b</sup>, Patchari Yocawibun<sup>a,b</sup>, Paveena Tapaneeyaworawong<sup>a,b</sup>, Ratre Wongpanya<sup>d</sup>, Chanprapa Imjongjirak<sup>c,\*</sup><sup>a</sup> Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand<sup>b</sup> Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok, 10330, Thailand<sup>c</sup> Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok, 10330, Thailand<sup>d</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Science, Kasetsart University, 50 Ngamwongwan Road, Bangkok, 10900, Thailand

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Copepod  
*Apocyclops royi*  
Transcriptome  
Antimicrobial peptide  
Theromacin

## ABSTRACT

Copepods, including *Apocyclops royi*, are small aquatic crustaceans and one of the important foods for fish and shellfish larvae. However, studies of the host-pathogen interactions and understanding of infectious disease in copepods are still very limited, yet they are likely to be a significant factor in the sustainable development of copepod aquaculture. In the present study, we performed *de novo* RNA sequence analysis of *A. royi*-TH (a Thai isolate of *A. royi*), which yielded 4.80 Gb bases of clean data and a total of 29,786 unigenes. Annotation was then performed by comparison against seven functional databases, yielding 17,617 (NR: 59.15%), 2,969 (NT: 9.97%), 15,023 (SwissProt: 50.44%), 14,543 (KOG: 48.82%), 15,077 (KEGG: 50.62%), 6,763 (GO: 22.71%), and 15,841 (InterPro: 53.18%) unigenes. In comparison to the components of the shrimp Toll pathway, LGBP, Spätzle, Toll receptors, MyD88, Pelle, TRAF6, Dorsal, and Cactus homologs were successfully identified in *A. royi*-TH. Additionally, a novel antimicrobial peptide (Theromacin-like) was characterized in *A. royi* (*ArTM*-like). The *ArTM*-like ORF was 279 bp and predicted to encode for 92 amino acid residues, with a mature peptide of 75 amino acids and a molecular mass of 8.56 kDa. The genomic organization of the *ArTM*-like gene consisted of three exons and two introns. Expression analysis indicated that *ArTM*-like mRNA was abundantly expressed in copepodid and adult stages as an immune responsive gene after infection with the pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*-(AHPND)-causing strain. Altogether, the knowledge obtained in this study will provide a basis for future functional studies of the molecular mechanisms in copepod immunity that may eventually be applied for disease prevention in copepod aquaculture.

## 1. Introduction

Copepods are a group of naturally abundant and widespread crustaceans that play central roles as the principal link between primary producers and higher consumers in aquatic ecosystems (Turner, 2004; Steinberg and Landry, 2017). The small body size, stress resistance, high nutritional value, and high energy contents of planktonic copepods are

considered to contribute to the increased performance of fish larvae fed upon them. This makes them an attractive candidate as a good live feed in marine aquaculture to substitute for or to complement conventional live feeds, such as rotifers (*Brachionus* spp.) and brine shrimps (*Artemia* spp.) (Drillet et al., 2006; Ajiboye et al., 2011; Dhont et al., 2013; Øie et al., 2015).

To date, copepods have been reported to be susceptible to infection

\* Corresponding author. Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [piti.amp@biotec.or.th](mailto:piti.amp@biotec.or.th) (P. Amparyup), [chanprapa.i@chula.ac.th](mailto:chanprapa.i@chula.ac.th) (C. Imjongjirak).

<https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104464>

Received 16 March 2022; Received in revised form 1 June 2022; Accepted 1 June 2022

Available online 6 June 2022

0145-305X/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

by bacteria (Carman and Dobbs, 1997), and the interaction between pathogenic *Vibrio* spp. and copepods, such as the colonization of the *Vibrio* bacteria to copepods to enhance their ability to survive in diverse environments and the response of copepod host to the associated *Vibrio* spp., have been documented (Huq et al., 1983; Almada and Tarrant, 2016). The innate immune system plays a significant role as the first line of host defense against microbial infection in invertebrates (Beck and Habicht, 1996; Cerenius et al., 2010). The innate defense mechanism is activated upon the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by host pattern recognition receptors (PRRs), which, in turn, activate the cellular or humoral responses, such as phagocytosis, encapsulation, prophenoloxidase system, and antimicrobial peptide (AMP) production, to destroy the invading pathogens (Loker et al., 2004; Jiravanichpaisal et al., 2006; Cerenius et al., 2010). A previous study suggested the memorizing capability of the copepod defense system in response to consecutive exposures to antigenically similar parasites (Kurtz and Franz, 2003; Kurtz, 2007). Some immune-related genes have been identified and characterized from the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*, and the cyclopoid copepod, *Paracyclopsina nana*, (Kim et al., 2014; Jeong et al., 2015a, 2015b). However, to date, little is known about the immunity and the mechanism underlying the host defense mechanisms of copepods.

The Toll pathway is regarded as one of the main signaling immune pathways and plays a key role through regulating the expression of a large set of innate immune system related genes (ISRGs), including AMPs, many small peptides with unknown functions, components of melanization cascade, and components of the clotting system (De Gregorio et al., 2002; Valanne et al., 2011; Amparyup et al., 2013; Tassanakajon et al., 2018). Recognition of PAMPs from diverse pathogens through the sensing of host PRRs triggers a proteolytic cleavage of the extracellular cytokine pro-Spätzle to Spätzle (Roh et al., 2009; Shi et al., 2009). Active Spätzle then serves as a ligand for the transmembrane receptor Toll. Dimerization of the Toll receptor recruits a pre-existing MyD88/Tube complex to recruit the kinase Pelle and TRAF6 to form a receptor complex. Pelle is then autophosphorylated and dissociated from the complex. The trimeric MyD88/Tube/TRAF6 complex then binds to the activated Toll receptor and transduces signals to the Dorsal/Cactus complex that regulates the expression of AMPs, and other significant ISRGs (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Valanne et al., 2011). In crustaceans, several PRRs and most of the homologs to the components in the Toll pathway and their function that are responsive to Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, and viral infection have been identified and characterized and are best-studied in shrimps (Li and Xiang, 2013; Tassanakajon et al., 2018). However, the components of the Toll signaling pathway that regulate innate immunity in copepods is still largely unknown.

*Apocyclops royi* is a relatively small egg-carrying copepod that belongs to the Cyclopoida order and can be found in estuaries, brackish aquaculture ponds, and in freshwater areas in subtropical and tropical regions (Chang and Lei, 1993; Su et al., 2005; Blanda et al., 2015, 2017; Amparyup et al., 2022). *Apocyclops royi* has been suggested to have a good potential as live feed in fish larviculture (Liao et al., 2001). Previous studies have shown that *A. royi* also possess lipid conversion capabilities, converting short-chained polyunsaturated fatty acids (PUFA) into the relevant essential omega-3 PUFA (Pan et al., 2018; Nielsen et al., 2019; Amparyup et al., 2022). Although the whole genome sequence and the transcriptome assembly for *A. royi* have been reported (Jørgensen et al., 2019), information on the immunity and immune-related genes are still unclear.

