

ศักยภาพของโคฟีพอดเพื่อเป็นอาหารมีชีวิตต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา กัดสวายงาม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2565

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POTENTIAL OF COPEPOD AS LIVE FEED ON IMMUNE RESPONSES OF ORNAMENTAL  
FIGHTING FISH



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

FACULTY OF SCIENCE

Chulalongkorn University

Academic Year 2022

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ศักยภาพของโคฟีพอดเพื่อเป็นอาหารมีชีวิตต่อการ
	ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงาม
โดย	น.ส.นุสรีย์ สามาลูกา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....	คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ประธานกรรมการ
.....	
(รองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)	
.....	อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ)	
.....	กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร)	
.....	กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา)	

นุสรีย์ สามาลูกา : ศักยภาพของโคฟีพอดเพื่อเป็นอาหารมีชีวิตต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงาม. ( POTENTIAL OF COPEPOD AS LIVE FEED ON IMMUNE RESPONSES OF ORNAMENTAL FIGHTING FISH ) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิติ อ้าพายัพ

ปลากัดไทย (*Betta splendens*) เป็นหนึ่งในสัตว์น้ำสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโคฟีพอดซึ่งเป็นแหล่งของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ในการเป็นอาหารมีชีวิตต่อภูมิคุ้มกันของลูกปลากัดวัยอ่อน โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลากัดด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จากการศึกษาพบว่าการอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคฟีพอด *Apocyclops royi* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ยีนเพปไทด์ต้านจุลินทรีย์ Liver-expressed antimicrobial peptide 2C (*BsLEAP2C*) และ ยีน ต้าน ไวรัส Mitochondrial antiviral signaling (*BsMAVS*) ให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยโปรตีน *BsMAVS* มีขนาด 569 กรดอะมิโน ประกอบด้วยโดเมนสำคัญ ได้แก่ N-terminal Caspase recruitment domain, proline-rich domain และ C-terminal transmembrane domain และพบว่าในลำไส้ปลากัดมีการแสดงออกของยีน *BsMAVS* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังกระตุ้นด้วย poly(I:C) นอกจากนี้ จากการศึกษาไมโครไบโอมพบว่าการอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคฟีพอด *A. royi* ช่วยส่งเสริมแบคทีเรียที่ดี และลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในลูกปลากัด ทำให้ลูกปลากัดมีสุขภาพที่ดีขึ้น ข้อมูลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าโคฟีพอด *A. royi* ที่อุดมด้วย PUFA มีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านไวรัส และปรับปรุงไมโครไบโอมของปลากัดได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 6370010823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: Siamese fighting fish, *Betta splendens*, Copepod, *Apocyclops royi*,  
MAVS

Nusree Samaluka : POTENTIAL OF COPEPOD AS LIVE FEED ON IMMUNE  
RESPONSES OF ORNAMENTAL FIGHTING FISH . Advisor: Assoc. Prof.  
CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D. Co-advisor: Piti Amparyup, Ph.D.

Siamese fighting fish (*Betta splendens*) is one of the most economically important ornamental fish in Thailand. This research aimed to study the effects of copepods, which a source of polyunsaturated fatty acid (PUFA), as a live feed on immune response in betta fish larvae through Immune-related gene transcript using semi-quantitative RT-PCR technique. This study found that the rearing of betta fish larvae with copepod *Apocyclops royi* significantly up-regulated the expression level of immune-related genes transcript. There are liver-expressed antimicrobial peptide 2C (*BsLEAP2C*) and mitochondrial antiviral signaling (*BsMAVS*). *BsMAVS* is an antiviral gene encoded for a predicted protein of 569 amino acids, with N-terminal caspase recruitment domain, proline-rich domain, and C-terminal transmembrane domain. *BsMAVS* transcript in fish gut was significantly up-regulated upon poly(I:C) stimulation. These results suggested the potential of copepod *A. royi* as live feed for enhancing the antiviral response in betta fish larvae. In addition, microbiome analysis found that the rearing of betta fish larvae with copepod *A. royi* promotes good bacteria communities and reduces pathogenic bacteria communities in betta fish larvae. This research demonstrated that the PUFA-enriched *A. royi* have potential to induce antiviral gene expression and improve the microbiome of betta fish.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature .....

Academic Year: 2022

Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความเมตตาและความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิติ อ่ำพ่าย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองท่านเป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะ และคอยช่วยเหลือตลอดการดำเนินการวิจัย ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนการศึกษาจากโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ SCA-CO-256312238

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ชนิษฐา ธนานุวงศ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนกร และรองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบ และกรุณาให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ดร. วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี คุณพัชรี โยควิบูล คุณปาริชาติ ชุมทอง และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และให้การช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวที่ให้กำลังใจ ให้การช่วยเหลือ และสนับสนุนตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นุสรีย์ สามาลูกา

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ง
กิตติกรรมประกาศ .....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ปลากัดไทย <i>Betta splendens</i> .....	3
2.1.1 อนุกรมวิธานของปลากัดไทย.....	4
2.1.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและลักษณะทั่วไป.....	4
2.1.3 การเพาะเลี้ยงปลากัด.....	5
2.1.4 โรคที่พบบ่อยในปลาสวยงาม.....	6
2.1.5 ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ของปลากัดไทย.....	7
2.2 อาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ใช้ในปัจจุบัน.....	8
2.3 ไรแดงน้ำจืด .....	9
2.4 โคพีพอด .....	12
2.4.1 อนุกรมวิธานของโคพีพอด.....	12
2.4.2 ข้อได้เปรียบในการใช้โคพีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน.....	13

2.4.3 การใช้โคฟีพอดต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ.....	14
2.5 โคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> .....	15
2.5.1 สารอาหารในโคฟีพอด <i>Apocyclops royi</i> .....	16
2.6 ไมโครไบโอม .....	17
2.7 Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) .....	17
2.7.1 โครงสร้างของ MAVS.....	18
2.7.2 กลไกการต้านไวรัสของ MAVS.....	19
2.8 เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	22
3.1 ตัวอย่าง.....	22
3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ .....	22
3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย .....	25
3.3.1 การศึกษาผลของโคฟีพอดในการเป็นอาหารมีชีวิตต่อภูมิคุ้มกันของลูกปลากัด .....	25
3.3.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA).....	25
3.3.1.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA).....	26
3.3.1.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด .....	27
3.3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน <i>BsMAVS</i> ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส .....	29
3.3.3 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน <i>BsMAVS</i> จากฐานข้อมูลของปลากัดไทย <i>B. splendens</i> .....	29
3.3.4 การศึกษาไมโครไบโอม (Microbiome) ของลูกปลากัด .....	30
3.3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA) .....	30
3.3.4.2 การเพิ่มจำนวน 16S amplicon ด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....	31
3.3.4.3 ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) 16S amplicon ให้บริสุทธิ์.....	32



3.3.4.4 การวิเคราะห์ไมโครไบโอม .....	33
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	34
4.1 การแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด .....	34
4.2 ลักษณะสมบัติของยีน <i>BsMAVS</i> ในปลากัด .....	36
4.3 การแสดงออกของยีน <i>BsMAVS</i> ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส .....	40
4.4 ไมโครไบโอมของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด .....	41
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ .....	47
5.1 สรุปผลการทดลอง .....	47
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	47
บรรณานุกรม .....	48
ภาคผนวก ก การเตรียมสาร .....	60
ภาคผนวก ข ผลงานตีพิมพ์ใน Proceedings .....	61
ประวัติผู้เขียน .....	72

## สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 กรดไขมัน (% total fatty acid) ในไรแดงน้ำจืด <i>M. macrocopa</i> ที่ความเค็มระดับต่าง ๆ.....	12
ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไขมัน DHA และ EPA ในโคพีพอด <i>A. royi</i> ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย <i>Tetraselmis</i> sp.....	16
ตารางที่ 3 การคำนวณสารเคมีในการสังเคราะห์ First strand cDNA 1500 นาโนกรัม .....	26
ตารางที่ 4 สารเคมีในการสังเคราะห์ cDNA.....	27
ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการทำ RT-PCR.....	27
ตารางที่ 6 สารเคมีในการทำ RT-PCR.....	27
ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเพิ่มจำนวน 16S amplicon .....	31
ตารางที่ 8 สารเคมีในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S amplicon .....	31
ตารางที่ 9 ความเหมือนของโปรตีน BsMAVS กับโปรตีน MAVS ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank .....	38
ตารางที่ 10 ประชากรแบคทีเรียในระดับฟิแลม ของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด <i>A. royi</i> .....	43
ตารางที่ 11 ประชากรแบคทีเรีย <i>Aeromonas</i> spp. ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด <i>A. royi</i> .....	46

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ปลากัดไทย <i>Betta splendens</i> .....	3
รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างปลากัด.....	5
รูปที่ 3 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	7
รูปที่ 4 ไรแดงน้ำจืด <i>Moina macrocopa</i> .....	9
รูปที่ 5 การสืบพันธุ์ของไรแดง.....	11
รูปที่ 6 โคพีพอด <i>Apocyclops royi</i> .....	16
รูปที่ 7 วิธี RIG-I-like receptor signaling pathway .....	18
รูปที่ 8 โดเมนสำคัญของโปรตีน MAVS ในปลากะพงขาว.....	19
รูปที่ 9 ระดับการแสดงออกของยีน <i>BsLEAP2C</i> ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด <i>A. royi</i> .....	35
รูปที่ 10 ระดับการแสดงออกของยีน <i>BsMAVS</i> ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด <i>A. royi</i> .....	35
รูปที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน <i>BsMAVS</i> ของปลากัดไทย <i>B. splendens</i> .....	37
รูปที่ 12 โดเมนสำคัญของโปรตีน <i>BsMAVS</i> .....	38
รูปที่ 13 เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน <i>BsMAVS</i> กับโปรตีน MAVS ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank.....	39
รูปที่ 14 ระดับการแสดงออกของยีน <i>BsMAVS</i> ในลูกปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส.....	40
รูปที่ 15 กราฟแสดงประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด <i>A. royi</i> .....	42

## บทที่ 1

### บทนำ

ปลากัดไทย (Siamese Fighting fish) เป็นหนึ่งในปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมและจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงจากการส่งออกทั่วโลก จากข้อมูลปริมาณและมูลค่าการส่งออกสัตว์น้ำสวยงาม ด้านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2558 จนถึงปัจจุบัน พบว่าปลากัดเป็นปลาสวยงามที่มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกสูงสุด โดยในเดือนมกราคม พ.ศ.2564 ปลากัดมีปริมาณการส่งออกเป็นจำนวน 1,628,618 ตัว และมีมูลค่า 18,476,652 บาท (อมรัตน์, 2561; กรมประมง, 2564) โดยเฉพาะชนิด *Betta splendens* Regan, 1910 (การุณ, 2554) จากการเพาะเลี้ยงปลากัดพบว่า อาหารสำหรับลูกปลากัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต สุขภาพ การเจริญเติบโต การสร้างเม็ดสี ระดับความเครียด การต้านทานโรค (Abate et al., 2016) และเป็นตัวกำหนดจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลา (Gruneck et al., 2022) ในการเพาะเลี้ยงปลากัดโดยทั่วไปนิยมใช้อาหารมีชีวิต เช่น ไรแดง ซึ่งสามารถพบได้ในธรรมชาติแต่เป็นพาหะของเชื้อก่อโรค ในขณะที่ไรติเฟอร์ ซึ่งมีคุณภาพทางโภชนาการน้อย และอาร์ทีเมีย ซึ่งมีความปลอดภัยทางโภชนาการไม่คงที่ (พิชญา, 2559) อีกทั้งยังพบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยโคพีพอดให้การเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต และลดภาวะเม็ดสีผิดปกติ (malpigmentations) ได้ดีกว่า (Concecau et al., 2010) โคพีพอดเป็นหนึ่งในแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีความสำคัญและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงจึงเป็นอาหารมีชีวิตที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นเหยื่อตามธรรมชาติของสัตว์แรกเกิด และเหมาะสมสำหรับลูกปลากัดโดยมีสารอาหาร ขนาด และรูปแบบการว่ายน้ำที่เหมาะสมกับตัวอ่อนของปลา โคพีพอด *Apocyclops royi* จัดอยู่กลุ่มไซโคลพอยด์ ซึ่งอาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำและในมวลน้ำเพาะเลี้ยงง่าย วงจรชีวิตสั้น มีขนาดที่หลากหลายตามช่วงของระยะพัฒนาการ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จากการศึกษาพบว่าโคพีพอดทำให้ตัวอ่อนของปลามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น มีการสร้างเม็ดสีที่ดีขึ้น ซึ่งคาดว่ามาจากอัตราส่วนกรดไขมันจำเป็น docosahexaenoic acid (DHA) : eicosapentaenoic acid (EPA) ที่เหมาะสมและจำเป็นสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน (Olivotto et al., 2010; Abbaszadeh., 2022) อีกทั้งยังพบว่า *A. royi* สามารถสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นชนิด DHA ได้ในทุกช่วงวัยตั้งแต่ระยะนอเพเลียส ระยะโคพีโพดิต และระยะตัวเต็มวัย แม้จะเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มี polyunsaturated fatty acid (PUFA) ต่ำ (Amparyup et al., 2022) โรคระบาดเป็นอีกหนึ่งปัญหาที่ก่อให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลากัด ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุทั้งแบคทีเรีย ปรสิต พยาธิภายใน ไวรัส และเชื้อรา

Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) เป็นโปรตีนรับส่งสัญญาณที่สำคัญในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway ที่ค้นพบในปลากัด (Amparyup et al., 2020) ซึ่งจัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการต้านไวรัส เป็น

โมเลกุลที่มีบทบาทในการต้านไวรัส โดยการเหนี่ยวนำอินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 1 (type I IFN) เพื่อกระตุ้นยีนต้านไวรัส ช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียงและตอบสนองต่อการอักเสบ โดยโปรตีน MAVS จะทำงานประสานกับตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัสในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway (Krishnan et al., 2018; Yasukawa et al., 2021) อย่างไรก็ตาม แม้ปลากัดจะมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ แต่ข้อมูลในระดับโมเลกุลและข้อมูลทางพันธุกรรมเกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันโรคนั้นยังไม่มีข้อมูลมากนัก ดังนั้นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน จะช่วยให้เข้าใจการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติในปลากัดได้

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโคพิพอดในการเป็นอาหารมีชีวิตต่อภูมิคุ้มกันของลูกปลากัดวัยอ่อน โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพิพอดและปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส และศึกษาลักษณะสมบัติของยีน MAVS จากฐานข้อมูลของปลากัดไทย *Betta splendens*



## บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

### 2.1 ปลากัดไทย *Betta splendens*

ปลากัดไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Betta splendens* และมีชื่อสามัญคือ Siamese fighting fish ปลากัดไทยเป็นหนึ่งในปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมและจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย เนื่องด้วยลักษณะและสีสันที่สวยงามโดดเด่น (Yuslan et al., 2021a) ดังรูปที่ 1 โดยจากข้อมูลปริมาณและมูลค่าการส่งออกสัตว์น้ำสวยงาม ด้านตรวจสัตว์น้ำท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ ตั้งแต่ปี พุทธศักราช 2558 จนถึงปัจจุบัน พบว่าปลากัดเป็นปลาสวยงามที่มีปริมาณและมูลค่าการส่งออกสูงสุด โดยในเดือนมกราคม พ.ศ.2564 ปลากัดมีปริมาณการถูกส่งออกเป็นจำนวน 1,628,618 ตัว และมีมูลค่า 18,476,652 บาท (อมรรัตน์, 2561; เว็บไซต์กรมประมง)