In the present study, we performed RNA sequencing (RNA-Seq)-based transcriptome analysis to search for the innate ISRGs/pathways from a Thai culture of the cyclopoid copepod *A. royi* (*A. royi*-TH). Based on the transcriptome analysis, several genes associated with the innate immune pathways, including the Toll and Imd signaling pathways, NOD-like receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, complement and coagulation cascades, cytosolic DNA-sensing

pathway, and RIG-I-like receptor signaling pathway, were discovered and the components of Toll signaling pathway of *A. royi*-TH were identified. Additionally, we analyzed the transcript and genomic organization of a new AMP, named Theromacin-like (*ArTM*-like), of *A. royi*-TH. The expression profiles in various developmental stages and in response to infection with the pathogenic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*-acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND)-causing strain, were examined. Knowledge of ISRGs and pathways obtained from this study will be useful to better understand the fundamental innate defense mechanism of copepods.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Copepod culture

A Thai culture of the cyclopoid copepod (*A. royi*-TH), maintained at the Center of Excellence for Marine Biotechnology, Chulalongkorn University (Bangkok, Thailand), was used in this study. Copepods were cultivated in a 5-L vessel containing sterile natural seawater (SNS) at a salinity of 25 ppt under controlled laboratory conditions at 28 °C. Copepods were fed three times a week with the algal diet *Tetraselmis* sp. To prepare samples for transcriptome analysis, three independently biologically replicated of the adult stage of *A. royi*-TH cultures were transferred to SNS for an additional 3 h to allow gut evacuation. Approximately 500 individuals from each replicate were then collected, rinsed with SNS, and immediately frozen in liquid nitrogen. All copepod samples were stored at -80 °C until RNA extraction.

### 2.2. RNA extraction, RNA sequencing (RNA-Seq), and functional annotation

Total RNA was isolated from the copepod samples using the TRIzol™ Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Genomic DNA was removed using the RNase-free DNase I (Thermo Fisher Scientific). Total RNA was quantified and assessed for the RNA Integrity Number (RIN) using a NanoDrop instrument (Thermo Fisher Scientific) and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). High-quality RNA samples with RIN scores of more than 9.0 were used for the next generation sequencing (NGS) analysis. The cDNA library was prepared from ~1 µg of total RNA and the pair-end reads with a 100 bp sequencing format was performed on the BGISEQ-500 platform at BGI, Inc. (China). The sequenced raw paired-end reads were processed to remove low-quality, adaptor-polluted, and high content of unknown base reads prior to subsequent downstream analysis. *De novo* assembly was subsequently performed using the Trinity (version 2.0.6) and Tgicl (version 2.0.6) software, as previously described (Amparyup et al., 2020). All assembled unigenes were annotated against seven functional databases: the NCBI nucleotide database (NT), the NCBI non-redundant protein database (NR), Gene ontology (GO), Eukaryotic Orthologous Groups (KOG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), SwissProt, and InterPro databases.

### 2.3. Identification of ISRGs and sequence analysis

To identify genes associated with the immune system of *A. royi*-TH, annotated unigenes clustered into the immune system pathway subcategory according to the KEGG functional annotation were retrieved from the *A. royi*-TH transcriptome. The cDNA and deduced amino acid sequences of the *A. royi*-TH ISRGs were analyzed using the Expasy program (<https://www.expasy.org>). Sequence similarities were analyzed using BLAST algorithms (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The putative signal peptide was predicted using the online SignalP 6.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>). Conserved protein structural domains were identified using the Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) online program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Transmembrane domains were predicted using



**Table 1**  
Nucleotide sequences of the primers used.

Primer	Sequence (5'-3')	Annealing temperature	Product size (bp)	Purpose
ArMacinUTR-F	CCITCTCTGCACTGAACGACTA	66	385	Full-ORF cDNA sequence and genomic organization
ArMacinUTR-R	AATTTTCGTGTGTCACGTGTGA	63		
ArTM-like-F	AAGCCAACGTCGTGAATGACT	67	165	RT-PCR analysis
ArTM-like-R	TCCTCGACAGAGGACATCTCG	68		
EF1- $\alpha$ F	GTGTTGGACAAGCTGAAGTC	64	143	RT-PCR analysis
EF1- $\alpha$ R	GGTCCAGTATCATGTCTTGATG	65		

the TMHMM software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>). Multiple amino acid and DNA sequence alignments were performed online using the Clustal Omega software (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A phylogenetic tree was constructed from the aligned amino acid sequences using the neighbour joining (NJ) method in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 10.2.6. Bootstrap trials were replicated 1000 times to obtain the confidence value for the NJ phylogeny analysis.

#### 2.4. RNA isolation and cDNA synthesis of different *A. royi*-TH developmental stages

To determine the expression level of the transcripts encoding for the ArTM-like peptide in different developmental stages of *A. royi*-TH, the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) stages of *A. royi*-TH (approximately 100 individuals for each stage and assay) were separately collected. Developmental stages of the copepods were separately collected using plankton nets and also observed under a stereomicroscope. The ranges of the body width of the NP, CD, and AD stages were 50–125  $\mu$ m, 150–225  $\mu$ m, and 250–600  $\mu$ m, respectively. The total RNA was extracted using TRIzol<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen) followed by DNase I (Promega) treatment. First-strand cDNA was synthesized with a first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) and used for RT-PCR analysis.

#### 2.5. Isolation of cDNA and genomic DNA sequences

To obtain the full-ORF cDNA sequence and the genomic organization of ArTM-like, PCR was performed. Gene specific primers (ArMacinUTR-F/-R) (Table 1) were designed based on the RNA-Seq data. The PCR conditions consisted of 94 °C for 3 min followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 3 min, and then followed by a final 72 °C for 5 min. The PCR products were purified, cloned, and commercially sequenced.

#### 2.6. Gene expression analysis

Semi-quantitative (sq)RT-PCR was performed as previously described (Amparyup et al., 2009) using the gene specific primers designed for ArTM-like (Table 1). The elongation factor 1- $\alpha$  (EF1- $\alpha$ ) gene was amplified and used as an internal reference control gene (Table 1). The PCR thermal cycling conditions were 94 °C for 1 min, then 30 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, followed by a final 72 °C for 5 min. The amplified DNA products were electrophoretically analyzed by size fraction on agarose gels (1.8%) and then stained with ethidium bromide.

#### 2.7. Temporal expression of ArTM-like transcripts after VP<sub>AHPND</sub> challenge

To assess the potential function of ArTM-like in the immune defense, quantitative real-time (qRT)-PCR was used to measure the changes in ArTM-like transcript levels in the adult stage of *A. royi*-TH after immersion challenge with the VP<sub>AHPND</sub>. For the challenge experiment, VP<sub>AHPND</sub> was cultured and prepared in tryptic soy broth (TSB)

**Table 2**  
*De novo* transcriptome assembly statistics.

	Transcripts	Unigenes
Total Number	38,582	29,786
Total Length (bp)	32,587,270	28,601,125
Mean Length (bp)	844	960
N50 (bp)	1,484	1,578
N70 (bp)	891	998
N90 (bp)	329	397
GC (%)	43.32	43.58

containing 1.5% (w/v) NaCl (TSB medium) as previously described (Chomwong et al., 2018). The bacterial suspension was poured into 50-mL culture flasks containing SNS and adjusted to a final bacterial density of  $\sim 1 \times 10^6$  cfu/mL based on prior LD<sub>50</sub> test results (data not shown). The copepods were then immersed, and samples were collected at 0, 3, 12, and 30 h post infection (hpi). For the control group, TSB medium at the same volume was added instead of the bacterial suspension. All experiments were performed in triplicate, with approximately 100 copepods/time points/replicate/group. Total RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above. The extracted total RNAs from three replicates per treatment at each time point were pooled. The qRT-PCR analysis was performed as described by Amparyup et al. (2007) using the ArTM-like-F/-R primer pair (Table 1). The EF1- $\alpha$  was amplified as the internal control and reference standard to verify the qRT-PCR reaction. Three replicates were performed for each template, and three independent replicates were utilized for each data point. The Ct values of the infected copepod samples at each time point were normalized with the control samples. The mathematical model of Pfaffl (2001) was used to determine the relative expression ratio.

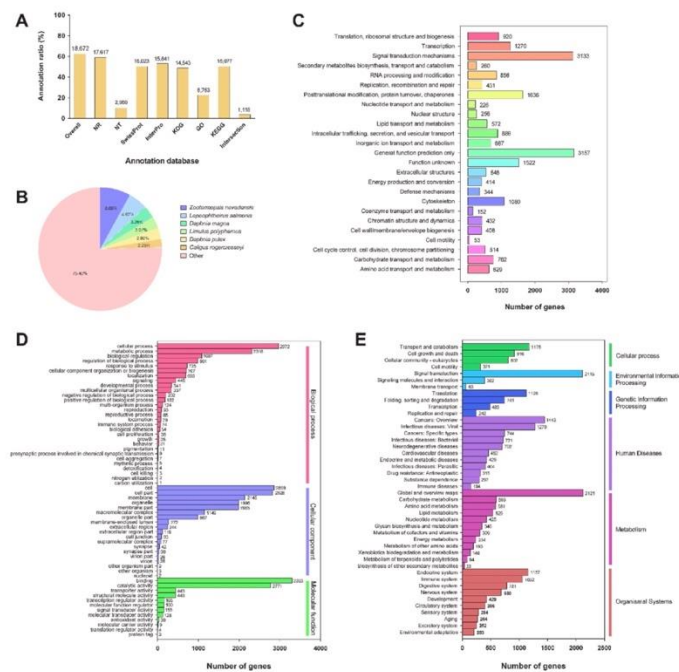
#### 2.8. Data analysis

Numerical data are presented as the mean  $\pm$  one standard deviation (SD). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Duncan's test, accepting significance at the  $p < 0.05$  level.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. RNA sequencing and *de novo* assembly of the *A. royi*-TH transcriptome

Among the high throughput technologies that have contributed to a more comprehensive understanding of functional genes, NGS via RNA-Seq is widely used for characterization of transcriptome profiles of various organisms (Wang et al., 2009; Hornett and Wheat, 2012). Transcriptomic studies using RNA-Seq can generate huge quantities of sequence information from any species of interest. Here, we report the RNA-Seq based transcriptome profiling of *A. royi*-TH fed on the green microalgae *Tetraselmis* sp. The RNA-Seq library was constructed from total RNA samples with RIN scores of more than 9.0. Using the BGISEQ-500 sequencing platform, a total of 52.47 million raw paired-end reads with a data size of 5.25 Gb were generated from *A. royi*-TH. After performing quality control by removing the low-quality



**Fig. 1.** *De novo* transcriptome analysis of the copepod *Apocyclops royi*-TH. (A) Annotation of unigenes against seven public databases: NCBI non-redundant protein database (NR), NCBI nucleotide database (NT), SwissProt, InterPro, Eukaryotic Orthologous Groups (KOG), Gene ontology (GO), and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) databases. (B) Species distribution of the BLAST top hit for the best alignment against NR database. (C) Functional distribution of KOG annotation. (D) Functional distribution of GO annotation. (E) Functional distribution of KEGG annotation.

reads, adaptor sequences, and ambiguous reads, a total of 48.05 million clean reads with the data size of 4.80 Gb was obtained. The Q20 and Q30 percentage of the clean reads was 98.01% and 91.21%, respectively. Clean reads were assembled *de novo* using the Trinity software and a total of 38,582 transcripts with a mean length and N50 of 844 bp and 1,484 bp was obtained (Table 2). The assembled transcripts were then clustered using the tgc1 software giving 29,786 unigenes with a mean length of 960 bp, N50 of 1,578 bp, and GC percentage of 43.58% (Table 2).

Although RNA-Seq mediated transcriptome studies have been reported from several copepod species, whole transcriptome analysis of the cyclopoid copepods has rarely been investigated (Lee et al., 2015; Amato and Carotenuto, 2018; Jørgensen et al., 2019). Here, we report the whole-body *de novo* transcriptome of the adult stage of *A. royi*-TH fed *Tetraseelmis* sp. using RNA-Seq analysis. Our assembled transcriptome, of about 29,786 unigenes in total, was slightly higher than the transcriptome assembly of a Taiwan culture of *A. royi* (*A. royi*-TW), which consisted of 29,737 genes (Jørgensen et al., 2019). The number of assembled unigenes identified from this study was also higher than that reported for the cyclopoid copepod *P. nana*, which consisted of 12,474 identified genes (Lee et al., 2015). The difference among the unigene number may attribute to the different of filtering parameters and the quality of transcriptome assembly.

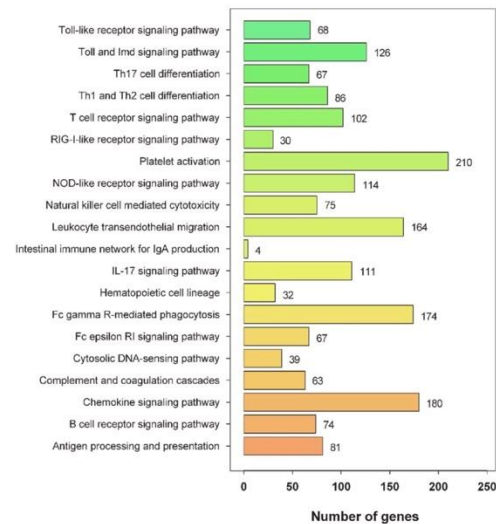
**3.2. Functional annotation of the *A. royi*-TH transcriptome**

The unigenes obtained by transcriptome sequencing of *A. royi*-TH were compared with seven functional databases: NR, NT, SwissProt, KEGG, KOG, InterPro, and GO. A total of 18,672 (62.69%) unigenes were functionally annotated in at least one functional database, while 1,118 unigenes occupied 3.75% of all annotated genes coexisted in all

seven databases (Fig. 1A). A total of 17,617 (59.15%), 2,969 (9.97%), 15,023 (50.44%), and 15,841 (53.18%) unigenes were matched to the NR, NT, SwissProt, and InterPro databases respectively. The majority of significant hits of *A. royi*-TH based on the NR functional annotation was with *Zootermopsis nevadensis* 8.00% (1,409 unigenes), followed by *Lepocephalus salmoneus* 4.97% (876 unigenes), *Daphnia magna* 3.35% (591 unigenes), *Limulus polyphemus* 3.07% (540 unigenes), *Daphnia pulex* 2.92% (515 unigenes), and *Caligus rogercresseyi* 2.23% (393 unigenes) (Fig. 1B). A total of 14,543 (48.82%) unigenes showed significant homologies to genes distributed across 25 categories in the KOG database (Figs. 1C), 6,763 (22.71%) unigenes were annotated and grouped into the three major GO categories of biological process, cellular component, and molecular function (Fig. 1D). A total of 15,077 (50.62%) unigenes were annotated and clustered into the six major KEGG metabolic categories of cellular processes, environmental information processing, genetic information processing, human diseases, metabolism, and organismal systems (Fig. 1E).