รูปที่ 1 ปลากัดไทย *Betta splendens*

ที่มา : กรมประมง (2559)

### 2.1.1 อนุกรมวิธานของปลากัดไทย

ปลากัดไทยสกุล *Betta* เป็นปลากัดกลุ่มก่อหอคอย (bubble-nest builder) พันธุ์ดั้งเดิมในธรรมชาติ พบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ประมาณ 55 ชนิด และพบในประเทศไทย 10 ชนิด โดยชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อการส่งออก คือ *Betta splendens* Regan, 1910 (Monvises et al., 2009) ซึ่งมีลำดับอนุกรมวิธาน (ณัฐกิตติ์และภัทรพนธ์, 2561) ดังนี้

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclass: Gnathostomata

Class: Actinopterygii

Subclass: Neopterygii

Division: Teleostei

Subdivision: Euteleostei

Superorder: Acanthopterygii

Series: Percomorpha

Order: Perciformes

Suborder: Anabantoidei

Family: Belontiidae

Subfamily: Macropodinae

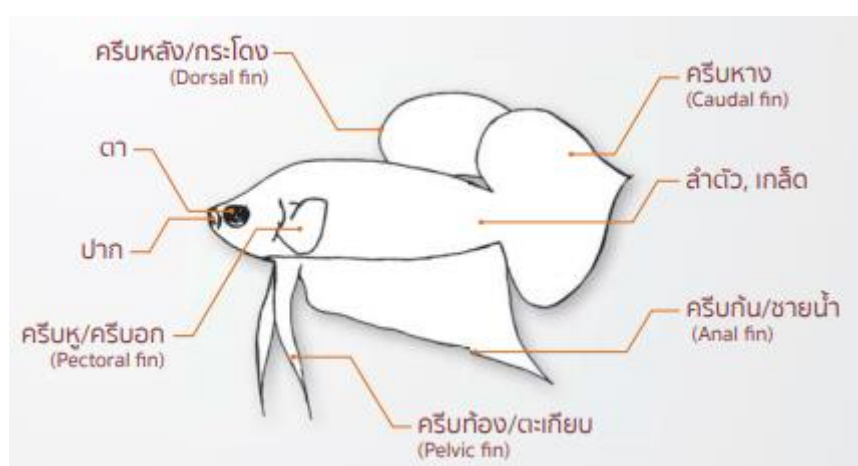
Genus: *Betta*

Species: *Betta splendens*

### 2.1.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและลักษณะทั่วไป

ปลากัดไทยเป็นปลาพื้นเมืองดั้งเดิม กระจายอยู่ทุกภาคของประเทศ (การุณ, 2556) อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด บริเวณน้ำตื้นในระบบนิเวศน้ำนิ่งหรือน้ำไหลช้า มีพีเอช 5.3-5.8 อุณหภูมิ 27.0-31.5 องศาเซลเซียส เช่น นาข้าว บ่อน้ำ บึง แอ่งน้ำ ลำคลอง หนอง รวมถึงอ่างเก็บน้ำที่มีระดับน้ำตื้น (วัฒนา และคณะ, 2548; ศุภร์เทียนชัย, 2561; Monvises et al., 2009) ปลากัดเป็นปลากระดูกแข็งที่มีขนาดเล็ก ลำตัวแบนยาว มีปากขนาดเล็กเขี้ยวขึ้นด้านบนเล็กน้อย มีฟันที่ขากรรไกรบนและล่าง มีเกล็ดปกคลุมส่วนหัวและลำตัว กระดูกที่ขอบตาเรียบ มีครีบท้อง (pelvic fin) ครีบก้น (anal fin) ครีบหาง (caudal fin) ครีบล้าง (Dorsal fin) และมีครีบอก (pectoral fin) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าครีบ

อื่น ดังรูปที่ 2 (กรมประมง, 2559; ศุภร์เทียนชัย, 2561) เมื่อโตเต็มที่ ปลาเก็ดจะมีความยาวประมาณ 2.5 นิ้ว มีสีสันทสวยงามหลากหลายสี เช่น แดง เขียว คราม น้ำเงิน รวมถึงมีการผสมสี โดยปลาเก็ดเพศผู้จะมีลำตัวเพรียว สีสด และครีบยาวสวยกว่าปลาเก็ดเพศเมีย (วัฒนา และคณะ, 2548) เนื่องด้วยลักษณะ สีสด และครีบที่เป็นจุดเด่น จึงมีเกิดการนิยมเลี้ยงปลาเก็ดเพื่อความสวยงามและเพื่อการแข่งขัน โดยเมื่ออายุครบ 1.5-2 เดือนปลาเก็ดจะมีนิสัยก้าวร้าวและมีพฤติกรรมการกัดกัน มีการแสดงออกโดยการเพิ่มความเข้มของสี แผ่ครีบ เปิดแผ่นช่องเหงือก (operculum) และกัดหางปลาเก็ดตัวอื่น (ศุภร์เทียนชัย, 2561)



## รูปที่ 2 ลักษณะรูปร่างปลาเก็ด

ที่มา : กรมประมง (2559)

### 2.1.3 การเพาะเลี้ยงปลาเก็ด

ในการเพาะเลี้ยงปลาเก็ด ต้องเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเก็ดที่แข็งแรง ว่ายน้ำปราดเปรียว ไม่มีอาการซึม และมีความสมบูรณ์ทางเพศ โดยเลือกปลาเก็ดเพศเมียที่มีไข่ขาว บริเวณใต้ท้อง และเลือกปลาเก็ดเพศผู้จากการสร้างหวอดหรือรัง ซึ่งเป็นการพ่นอากาศที่มีน้ำเมือกจากปากและลำคอผสมกัน โดยปลาเก็ดเพศผู้ที่มีความสมบูรณ์เต็มที่ จะมีการสร้างหวอดเป็นฟองอากาศจับกลุ่มลอยบนผิวน้ำเสมอ ปลาเก็ดมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการปฏิสนธิของไข่กับสเปิร์มจะเกิดขึ้นภายนอกร่างกาย ในการเพาะพันธุ์ปลาเก็ดจะนำปลาเก็ดมาเทียบกันก่อน ประมาณ 4-7 วัน แล้วจึงนำมาผสมกัน ปลาเก็ดเพศผู้จะรัดปลาเก็ดเพศเมียจนปล่อยไข่ออกมาหมด จากนั้นปลาเก็ดเพศผู้จะฉีดยาเชื้อเข้าผสมแล้วเก็บไข่มาพ่นในหวอด พ่อปลาจะทำหน้าที่ดูแลไข่จนกระทั่งฟักเป็นตัวภายใน 3 วัน ปลาเก็ดจะเติบโตถึงวัยเจริญพันธุ์ภายใน 4 เดือน (วัฒนา และคณะ, 2548)