In this study, the whole-body transcriptome of *A. royi*-TH was successfully annotated with the highest BLAST hit (59.15%) with the nr protein database. This percentage was higher than the previous reports from the calanoid copepods *Calanus sinicus* (44% BLASTx; Ning et al., 2013), *Calanus finmarchicus* (40% BLASTx; Lenz et al., 2014), *Acartia tonsa* (47.5% BLASTx; Zhou et al., 2018), and the cyclopoid copepod *P. nana* (32% BLASTx; Lee et al., 2015). Moreover, the BLAST top hit species distribution result, that were shown to belong to the group of arthropod species, was also in accord with the previous reports from other copepods including *A. tonsa*, *T. japonicus*, *Tigriopus kingsejongensis*, and *P. nana* (Kim et al., 2015, 2016; Lee et al., 2015; Zhou et al., 2018). This finding may indicate the phylogenetic relationship and available genomic information among these species.

Based on KOG, GO, and KEGG annotations, the *A. royi*-TH unigenes



**Fig. 2.** The discovery of the KEGG-annotated immune system pathways in *A. royi*-TH. A total of 1,052 unigenes were grouped into 20 pathways of the immune system subcategories of the KEGG metabolic pathway. The X-axis represents the number of unigenes. The Y-axis represents the KEGG immune system pathway. Numbers represent the number of unigenes in each pathway.

could be assigned into 25 KOG functional class, three major GO categories, and six KEGG functional groups similar to the previous reported transcriptomes from the copepod *A. tonsa* and *P. nana* (Lee et al., 2015; Zhou et al., 2018). This results could presumably suggest the similar coverage among these transcriptomes. The obtain transcriptomic data provided a useful resource for further genomic studies of copepods.

### 3.3. Analysis of ISRGs from *A. royi*-TH

Based on the KEGG functional annotation, we identified 1,052 ISRGs from the transcriptome of *A. royi*-TH (Fig. 2, supplementary Table S1). Among these, 126 genes were found to be assigned to the Toll and Imd signaling pathway, 114 unigenes to the NOD-like receptor signaling pathway, 68 unigenes to the Toll-like receptor signaling pathway, 63 unigenes to the Complement and coagulation cascades, 39 unigenes to the Cytosolic DNA-sensing pathway, and 30 unigenes to the RIG-I-like receptor signaling pathway.

Copepods are among the most diverse group of crustaceans that crucial for both freshwater and marine environments (Humes, 1994). Previous studies have claimed the primitive immune response in copepods (Huq et al., 1983; Kurtz and Franz, 2003; Kurtz, 2007). Nevertheless, a later study showed that the conserved innate immunity observed among other crustacean and arthropod species exists in copepods (Kim et al., 2014). However, the potential innate defense system of copepods has rarely been studied. In this study, the annotated unigenes displayed high similarity with the ISRGs of other animals and classified as member of several innate immune pathways were identified from the RNA-Seq data of *A. royi*-TH. This obtain data will help us to further shed insight on investigation of the innate immune mechanism of copepod *A. royi*-TH.

**Table 3**

Putative genes involved in Toll signaling pathway of the copepod *A. royi*-TH.

Genes name	Closest gene/species to Penaeid shrimp	GenBank accession no.	E-Value (% similarity)
<b>LPS and <math>\beta</math>-1,3-glucan binding protein (LGBP)</b>			
<i>Ar</i> LGBP	beta-1,3-glucan binding protein/ <i>Litopenaeus vannamei</i>	ROT75247.1	8e-109 (66%)
<b>Spätzle</b>			
<i>Ar</i> Spätzle-like	protein spaetzle 3-like/ <i>Penaeus monodon</i>	XP_037775834.1	3e-96 (67%)
<b>Toll receptors</b>			
<i>Ar</i> Toll1	<i>Lv</i> Toll1/ <i>L. vannamei</i>	ROT76543.1	3e-19 (46%)
<i>Ar</i> Toll2	<i>Lv</i> Toll2/ <i>L. vannamei</i>	AEK86516.1	1e-16 (49%)
<i>Ar</i> Toll3	<i>Lv</i> Toll3/ <i>L. vannamei</i>	ROT74583.1	2e-24 (60%)
<b>Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)</b>			
<i>Ar</i> MyD88	<i>Fc</i> MyD88/ <i>Fenneropenaeus chinensis</i>	AFU61120.1	8e-32 (50%)
<b>Pelle</b>			
<i>Ar</i> Pelle	<i>Lv</i> Pelle/ <i>L. vannamei</i>	AEK86521.1	1e-45 (57%)
<b>Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6)</b>			
<i>Ar</i> TRAF6	<i>Pm</i> TRAF6/ <i>P. monodon</i>	AIS92907.1	3e-28 (51%)
<b>NF-<math>\kappa</math>B transcription factor</b>			
<i>Ar</i> Dorsal	<i>Fc</i> Dorsal/ <i>F. chinensis</i>	ACJ36225.1	5e-90 (67%)
<i>Ar</i> Cactus-like	<i>Pm</i> Cactus-like/ <i>P. monodon</i>	XP_037784002.1	1e-41 (56%)

### 3.4. Immune molecules in the *A. royi*-TH toll signaling pathway

The Toll signaling pathway plays essential roles in the innate immune defense against microbial infection in both vertebrates and invertebrates. However, the components of the Toll signaling pathway that regulate innate immunity in copepods is still largely unknown. With the application of high-throughput RNA-Seq, in this study several homologs to components of the shrimp Toll pathway were identified from the copepod *A. royi*-TH (Table 3).

The lipopolysaccharide (LPS) and beta-1,3-glucan binding proteins (LGBPs) are a group of PRRs that function to recognize the unique patterns of PAMPs and result in the widespread innate immune activation (Janeway and Medzhitov, 2002; Tassanakajon et al., 2018). In the present study, the *Ar*LGBP was identified from *A. royi*-TH, and found to share a high sequence similarity (66%) with the LGBP of the shrimp *Litopenaeus vannamei* (Table 3). Spätzle is a cytokine-like molecule that acts as a ligand for the Toll signaling pathway in invertebrates (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Li and Xiang, 2013; Tassanakajon et al., 2018; Valanne et al., 2011). In this study, *Ar*Spätzle-like transcripts were identified in *A. royi*-TH and showed 67% similarity with spaetzle 3-like from the shrimp *Penaeus monodon* (Table 3).

Toll receptors are transmembrane proteins that bind to the active Spätzle, but not to PAMPs, and activate the Toll pathway in invertebrates (Ligoxygakis et al., 2002; Gobert et al., 2003). In this study, we identified three Toll genes (*Ar*Toll1, *Ar*Toll2, and *Ar*Toll3) from *A. royi*-TH (Table 3), where *Ar*Toll1, 2 and 3 shared 46%, 49%, and 60% similarity with *Lv*Toll1, 2, and 3, respectively, from the shrimp *L. vannamei*. The myeloid differentiation factor 88 (MyD88) is an adapter molecule that plays key roles by linking members of the toll receptor to the downstream components to activate the related Toll signaling pathways (Lemaitre and Hoffmann, 2007; Li and Xiang, 2013; Tassanakajon et al., 2018; Valanne et al., 2011). In the present study, a homolog of MyD88 (*Ar*MyD88) was identified from *A. royi*-TH that shared 50% similarity with *Fc*MyD88 from the shrimp *Fenneropenaeus chinensis* (Table 3).

Pelle is a kinase in the Toll pathway that not only forms a receptor complex with MyD88 and Tube but also associates with the tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6), a Toll pathway component downstream of Pelle, and participates in downstream signal transduction with the NF- $\kappa$ B family proteins for immune gene regulations (Janssens and Beyaert, 2003; Wang et al., 2011). In this

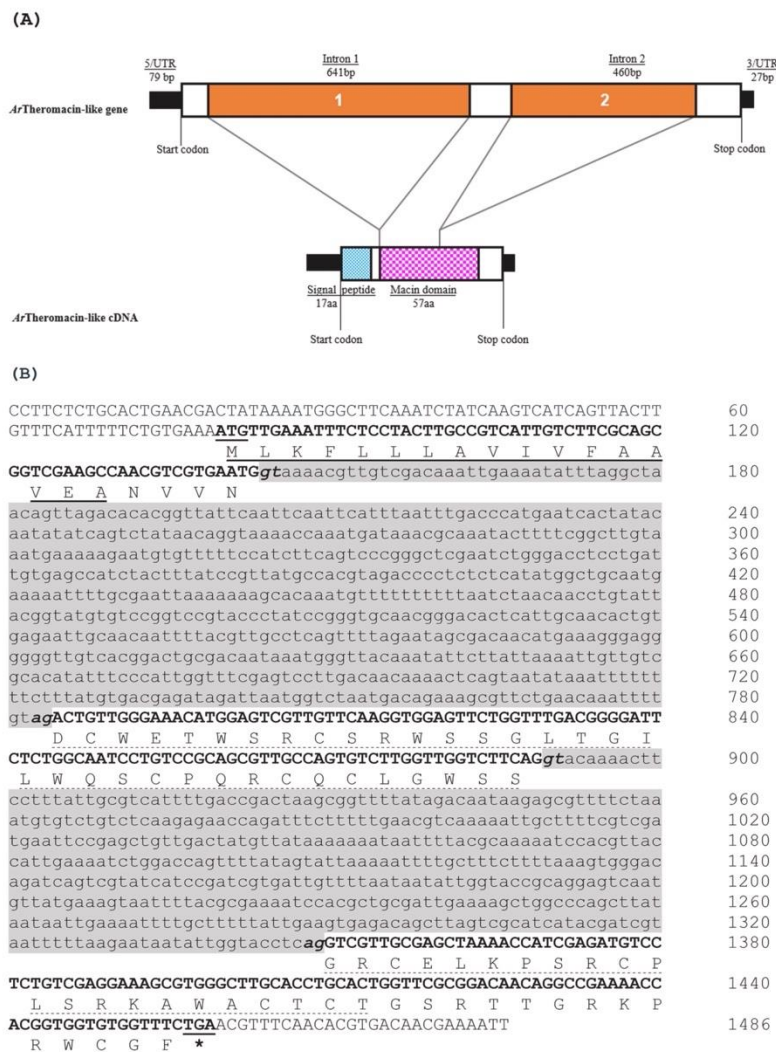


Fig. 3. (A) Genomic organization and (B) the full-ORF sequences of theromacin-like (*ArTM*-like) from *A. royi*-TH. Coding nucleotides and deduced amino acids of each exon are capitalized. Introns are shaded and illustrated with lowercase letters. Signal peptide is underlined. Bold italic letters indicate the intron dinucleotide acceptor and donor sites for RNA splicing. The Macin domain is shown by the dash line.

study, we identified a homolog of Pelle (*ArPelle*) and TRAF6 (*ArTRAF6*) from *A. royi*-TH (Table 3), where *ArPelle* shared 57% similarity with *LvPelle* from the shrimp *L. vannamei*, *ArTRAF6* shared 51% similarity with *PmTRAF6* from the shrimp *P. monodon* (Table 3).

Dorsal is a member of the Rel/NF- $\kappa$ B family of transcription factors. It is present in the cytosol and forms a complex with the cytoplasmic inhibitor Cactus, a homolog of the mammalian I $\kappa$ B proteins (Steward, 1987). After activation by the Toll pathway, Cactus is degraded and Dorsal is then translocated into the nucleus to regulate the transcription of AMP genes (Lemaître and Hoffmann, 2007). In this study, the Dorsal

and Cactus homologs, *ArDorsal* and *ArCactus*-like, were identified in *A. royi*-TH (Table 3). *ArDorsal* shared 67% similarity with *FcDorsal* from the shrimp *F. chinensis*, while *ArCactus*-like shared 56% similarity with *PmCactus*-like from the shrimp *P. monodon*.

As mentioned, the Toll signaling pathway cascades have been well studied in shrimps (Tassanakajon et al., 2018) and confirmed to play an important role in the innate defense against pathogens. Many genes related to Toll pathway have been reported from crabs *Scylla paramamosain* (Lin et al., 2012; Li et al., 2013a; Chen et al., 2018) and *Eriocheir sinensis* (Li et al., 2013b; Yu et al., 2013, 2014; Huang et al.,

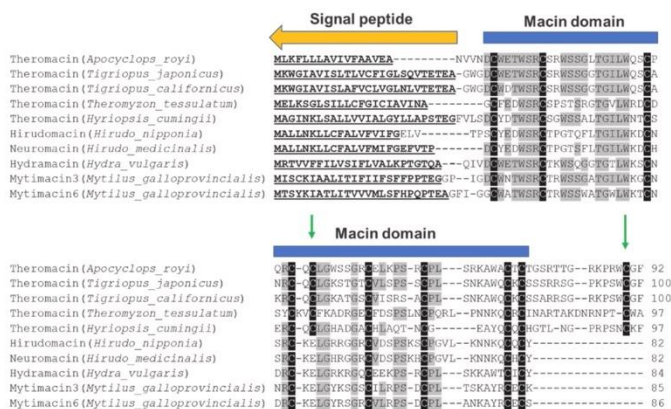


Fig. 4. Multiple alignment of the deduced amino acid sequence of theromacin-like (ArTM-like) from *A. royi*-TH with the other macin protein family sequences. The amino acid sequence of the theromacin from the copepods *A. royi*, *Tigriopus japonicus* (GCHA010 02008), and *Tigriopus californicus* (JW506446), the leech *Theromyzon tessulatum* (AAR12065), the mussel *Hyriopsis cumingii* (ADK94899), the hirudomacin from the leech *Hirudo nipponia* (QBK51064), the neuromacin from the leech *Hirudo medicinalis* (ABW97519), the hydrumacin from the polyp *Hydra vulgaris* (B3RFR8), and the mytilimacin3 and mytilimacin6 from *Mytilus galloprovincialis* (CCC15017 and AHG59339, respectively), were collectively compared. Grey indicates conservation in five or more species. The predicted signal peptides are in bold and underlined. The eight conserved cysteine residues are boxed. Arrow indicates the two additional cysteine residues of theromacin.