ปลากัดแรกเกิดช่วง 3-4 วันแรกจะมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดตัวจึงไม่จำเป็นต้องให้อาหารเพิ่มเติม แต่อย่างไรก็ตามถุงอาหารจะหมดและสลายในเวลาต่อมา ประมาณวันที่ 4-5 ลูกปลาจะยังมีขนาดเล็กและยังเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ จึงจำเป็นต้องมีการให้อาหารเพิ่มเติม อาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงปลากัดวัยอ่อน ได้แก่ ไรแดง *Moina* sp. (วัฒนา และคณะ, 2548; อมรรัตน์, 2561; Monvises et al., 2009) อาหารที่นิยมใช้สำหรับปลากัดตัวเต็มวัยได้แก่ อาร์ทีเมีย ลูกน้ำ หนอนแดง และอาหารสำเร็จรูป เป็นต้น (วัฒนา และคณะ, 2548; ศุภร์เทียนชัย, 2561) โดยให้อาหารในปริมาณที่พอดีให้ปลาอิ่ม หากให้อาหารในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้น้ำเสียได้ และควรมีการเปลี่ยนน้ำอย่างน้อยสัปดาห์ละ 1-2 ครั้ง อย่างไรก็ตามอาหารมีชีวิตที่นิยมใช้ดังกล่าว มีคุณค่าทางโภชนาการไม่ครบถ้วนตามที่สัตว์น้ำวัยอ่อนต้องการ จึงจำเป็นต้องมีการเสริมอาหารอื่น ๆ เพิ่ม อีกทั้งอาหารมีชีวิตดังกล่าวยังเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคได้อีกด้วย

#### 2.1.4 โรคที่พบบ่อยในปลาสวยงาม

โรค เป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้เกิดความสูญเสียในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม โรคในปลาสวยงามเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุทั้งแบคทีเรีย ปรสิต พยาธิภายใน ไวรัส และเชื้อรา อมรรัตน์ (2561) ได้รายงานโรคที่พบบ่อยในปลาสวยงาม เช่น โรคจุดขาวและโรคเห็บระฆัง ซึ่งเกิดจากเชื้อโปรโตซัว โรคหนอนสมอ เกิดจากพยาธิ *Lernae* sp. โรคตัวเปื่อยปากเปื่อย (ไฟลามทุ่ง) เกิดจากพยาธิ โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และโรคท้องมาร ซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส นอกจากนี้ กมลพร และ สุปราณี (2544) ได้รายงานเกี่ยวกับโรคในปลาสวยงามที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคแอสปม (Lymphocystis Disease) โรค Koi Herpes Virus เป็นต้น การติดเชื้อไวรัส มักทำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรียตามมา และเป็นสาเหตุของการตาย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่ดีและไม่เครียด อย่างไรก็ตาม การขยายตัวของอุตสาหกรรมปลากัดทั่วโลกทำให้เกิดการติดเชื้อในวงกว้าง ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญในการพัฒนาการเลี้ยงปลากัดอย่างยั่งยืน ในขณะที่ข้อมูลในระดับโมเลกุลในการต้านโรคและภูมิคุ้มกันของปลากัดนั้นยังไม่ทราบมากนัก



รูปที่ 3 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila*

ที่มา : Algammal และคณะ (2020)

### 2.1.5 ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ของปลากัดไทย

ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune pathway) เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการต้านเชื้อโรค มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อในปลา จากรายงานการศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทยในสภาวะปกติ พบ 997 unigenes ใน 5 วิธีภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immune pathway) ได้แก่ NOD-like receptor signaling pathway (36 ยีน), complement and coagulation cascades (52 ยีน), toll-like receptor signaling pathway (55 ยีน), RIG-I-like receptor signaling pathway (41 ยีน) และ cytosolic DNA-sensing pathway (20 ยีน) และค้นพบ 4 เพปไทด์ต้านจุลชีพ ได้แก่ hepcidin, piscidin, LEAP-2 และ defensins โดยพบว่ายีน beta-defensins 1 (*BsBD1*) ในปลากัดมีการแสดงออกมากในกล้ามเนื้อและไต ในขณะที่ *BsBD2* มีการแสดงออกมากที่เหงือก (Amparyup et al., 2020) นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบยีนต้านไวรัส *BsMxA* ซึ่งมีความคล้ายกับ โปรตีนมิกโซไวรัสรีซิสแทนซ์ (Myxovirus resistant; Mx) ที่มีรายงานในปลาหลายชนิด (วลัยพร และคณะ, 2563) โปรตีน Mx สามารถยับยั้งไวรัสได้หลายชนิด เช่น โปรตีน Mx1 ของปลาแซลมอนแอตแลนติก *Salmo salar* มีฤทธิ์ยับยั้ง Infectious pancreatic necrosis virus และ Infectious salmon anaemia virus (Jensen and Robertsen, 2002; Kibenge et al., 2005) โปรตีน Mx ของปลาลิ้นหมา *Paralichthys olivaceus* มีฤทธิ์ยับยั้ง Hiram rhabdovirus และ viral hemorrhagic virus (Caipang et al., 2003)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันของปลานั้นได้รับอิทธิพลมาจากอาหารที่กินเข้าไป Clotfelter และคณะ (2007) รายงานว่าแคโรทีนอยด์ซึ่งเป็นเม็ดสีที่ทำให้เกิดสีแดง ส้ม และเหลือง มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระและกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลา เนื่องจากสัตว์มีกระดูกสันหลังหรือปลาไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ ดังนั้นแคโรทีนอยด์ในอาหารที่ได้รับเข้าไปจึงสำคัญ จากการทดลองพบว่าปลากัดไทยสีแดงที่ได้รับแคโรทีนอยด์จะมีสีสดใสแดงสวยงามขึ้นและมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น ในขณะที่ปลากัดไทยสีน้ำเงินที่ได้รับแคโรทีนอยด์มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันดีขึ้นมากกว่าปลากัดสีแดง แต่ไม่ได้ช่วยให้มีสีแดงเพิ่มมากขึ้น หมายความว่าปลากัดสีแดงนำแคโรทีนอยด์ไปใช้ประโยชน์ในการสร้างสีแดงและกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ในขณะที่ปลากัดสีน้ำเงินนำแคโรทีนอยด์ไปใช้ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเป็นหลัก นอกจากนี้กรดไขมันเป็นสารอาหารอีกชนิดที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา Carneiro และคณะ (2021) ได้รายงานว่าการขาดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acid: PUFA) ในอาหารส่งผลต่อทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) สำหรับระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะพบว่า PUFA มีผลยับยั้งการผลิต cytokines IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8 และ TNF-a ซึ่งสามารถก่อให้เกิดการอักเสบได้ (Calder, 1996) และมีผลในการเพิ่ม phagocytic capacity และเพิ่มการทำงานของ monocytes (Gandra et al., 2016) เมื่อทำการทดสอบ macrophages ด้วยกรดไขมันชนิด n-3 PUFA ได้แก่ ALA, DHA และ EPA จะพบว่ากรดไขมันดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่ม phagocytic capacity ของ macrophages ได้โดยการลด polarization ของ macrophages type 1 และเพิ่ม polarization ของ macrophages type 2 (Titos et al., 2011) อีกทั้ง DHA ช่วยเพิ่มการแพร่กระจายของ neutrophils (Gorao et al., 2009)

## 2.2 อาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่ใช้ในปัจจุบัน

‘อาหาร’ เป็นปัจจัยสำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนให้ประสบความสำเร็จ เนื่องจากอาหารที่ได้รับในวัยแรกเกิดจะส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต สุขภาพ การเจริญเติบโต การสร้างเม็ดสี ระดับความเครียด การต้านทานโรค และส่งผลต่อโภชนาการกรดไขมันและโปรตีนในปลา (Abate et al., 2016) อย่างไรก็ตาม สัตว์น้ำวัยอ่อนแรกฟักสามารถใช้อาหารจากถุงอาหารที่ติดตัวได้ แต่เมื่อถุงอาหารหมดในขณะที่สัตว์น้ำวัยอ่อนยังมีขนาดเล็กและพัฒนาการของระบบทางเดินอาหารยังไม่สมบูรณ์ (Juntarut, 2014) ดังนั้น สัตว์น้ำวัยอ่อนจึงจำเป็นต้องได้รับสารอาหารที่เพียงพอและเหมาะสมทั้งในด้านขนาดและคุณค่าทางโภชนาการ

ในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนนิยมใช้อาหารมีชีวิตมากกว่าอาหารเม็ดสำเร็จรูป เนื่องจากมีองค์ประกอบทางโภชนาการที่ง่ายต่อการกลืน การย่อย และการดูดซึมมากกว่า เมื่อเทียบกับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (Koven et al., 2001; Conceicao 2010) อาหารมีชีวิตมีการเคลื่อนไหวจึงนำดึงดูดและกระตุ้นสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ดีกว่าอาหารสำเร็จรูป (Buskey, 2005) ดังนั้น จึงเป็นผลให้อาหารมีชีวิตช่วยให้สัตว์น้ำวัยอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่า (Abate et al., 2016) อาหารมีชีวิตสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อนที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) ไรทะเลหรืออาร์ทีเมีย (*Artemia* spp.) และโรติเฟอร์ (*Brachionus* sp.) (Monvises et al., 2009) อย่างไรก็ตาม ทั้งอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์มีองค์ประกอบทางชีวเคมีค่อนข้างต่ำ ขาดองค์ประกอบทางชีวเคมีบางชนิดที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน และมีขนาดใหญ่กว่าปากของสัตว์น้ำวัยอ่อนที่เพิ่มเริ่มกินอาหาร (first feeding) (Abate et al., 2016) อีกทั้งยังพบว่าการเพาะเลี้ยงด้วยโคพีพอดให้การเจริญเติบโต อัตราการรอดชีวิต และลดภาวะเม็ดสีผิดปกติ (malpigmentations) ได้ดีกว่าอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ (Conceicao et al., 2010; Abate et al., 2016) ดังนั้น โคพีพอดจึงเป็นอาหารมีชีวิตที่เป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ

### 2.3 ไรแดงน้ำจืด



รูปที่ 4 ไรแดงน้ำจืด *Moina macrocopa*

ที่มา : Poynton และคณะ (2013)

ไรแดงน้ำจืด เป็นหนึ่งในแพลงก์ตอนสัตว์ที่มีความสำคัญ เป็นอาหารธรรมชาติสำหรับสัตว์น้ำวัยอ่อน มีชื่อสามัญว่า water flea มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Moina macrocopa* (Yuslan et al., 2021b) เดิมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Daphnia macrocopa* (วิรัตดา, 2544) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจำพวกครีวเตเซียนในสกุล *Moina* มีขนาดตั้งแต่ 0.4 ถึง 1.8 มิลลิเมตร สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ลำตัวมีสีแดงเรื่อ ๆ มองเห็นเป็นกลุ่มสีแดงเข้มเมื่ออยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก ตัวอ่อนไรแดงมี

ขนาด 0.22 ถึง 0.35 มิลลิเมตร มีสีจางกว่าตัวเต็มวัย เมื่อถึงตัวเต็มวัยตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย โดยตัวผู้มีขนาดเล็กและค่อนข้างยาวกว่า มีขนาดเฉลี่ย 0.5 มิลลิเมตร ตัวเมียมีลำตัวอ้วนเกือบกลมมีขนาดโดยเฉลี่ย 1.3 มิลลิเมตร (บุญยกร และศรีณย์, 2561) ไรแดงน้ำจืดถูกจัดอยู่ในอนุกรมวิธาน (บุญยกร และศรีณย์, 2561) ดังนี้

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Branchiopoda (Phyllopopoda)

Order Cladocera (Waterfleas)

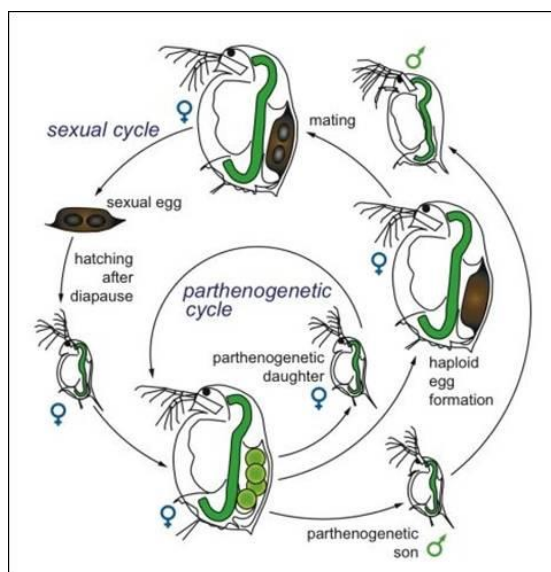
Suborder Calyptomera

Family Daphnidae

Genus *Moina*

ไรแดงน้ำจืดมีลำตัวเป็นรูปไข่ มีเปลือก แต่หุ้มตัวไม่หมด ขอบเปลือกไม่มีหนาม ขอบด้านท้องของเปลือกปกคลุมด้วยขนแข็ง ส่วนท้ายของเปลือกหุ้มลำตัวมีระยางค์พิเศษ คือ post abdomen ซึ่งมีหนามเรียงเป็นแถว มีขาอก 5 คู่ ซึ่งทำหน้าที่ต่างกัน คู่ที่ 1 และคู่ที่ 2 ทำหน้าที่ทำความสะอาดเปลือกหุ้มตัว คู่ที่ 3 และ 4 ทำหน้าที่กรองอาหารจากน้ำ คู่ที่ 5 มีขนาดเล็กมากทำหน้าที่พู่ยน้ำ และจะพบระยางค์ (maxillary process) เฉพาะบนขาคู่ที่ 2 เท่านั้น ส่วนหัวกลมและมีขนาดใหญ่ มีตาประกอบ (compound eye) ใหญ่ 1 คู่ มีหนวด 2 คู่ (วิรัตดา, 2544)

โดยทั่วไปแล้ว ไรแดงน้ำจืดอาศัยอยู่ในน้ำจืดที่มีความเค็มต่ำกว่า 1 และมีความสามารถในการทนความเค็มได้ต่ำกว่าโคฟีพอด จากรายงานวิจัยของ Yuslan และคณะ (2021b) พบว่าไรแดงน้ำจืดสามารถรอดชีวิตได้ 98% ที่ความเค็มเป็น 0 และรอดชีวิตเพียง 20% ที่ความเค็มเท่ากับ 15 อีกทั้งยังพบว่า ความเค็มส่งผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโต ทำให้โตช้าลง และส่งผลต่อการสืบพันธุ์ โดยปกติไรแดงน้ำจืด จากตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 48 ถึง 60 ชั่วโมง และจะมีวงจรชีวิตสั้น มีอายุและสามารถสืบพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุ 4 ถึง 7 วันเท่านั้น การสืบพันธุ์ของไรแดงน้ำจืดมีทั้งระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ดังรูปที่ 5