2014), lobster *Homarus americanus* (Clark, 2014), and the ectoparasite copepod *Caligus rogercresseyi* (Valenzuela-Munoz and Gallardo-Escárate, 2014). The discovery of several components of the Toll pathway (LGBP/Spätzle/Toll/MyD88/Pelle/TRAF6/Dorsal/Cactus) from *A. royi*-TH transcriptome likely suggest the existence of Toll pathway in the cyclopoid copepod *A. royi*.

3.5. Molecular characterization of the theromacin-like AMP of *A. royi*

The AMPs are one class of essential molecules in the innate immune defense against pathogen infection (Zhang and Gallo, 2016). In the present study, we identified a Theromacin-like transcript (*ArTM*-like) from the *A. royi*-TH RNA-Seq data which showed a high amino acid sequence similarity (65–74%) to the AMP belonging to the macin family. To obtain the full-length ORF sequence of *ArTM*-like, RT-PCR was performed. The complete nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of *ArTM*-like are shown in Fig. 3. The full length ORF of *ArTM*-like was 279 bp and encoded for a predicted polypeptide of 92 amino acids with a putative signal peptide of 17 amino acid residues and a mature protein of 75 amino acids. The calculated molecular mass and isoelectric point of the mature protein was 8.56 kDa and 9.44, respectively. The analysis of its genomic organization showed that the *ArTM*-like gene consists of three exons (143 bp, 105 bp, and 137 bp) and two introns (641 bp and 460 bp) (Fig. 3). The donor and acceptor exon/intron splice junctions of *ArTM*-like gene conformed to the GT/AG rule.

A BLAST search revealed that *ArTM*-like shared high predicted amino acid sequence similarities of 74%, 71%, and 58% to theromacin (Mollusca; *Hyriopsis cumingii*), hydrumacin-1 (*Hydra*; *Hydra vulgaris*), and neuromacin (Annelida; *Hirudo medicinalis*), respectively. As expected, a macin domain of *ArTM*-like peptide was predicted to be located between Asp<sub>22</sub> and Thr<sub>78</sub> based on the SMART analysis. The macin family is a member of the cysteine-rich AMPs. To date, several macin peptides have been found to exhibit antimicrobial activities (theromacin and hydrumacin) and a nerve repair activity (neuromacin) has also been reported and characterized (Jung et al., 2012).

The predicted amino acid sequences of the *ArTM*-like peptide were compared within the macin family (theromacin, neuromacin, and hydrumacin), which revealed 10 conserved cysteine residues in the mature *ArTM*-like peptide that possibly participated in disulfide bond formation (Fig. 4). Generally, macin family peptides, including hydrumacin and neuromacin, are comprised of eight conserved cysteine residues (Tasiemski et al., 2004). However, theromacin also contains two

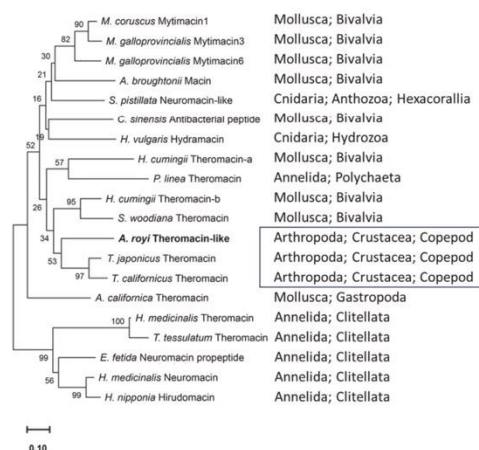
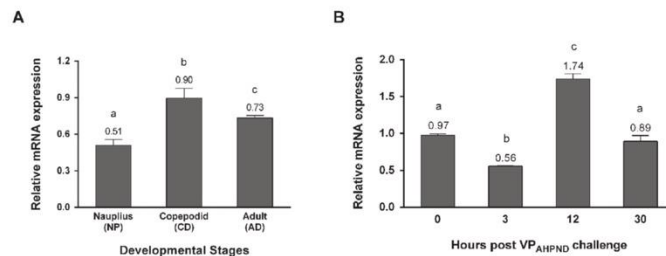


Fig. 5. Phylogenetic analysis of *ArTM*-like with other macins. The amino acid sequence based phylogenetic tree was constructed using the NJ method with the MEGA X software. Bootstrap sampling was performed using 1,000 replicates. *Anadara broughtonii* macin (AFQ02694), *Aplysia californica* theromacin (ABF21076), *Cyclina sinensis* antibacterial peptide (AFI24614), *Eisenia fetida* neuromacin propeptide (AKO70613), *Hirudo medicinalis* neuromacin (ABW97519) and theromacin (ABV56569), *Hirudo nipponia* hirudomacin (QBK51064), *Hydra vulgaris* hydrumacin (B3RFR8), *Hyriopsis cumingii* theromacin-a (ADK94899) and theromacin-b (AEC50045), *Mytilus coruscus* mytilimacin1 (QXT26520.1), *Mytilus galloprovincialis* mytilimacin3 (CCC15017) and mytilimacin6 (AHG59339), *Perinereis lineata* theromacin (QAU32334), *Siniodonta woodiana* theromacin (AIA62156), *Stylophora pistillata* neuromacin-like (XP\_022810619), *Theromyzon tessulatum* theromacin (AAR12065), *Tigriopus japonicus* (GCHA01002008), and *Tigriopus californicus* (JW506446).

additional cysteine residues. Based on consensus identification of cysteine residues, the *ArTM*-like peptide has a higher similarity to theromacin than to neuromacin and hydrumacin, supporting that *ArTM*-like is similar to theromacin.

To compare *ArTM*-like with other members of the macin family (theromacin, neuromacin, and hydrumacin), a phylogenetic tree was



**Fig. 6.** Expression analysis of *ArTM*-like mRNA in *A. royi*-TH. (A) Developmental expression profile of *ArTM*-like mRNA in the NP, CD, and AD stages; as analyzed by sqRT-PCR analysis. (B) Relative mRNA expression profiles of *ArTM*-like transcripts at 0, 3, 12, and 30 hpi with VP<sub>AHPND</sub> of *A. royi*-TH, as analyzed by qRT-PCR. The *ArEF1 $\alpha$*  gene served as an internal reference gene. Data are shown as the mean  $\pm$  SD (error bars) of triplicate samples. Means with a different lowercase letter (above each bar) are significantly different ( $P < 0.05$ ; one-way ANOVA with Duncan's multiple range tests).

constructed using the NJ distance-based method to compare the amino acid sequences of the macin family. Based on this phylogenetic tree analysis, the macin family can be classified into the two major groups of (1) the macin family of Clitellata and (2) the macin family of shellfish (Crustacean, shellfish, and mollusk shellfish), Cnidarians (Anthozoa and Hydrozoa), and Polychaeta. The bootstrapped NJ tree of the macin family (Fig. 5) suggests that *ArTM*-like is more closely linked to the putative theromacins of the copepods *T. japonicus* (GCHA01002008) and *T. californicus* (JW506446) and related to the theromacins from the Mollusca *Hyriopsis cumingii* (AEC50045) and *Sinanodonta woodiana* (AIA62156). Moreover, *ArTM*-like was clustered in close proximity to the shellfish, Cnidarians, and Polychaeta subgroup and is clearly distinct from the Clitellata macins.