### รูปที่ 5 การสืบพันธุ์ของไรแดง

ที่มา : Ebert (2005)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ จะเกิดขึ้นในสภาวะแวดล้อมปกติ ซึ่งมีประชากรส่วนใหญ่เป็นเพศเมีย โดยไรแดงเพศเมียจะสร้างไข่ที่มีโครโมโซมเป็น diploid ( $2n$ ) ไข่สามารถฟักเป็นตัวได้โดยไม่ต้องผสมกับไรแดงเพศผู้ (บุญยกร และศรีณย์, 2561) โดยตัวเมียหนึ่งตัวจะมีลูกได้ตั้งแต่ 4 ถึง 22 ตัว (Ferro Korovchinsky et al., 2008)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จะเกิดขึ้นในสภาวะแวดล้อมที่ผิดปกติ (Ferro Korovchinsky et al., 2008) เช่น อุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป ความเป็นกรดต่างไม่เหมาะสม ขาดแคลนอาหาร ไรแดงจะเพิ่มปริมาณประชากรเพศผู้มากขึ้น ไรแดงเพศเมียจะสร้างไข่ที่มีโครโมโซมเป็น haploid ( $n$ ) ซึ่งต้องได้รับการผสมพันธุ์จากเพศผู้ จะได้ไข่พัก (resting egg) ซึ่งมีเปลือกหุ้มหนา แม่ 1 ตัว จะให้ไข่ชนิดนี้ 2 ฟอง หลังจากนั้นตัวเมียจะตายเนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ไข่จะถูกทิ้งอยู่ก้นแหล่งน้ำนั้น ๆ ตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่จะแบ่งตัวจนถึงระยะ gastrula แล้วจึงหยุดการแบ่งตัวชั่วคราว ไข่เปลือกแข็งนี้สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้นาน และจะฟักออกเป็นตัวเมื่อสภาวะแวดล้อมดีขึ้น และมีอาหารอุดมสมบูรณ์ (บุญยกร และศรีณย์, 2561)

ไรแดงน้ำจืดอดมไปด้วยโปรตีนและสารอาหาร จึงเป็นอาหารมีชีวิตที่ดีสำหรับลูกปลาและลูกกุ้ง เมื่อเปรียบเทียบกับโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย โดยไรแดงน้ำจืดประกอบด้วยโปรตีน 74.09% คาร์โบไฮเดรต 12.50% และไขมัน 10.19% (กรมประมง, 2561) อย่างไรก็ตาม ปริมาณกรดไขมัน

ของไรแดงน้ำจืดนั้นจะแตกต่างกันตามอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงและความเครียดจากสิ่งแวดล้อม กรดไขมันเป็นเป็นหนึ่งในสารอาหารที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การรอดชีวิต และการสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในช่วงวัยอ่อนแรกฟัก (Yuslan et al., 2021b)

**ตารางที่ 1** กรดไขมัน (% total fatty acid) ในไรแดงน้ำจืด *M. macrocopa* ที่ความเค็มระดับต่าง

ๆ

กรดไขมัน	ค่าความเค็ม					
	0	4	6	8	12	15
ALA	0.474	0.135	0.014	0.001	-	-
ARA	0.616	0.145	0.041	0.006	0.002	0.001
EPA	0.725	0.420	0.004	-	-	-
DHA	1.151	1.173	0.427	0.002	0.001	-

ที่มา : Yuslan และคณะ (2021b)

## 2.4 โคฟีพอด

โคฟีพอดเป็นครัสเตเชียน (crustacean) ขนาดเล็กที่มีบทบาทสำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจาก เป็นเป็นผู้บริโภคขั้นต้นในห่วงโซ่อาหาร โดยกินแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กเป็น อาหาร และเป็นเหยื่อตามธรรมชาติของสัตว์น้ำ (Juntarut, 2014; Williamson and Ried, 2001; Concecau 2010) อีกทั้งยังมีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ใน ประเทศไทยสามารถพบโคฟีพอดได้ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม ทั้งฝั่งอ่าวไทย และอันดามัน โคฟี พอดจึงถือเป็นตัวบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางชีวภาพ ความอุดมสมบูรณ์ตามธรรมชาติของระบบ นิเวศ (วิไลลักษณ์, 2565)

### 2.4.1 อนุกรมวิธานของโคฟีพอด

โคฟีพอดที่ดำรงชีวิตอิสระในน้ำจืด ถูกจัดอยู่ในลำดับอนุกรมวิธาน (ธนิตา, 2559; Martin and Davis, 2001) ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Arthropoda

Sub phylum Crustacea

Class Maxillopoda

Subclass Copepoda

Order Cyclopoida

Order Calanoida

Order Harpacticoida

โคพีพอดในกลุ่มคาลานอยด์ (Calanoida), ฮาร์แพคติกอยด์ (Harpacticoida) และไซโคลพอยด์ (Cyclopoida) นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากที่สุด โดยมีโคพีพอดในกลุ่มคาลานอยด์ที่นิยมใช้ในการอนุบาลลูกปลาทะเลวัยอ่อนมากที่สุด ได้แก่ *Acartia sp.*, *Eurytemora affinis*, *Centropages hamatus* และ *Gladioferens imparipes* ในขณะที่โคพีพอดอันดับไซโคลพอยด์ เช่น *Apocyclops sp.* และ *Oithona sp.*, ยังนำมาใช้ไม่มาก (Stottrup 2003)

#### 2.4.2 ข้อได้เปรียบในการใช้โคพีพอดในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน

โคพีพอดเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจในการอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนเนื่องด้วย

(1) โคพีพอดมีคุณค่าทางโภชนาการกรดไขมันสูงกว่าโรติเฟอร์ อาร์ทีเมีย และไรแดงน้ำจืด โคพีพอดมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (highly unsaturated fatty acid หรือ HUFA) ที่ประกอบด้วย docosahexaenoic acid (DHA), eicosapentaenoic acid (EPA) และ arachidonic acid (ARA) องค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงที่พบในโคพีพอดจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตของสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งช่วยให้มีสัตว์น้ำวัยอ่อนมีอัตราการรอดชีวิต และเจริญเติบโตดีขึ้น ลดภาวะเม็ดสีผิดปกติ (malpigmentations) และลดความเครียดของปลา (Juntarut, 2014; Abate et al., 2016; Nielsen et al., 2021) จากรายงานของ Yuslan และคณะ (2021a) กล่าวว่าโคพีพอดมีโปรตีนและไขมันสูง ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันจำเป็น ซึ่งมีส่วนช่วยในการพัฒนาระบบย่อยอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน และจากงานวิจัยของ Coperman และคณะ (2002) พบว่าลูกปลาวัยอ่อนที่ได้รับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) เช่น DHA หรือ EPA ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ จะส่งผลให้ลูกปลาวัยอ่อนมีสุขภาพไม่ดี มีความผิดปกติ ไม่สามารถทนต่อความเครียดได้ มีพัฒนาการ การเจริญเติบโต และการสร้างเม็ดสีลดลง

(2) ปริมาณกรดไขมันชนิด HUFA ในโคพีพอดมีความเสถียรกว่าในไรแดงน้ำจืด เมื่อนำไปเลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม (Yuslan et al., 2021a; Amparyup et al., 2022)



(3) โคฟีพอดมีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระที่มากกว่าโรติเฟอร์ 0.2 เท่า และมากกว่าอาร์ทีเมีย 0.5 เท่า ซึ่งช่วยให้ตัวอ่อนปลานำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น จึงทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น (Fyhn et al.1993; Ronnestad et al. 2003; Ronnestad & Conceicao 2005; Conceicao 2010)

(4) โคฟีพอดมีรูปแบบการว่ายน้ำที่ดึงดูดสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยจากการศึกษาพบว่า โคฟีพอดในระยะนอเพลีสมีกรว่ายน้ำแบบ 'jurkey zigzag' ซึ่งดึงดูดและกระตุ้นสัตว์น้ำวัยอ่อนให้โจมตีเหยื่อมากขึ้น (Buskey, 2005) ถูกกินโดยสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ง่ายกว่า เนื่องจากมีการเคลื่อนไหวและว่ายน้ำอยู่ในน้ำพร้อมลูกปลา ลูกปลาจึงสามารถกินได้ตลอด (Conceicao, 2010) ในขณะที่อาหารสำเร็จรูปจะอยู่แค่บริเวณผิวน้ำ และเมื่อดูดซึมน้ำมากขึ้นก็จะจมอยู่บริเวณใต้น้ำ ลูกปลาก็ไม่สามารถกินต่อได้ อีกทั้งทำให้น้ำเสียได้ง่าย