### 3.6. Expression profiles of *ArTM*-like transcripts at different developmental stages of *A. royi*-TH

To examine the transcript level of *ArTM*-like in the different developmental stages of *A. royi*-TH, sqRT-PCR was performed using the cDNAs from the nauplius (NP), copepodid (CD), and adult (AD) developmental stages. The internal control, EF-1 $\alpha$  mRNA, was detected in all samples (Fig. 6A) and was used to normalize the *ArTM*-like expression levels. The *ArTM*-like mRNA was expressed in all three copepod stages, but the highest expression level was detected in the CD stage followed by the AD stage (Fig. 6A), while lower expression levels were observed in the NP stage. Thus, the main role of *ArTM*-like is potentially in the CD and AD stages of *A. royi*.

To date, AMPs have not yet been reported in copepods. In other crustaceans, several AMPs have been reported and are well characterized in shrimps, crabs, lobsters, and crayfish (such as crustins, penaeidins, antilipoplysaccharide factor, and Stylicins). However, based on the transcriptome and genome databases of *A. royi*, no homologs of those AMP sequences have been detected in copepods, except for *ArTM*-like in this study. In the crustacean *Daphnia pulex*, some components of the immune system (Toll pathway) have been discovered using the complete genome sequence data, but AMPs were not detected (McTaggart et al., 2009).

In shrimps, the expression patterns of two AMPs (penaeidin and crustin) during larval development have been elucidated. Penaeidin mRNA transcripts were detected at very low levels at all early larval stages and at high levels in the hemocytes of adult shrimps. However, the crustin expression level did not seem to change dramatically at all development stages (Jiravanichpaisal et al., 2007). In *Marsupenaeus japonicus*, Stylicin transcripts were detected in all the early developmental stages from fertilized eggs to post-larvae of 17 days (PL17) (Liu et al., 2015). Here, we report the expression profile of *ArTM*-like gene transcripts during different developmental stages and the result suggest that *ArTM*-like is likely to function as the host endogenous AMP in the late stages of *A. royi* development. Because AMPs are considered to be the major immune molecules involved in combating pathogens (Tassanakajon et al., 2013), a high mRNA expression level of AMPs in specific

stages might imply an essential role of *ArTM*-like in the innate immune defenses of *A. royi*-TH and so potentially in copepods.

### 3.7. Expression of the *ArTM*-like genes after bacterial challenge

To elucidate the potential involvement of *ArTM*-like expression in copepod immune defense, the response of *ArTM*-like transcript to infection with the Gram-negative VP<sub>AHPND</sub> was investigated by qRT-PCR. The relative expression level of the *ArTM*-like mRNA in VP<sub>AHPND</sub>-challenged *A. royi*-TH is shown in Fig. 6B. The expression of *ArTM*-like was rapidly down-regulated at 3 hpi and significantly up-regulated at 12 hpi (1.78-fold compared with the relative expression level at 0 hpi) and then returned to the origin level at 30 hpi. This temporal fluctuation of *ArTM*-like mRNA expression during the progress of the VP<sub>AHPND</sub> infection suggest that *ArTM*-like may be involved in the direct defense against the invasion of bacterial pathogens in copepods. A similar expression profile has been observed for theromacin mRNAs in the annelid leech *Theromyzon tessulatum* (Tasiemski et al., 2004) and in the Asian polychaeta *Perinereis lineata* (Joo et al., 2020), where the transcripts increased after challenge with either killed bacteria or LPS. In addition, in other crustaceans, the induced expression of crustins (cysteine-rich AMPs) has been reported. For instance, crustins in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (LvCrustinB) and *Penaeus monodon* (PmCrus-like) were upregulated post-challenge with *V. parahaemolyticus* (Li et al., 2019) and *V. harveyi* (Amparyup et al., 2008). Although the up-regulation among these AMP genes was detected at different times of infection, the discrepancy may be due to the different between the virulence of the pathogens and the specificity and complexity of the host immune responses. Collectively, our results support that *ArTM*-like is involved in the immune defense system of copepods (or at least *A. royi*-TH), and appears to be an ISRG since its expression level is up-regulated after VP<sub>AHPND</sub> infection.

In summary, our study reports the whole transcriptome for *A. royi*-TH fed on green microalgae (*Tetraselmis* sp.) using the BGISEQ-500 sequencing platform. The transcriptome yielded a set of 38,582 transcripts that could be clustered into 29,786 unigenes. Downstream analyses of the *A. royi*-TH transcriptome identified for the first time several components of the Toll signaling cascade, including ArLGBPs, ArSpätzle-like, ArToll (ArToll1, ArToll2, and ArToll3), ArMyD88, ArPelle, ArTRAF6, ArDorsal, and ArCactus-like, indicating that the Toll pathway likely exists in copepods and may play a role in regulating their immune response to microbial infections. Moreover, a theromacin-like transcript (*ArTM*-like), which displays a high amino acid sequence similarity to the macin family of AMPs, was first identified from the copepod *A. royi*-TH RNA-Seq data. The *ArTM*-like transcripts were increased in the CD and AD stages and is an ISRG that is up-regulated after VP<sub>AHPND</sub> infection. Overall, all the data provide strong evidence that will greatly help to understand the fundamental innate defense mechanism of copepods, but more solid functional studies should be done in the future.



- metabolism. *Comp. Comp. Biochem. Physiol. D-Genomics Proteomics* 15, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2015.04.002>.
- Lemaitre, B., Hoffmann, J., 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Lenz, P.H., Roncalli, V., Hassett, R.P., Wu, L.S., Cieslak, M.C., Hartline, D.K., Christie, A. E., 2014. *De novo* assembly of a transcriptome for *Calanus finmarchicus* (Crustacea, Copepoda)—the dominant zooplankton of the North Atlantic Ocean. *PLoS One* 9, e88589. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088589>.
- Li, F., Xiang, J., 2013. Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 973–980. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.08.023>.
- Li, X.C., Zhang, X.W., Zhou, J.F., Ma, H.Y., Liu, Z.D., Zhu, L., Yao, X.J., Li, L.G., Fang, W. H., 2013a. Identification, characterization, and functional analysis of Tube and Pelle homologs in the mud crab *Scylla paramamosain*. *PLoS One* 8, e76728. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076728>.
- Li, X., Cui, Z., Liu, Y., Song, C., Shi, G., 2013b. Transcriptome analysis and discovery of genes involved in immune pathways from hepatopancreas of microbial challenged mitten crab *Eriocheir sinensis*. *PLoS One* 8, e68233. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068233>.
- Li, M., Ma, C., Zhu, P., Yang, Y., Lei, A., Chen, X., Liang, W., Chen, M., Xiong, J., Li, C., 2019. A new crustin is involved in the innate immune response of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 94, 398–406. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.09.028>.
- Liao, L.C., Su, H.M., Chang, E.Y., 2001. Techniques in finfish larviculture in Taiwan. *Aquaculture* 200, 1–31. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00692-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00692-5).
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., Reichhart, J.M., 2002. Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* 297, 114–116. <https://doi.org/10.1126/science.1072391>.
- Lin, Z., Qiao, J., Zhang, Y., Guo, L., Huang, H., Yan, F., Li, Y., Wang, X., 2012. Cloning and characterisation of the SpToll gene from green mud crab, *Scylla paramamosain*. *Dev. Comp. Immunol.* 37, 164–175. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.09.003>.
- Liu, H.T., Wang, J., Mao, Y., Liu, M., Niu, S.F., Qiao, Y., Su, Y.Q., Wang, C.Z., Zheng, Z.P., 2015. Identification and expression analysis of a novel stlycin antimicrobial peptide from Kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). *Fish Shellfish Immunol.* 47, 817–823. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.09.044>.
- Loker, E.S., Adema, C.M., Zhang, S.M., Kepler, T.B., 2004. Invertebrate immune systems—not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunol. Rev.* 198, 10–24. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.0117.x>.
- McTaggart, S.J., Conlon, C., Colbourne, J.K., Blaxter, M.L., Little, T.J., 2009. The components of the *Daphnia pulex* immune system as revealed by complete genome sequencing. *BMC Genom.* 10, 175. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-175>.
- Nielsen, B.L.H., Gutterup, L., Jørgensen, T.S., Hansen, B.W., Hansen, L.H., Mortensen, J., Jepsen, P.M., 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. *Biol. Open* 8. <https://doi.org/10.1242/bio.038331> bio038331.
- Ning, J., Wang, M., Li, C., Sun, S., 2013. Transcriptome sequencing and *de novo* analysis of the copepod *Calanus sinicus* using 454 GS FLX. *PLoS One* 8, e63741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063741>.
- Oie, G., Galloway, T., Soroy, M., Hansen, M.H., Norheim, I.A., Halseth, C.K., Almli, M., Berg, M., Gagnat, M.R., Wold, P.A., Attramadal, K., Hagemann, A., Evjemo, J.O., Kjorsvik, E., 2015. Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. *Aquacult. Nutr.* 23, 3–17. <https://doi.org/10.1111/anu.12352>.
- Pan, Y.J., Sadvovskaya, I., Hwang, J.S., Souissi, S., 2018. Assessment of the fecundity, population growth and fatty acid composition of *Apocyclops royi* (Cyclopoida, Copepoda) fed on different microalgal diets. *Aquacult. Nutr.* 24, 970–978. <https://doi.org/10.1111/anu.12633>.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Roh, K.B., Kim, C.H., Lee, H., Kwon, H.M., Park, J.W., Ryu, J.H., Kurokawa, K., Ha, N.C., Lee, W.J., Lemaitre, B., Söderhäll, K., Lee, B.L., 2009. Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *J. Biol. Chem.* 284, 19474–19481. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.007419>.
- Shi, X.Z., Zhang, R.R., Jia, Y.P., Zhao, X.F., Yu, X.Q., Wang, J.X., 2009. Identification and molecular characterization of a Spätzle-like protein from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Fish Shellfish Immunol.* 27, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.07.005>.
- Steinberg, D.K., Landry, M.R., 2017. Zooplankton and the ocean carbon cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9, 413–444. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-010814-015924>.
- Steward, R., 1987. Dorsal, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene. *c-rel*. *Science* 238, 692–694. <https://doi.org/10.1126/science.3118464>.
- Su, H.M., Cheng, S.H., Chen, T.L., Su, M.S., 2005. Culture of copepods and applications to marine finfish larval rearing in Taiwan. In: Lee, C.S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 183–194. <https://doi.org/10.1002/978047027522.ch14>.
- Tasiemski, A., Vandenbulcke, F., Mitta, G., Lemoine, J., Lefebvre, C., Sautière, P.E., Salzet, M., 2004. Molecular characterization of two novel antibacterial peptides inducible upon bacterial challenge in an annelid, the leech *Theromyzon tessulatam*. *J. Biol. Chem.* 279, 30973–30982. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312156200>.
- Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S., 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 954–967. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>.
- Tassanakajon, A., Rimpphanitchayakit, V., Visetnan, S., Amparyup, P., Somboonwiwat, K., Charoensapri, W., Tang, S., 2018. Shrimp humoral responses against pathogens: antimicrobial peptides and melanization. *Dev. Comp. Immunol.* 80, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.05.009>.
- Turner, J.T., 2004. The importance of small planktonic copepods and their roles in pelagic marine food webs. *Zool. Stud.* 43, 255–266.
- Valanne, S., Wang, J.H., Rämets, M., 2011. The *Drosophila* toll signaling pathway. *J. Immunol.* 186, 649–656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>.
- Valenzuela-Muñoz, V., Gallardo-Escárate, C., 2014. TLR and IMD signaling pathways from *Callinectes rogersesseyi* (Crustacea: copepoda): *In silico* gene expression and SNPs discovery. *Fish Shellfish Immunol.* 36, 428–434. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.019>.
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
- Wang, P.H., Wan, D.H., Gu, Z.H., Deng, X.X., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G., 2011. *Litopenaeus vannamei* tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) responds to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus (WSSV) infection and activates antimicrobial peptide genes. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.08.013>.
- Yu, A.Q., Jin, X.K., Guo, X.N., Li, S., Wu, M.H., Li, W.W., Wang, Q., 2013. Two novel Toll genes (*EstToll1* and *EstToll2*) from *Eriocheir sinensis* are differentially induced by lipopolysaccharide, peptidoglycan and zymosan. *Fish Shellfish Immunol.* 35, 1282–1292. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.07.044>.
- Yu, A.Q., Jin, X.K., Wu, M.H., Guo, X.N., Li, S., He, L., Li, W.W., Wang, Q., 2014. Identification and characterization of Tube in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Gene* 541, 41–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.03.009>.
- Zhang, L.J., Gallo, R.L., 2016. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* 26, R14–R19. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.017>.
- Zhou, C., Carotenuto, Y., Vitiello, V., Wu, C., Zhang, J., Buttino, I., 2018. *De novo* transcriptome assembly and differential gene expression analysis of the calanoid copepod *Acartia tonsa* exposed to nickel nanoparticles. *Chemosphere* 209, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.096>.



## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ศุภกานต์ สังข์แก้ว
วัน เดือน ปี เกิด	18 กันยายน 2539
สถานที่เกิด	ราชบุรี
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562
ที่อยู่ปัจจุบัน	39/9 ซอยศาลาแดง1 ถนนพระราม4 แขวงสีลม เขตบางรัก กรุงเทพมหานคร 10500
ผลงานตีพิมพ์	<p>Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C., and Powtongsook, S. 2022. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod <i>Apocyclops royi</i>. <i>Aquaculture Reports</i>, 23 : 101064. (Impact Factor 2022 = 3.216)</p> <p>Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Chumtong, P., Yocawibun, P., Tapaneeyaworawong, P., Wongpanya, R., and Imjongjirak, C. 2022. RNA-seq transcriptome analysis and identification of the theromacin antimicrobial peptide of the copepod <i>Apocyclops royi</i>. <i>Developmental and Comparative Immunology</i>, 104464. (Impact Factor 2022 = 3.636)</p> <p>Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Amparyup, P., and Imjongjirak, C. 2022. Fatty acid composition and gene expression of methyl-end desaturases in copepod <i>Apocyclops royi</i>. In <i>The Proceedings No.2 of The 60th Kasetsart University Annual Conference</i>, pp. 143-150. Bangkok : Kasetsart University Research and Development Institute.</p>