(5) โคฟีพอดมีขนาดเล็กกว่าโรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย มีขนาดตัวที่หลากหลายตั้งแต่ 50 – 2000 ไมโครเมตร (ธนิตา 2559; Reid and Williamson, 2010; Abate et al., 2016)

(6) โคฟีพอดเป็นหนึ่งทางเลือก ที่ช่วยลดต้นทุนในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพบว่าการใช้โคฟีพอด ช่วยลดต้นทุนการเพาะเลี้ยงลูกปลาเทอร์บอทขนาดเล็กในระยะ juvenile ได้ อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการใช้อาร์ทีเมีย ซึ่งต้องมีการเสริมอาหารเนื่องจากโภชนาการต่ำ (Abate et al., 2016)

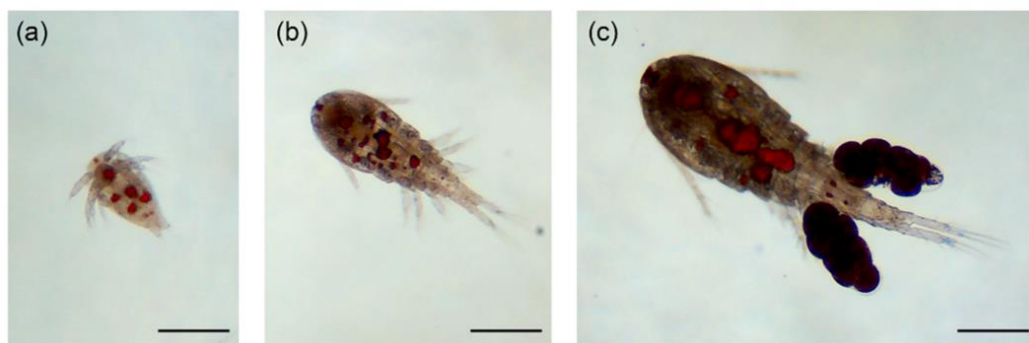
#### 2.4.3 การใช้โคฟีพอดต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ

เนื่องด้วยคุณค่าทางโภชนาการที่ดีของโคฟีพอด จึงถูกนำไปใช้การการเพาะเลี้ยงสัตว์ทะเลหลายชนิด เช่น ปลาหูฉลาม, ปลาลิ้นหมา, ปลาเคียว, ปลาไหล และปลาฮาลิบัท เป็นต้น (Abate et al., 2016) รวมถึงนำไปอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนหลายชนิด (Payne et al., 2001; Ogle et al., 2005; Rajkumar and Vasagam, 2006; Olivotto et al., 2008; Conceicao et al., 2010; Busch et al., 2011) จากงานวิจัยของ Abbaszadeh และคณะ (2022) พบว่าการเพาะเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) ระยะโพสลาร์วาในระบบไบโอฟลอค (biofloc) โดยให้โคฟีพอดเทียบกับการใช้อาร์ทีเมีย โรติเฟอร์ และอาหารสำเร็จรูป พบว่ากุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอดมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 4296.5% มีอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัว (Feed conversion ratio; FCR) ดีที่สุด 1.22 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) สูงสุด 6.80% อัตราการรอดชีวิตสูงสุด 91.43% เมื่อเทียบกับอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ อีกทั้งมีภูมิคุ้มกันดีขึ้น

โดยมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้น เมื่อเทียบกับอาร์ทีเมียและโรติเฟอร์ จากงานวิจัยของ Busch และคณะ (2011) พบว่าลูกปลาคือตัวอ่อนที่ทำการอนุบาลด้วยโคฟีพอดมีความยาวและน้ำหนักแห้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่อนุบาลด้วยโรติเฟอร์ และมีสถิติดีกว่าเนื่องจากในโคฟีพอดมีแอสตราแซนทินมากกว่าโรติเฟอร์ จากงานวิจัยของ Oie และคณะ (2017) พบว่าการอนุบาลลูกปลาคืออดแอตแลนติก (*Gadus morhua* L.) ปลาเรย์ครีบ ballan wrasse (*Labrus bergylta*) ด้วยโคฟีพอดเป็นระยะเวลา 7 วันหลังจากฟัก ช่วยให้ลูกปลามีการเจริญเติบโตและการรอดชีวิตดีกว่าในระยะยาวได้ เมื่อเทียบกับโรติเฟอร์ อย่างไรก็ตาม อาหารที่ใช้เพราะเลี้ยงโคฟีพอด เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณค่าทางโภชนาการของโคฟีพอด โดย Yaslan และคณะ (2021) ได้รายงานว่าลูกปลากัดระยะ juvenile ที่อนุบาลด้วยโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายเป็นอาหาร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และอัตราการรอดชีวิตสูงที่สุดถึง 2.56% และ 91% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับโคฟีพอดที่เลี้ยงด้วยแครอท ยีสต์ และรำข้าว

## 2.5 โคฟีพอด *Apocyclops royi*

โคฟีพอด *Apocyclops royi* เป็นโคฟีพอดเขตร้อน เป็นโคฟีพอดในกลุ่มไซโคพอยด์ อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำและในมวลน้ำ ลำตัวค่อนข้างใส มีเปลือกหุ้ม มีรูปร่างทรงกระบอกรูปไข่หรือรูปกระบอก มีตาเดี่ยว (single naupliar eye) มีข้อปล้องและรยางค์ที่ชัดเจน ร่างกายแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนหัวกับอก (Cephalothorax) มี 6 ปล้อง และส่วนท้อง (Abdomen) มี 5 ปล้อง และมีหนวดสั้นกว่ากลุ่มคาลานอยด์ (ธนิดา, 2559) โคฟีพอดเป็นแพลงก์ตอนที่เพาะเลี้ยงง่าย วงจรชีวิตสั้น มีการลอกคราบ (Metamorphosis) เพื่อพัฒนาขนาดและรูปร่าง โดยจะลอกคราบ 10 ครั้งก่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัย ระยะตัวอ่อนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 15-16 วัน ตัวอ่อนของโคฟีพอดมี 2 ระยะ ระยะแรกคือ ระยะนอเพลียส (nuplius larva) แบ่งเป็น 6 ระยะ ระยะที่สองคือ ระยะโคฟีโพติด (copepodid larva) แบ่งเป็น 6 ระยะ และหลังระยะโคฟีโพติดที่ 5 จะเป็นตัวเต็มวัย (adult) (พิชญา, 2559) และมีขนาดหลากหลายตามช่วงของระยะพัฒนาการ โดยระยะนอเพลียส มีขนาดลำตัวตั้งแต่ 80-150 ไมโครเมตร ซึ่งเล็กกว่าระยะนอเพลียสของอาร์ทีเมียที่มีขนาด 400-500 ไมโครเมตร ระยะโคฟีโพติดมีขนาดตั้งแต่ 300 ไมโครเมตรขึ้นไป ดังรูปที่ 6 (มะลิวัลย์, 2562; วิไลลักษณ์, 2565)



รูปที่ 6 โคพีพอด *Apocyclops royi*

(a) ระยะนอเพลียส (b) โคพีพอดิต (c) และตัวเต็มวัย

ขีดสีดำ แสดงความยาว 200 ไมโครเมตร

ที่มา : Amparyup และคณะ (2022)

### 2.5.1 สารอาหารในโคพีพอด *Apocyclops royi*

นอกจากขนาดและรูปแบบการว่ายน้ำที่น่าสนใจ โคพีพอด *A. royi* ยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเฉพาะกรดไขมัน ซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำวัยอ่อน โดยจากงานวิจัยของ Amparyup และคณะ (2022) พบว่าโคพีพอด *A. royi* ในระยะโคพีพอดิต และระยะตัวเต็มวัยจะมีปริมาณ PUFAs จำพวกโอเมกา-3 สูง อย่างไรก็ตามพบว่า โคพีพอด *A. royi* สามารถสังเคราะห์ DHA ได้ ผ่านวิถี LC-PUFA biosynthesis pathway ในทุกระยะของการเติบโต ตั้งแต่ระยะนอเพลียส ระยะโคพีพอดิต ไปจนถึงระยะตัวเต็มวัย แม้ว่าจะเพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มี polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ต่ำ ดังนั้นจึงทำให้ *A. royi* มี LC-PUFAs จำพวก DHA และ EPA สูงขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis suecica* ซึ่งมีปริมาณ DHA ต่ำ

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดไขมัน DHA และ EPA ในโคพีพอด *A. royi* ที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp.

กรดไขมัน	ระยะนอเพลียส	ระยะโคพีพอดิต	ระยะตัวเต็มวัย
EPA	2.63	2.56	2.49
DHA	2.78	4.57	5.47
$\Sigma$ n-3 PUFA	7.02	24.83	25.02
$\Sigma$ PUFA	13.43	39.67	40.15

ที่มา : Amparyup และคณะ (2022)

อย่างไรก็ตาม นอกจากสารอาหารที่กินเข้าไป จุลินทรีย์หรือไมโครไบโอมเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญ ที่ส่งผลต่อสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันของปลา

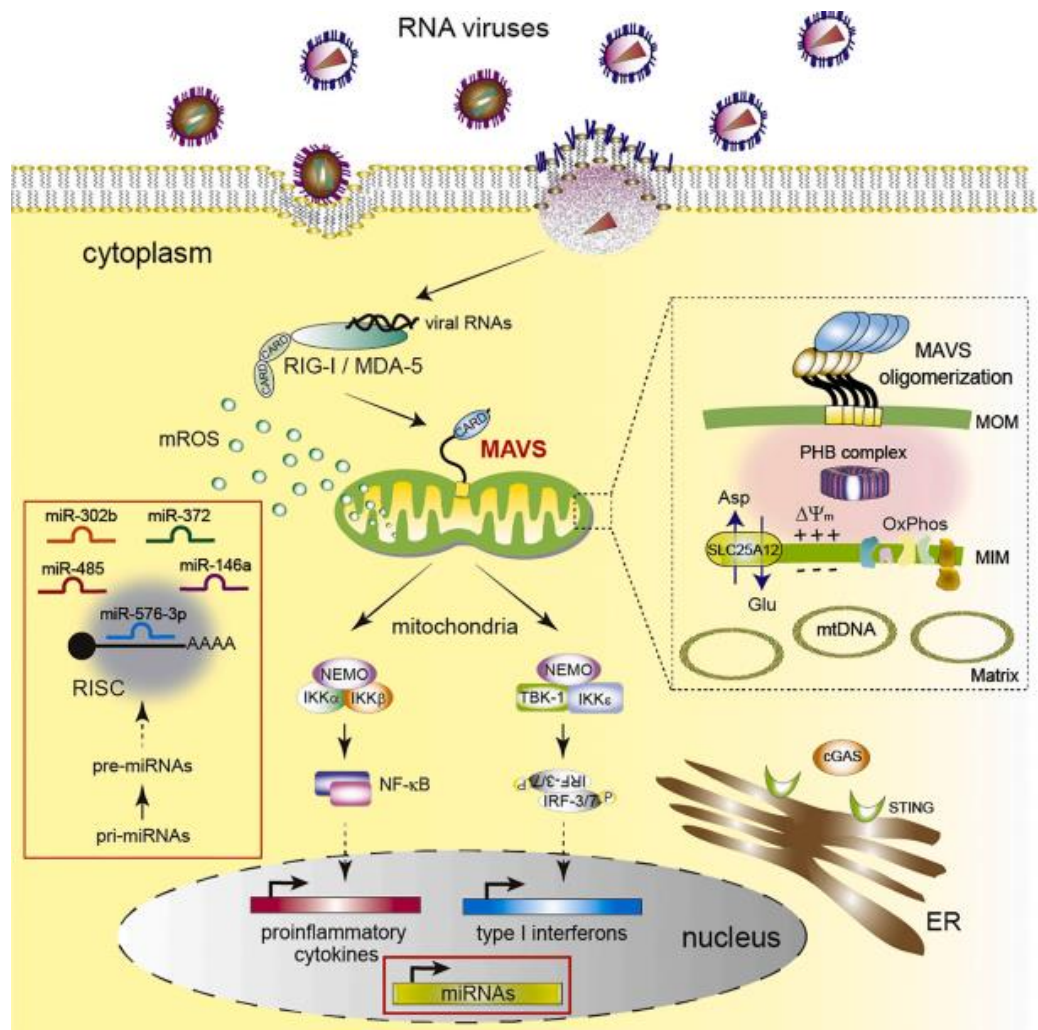
## 2.6 ไมโครไบโอม

ไมโครไบโอม (microbiome) คือ “พันธุกรรมหรือจีโนมทั้งหมดของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกัน” เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัส รา และแคททิโอเฟจ เป็นต้น การวิเคราะห์ไมโครไบโอม เป็นการศึกษาประชากรจุลินทรีย์ในเจ้าบ้าน (host) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต สุขภาพ และการเกิดโรคของเจ้าบ้าน (จุฑามาศ, 2564) ไมโครไบโอมในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ จะเกี่ยวข้องกับการย่อยและการดูดซึมอาหาร การพัฒนาผนังลำไส้ การสร้างพลังงาน การสร้างกระดูก และการสร้างภูมิคุ้มกันร่างกายของสัตว์ (Kogut and Arsenault, 2016) โดยพบว่าไมโครไบโอมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความสัมพันธ์กับไมโครไบโอมในสิ่งแวดล้อมและไมโครไบโอมในอาหาร เทคโนโลยีที่นิยมใช้ในการศึกษาไมโครไบโอม ได้แก่ เทคนิค 16S rRNA sequencing ใช้จำแนกชนิดของแบคทีเรีย เทคนิค ITS-PCR ใช้จำแนกชนิดของราซึ่งสามารถตรวจจุลินทรีย์และครอบคลุมชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ได้เกือบ 100% ในตัวอย่างที่ศึกษา (จุฑามาศ, 2564)

Gruneck และคณะ (2022) ได้ทำการศึกษา gut microbiome ในปลากัดไทยที่อายุต่าง ๆ ที่ทำการเพาะเลี้ยงด้วยไรแดงน้ำจืด พบว่าปลากัดโตเต็มวัยอายุ 24 สัปดาห์ จะมีความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ลดลงเมื่อเทียบกับปลากัดที่อายุน้อยกว่า โดยไฟลัม proteobacteria จัดเป็นไฟลัมที่พบได้มากที่สุดทั้งในปลากัดวัยอ่อนและตัวเต็มวัย พบมากถึงประมาณ 80% และสกุล (genus) *Plesiomonas* เป็นสกุลที่พบได้มากในปลากัดเพศผู้อายุ 24 สัปดาห์ ในทางกลับกันจะพบสกุล *Psuedomonas* ได้มากในปลากัดอายุ 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ *Aeromonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค เป็นอีกหนึ่งสกุลที่พบได้มากในลำไส้ปลากัดไทยทุกช่วงวัย โดยจะพบมากขึ้นในปลากัดอายุ 24 สัปดาห์เมื่อเทียบกับปลากัดอายุ 8 สัปดาห์ แบคทีเรียทั้ง 3 สกุลที่กล่าวมา จัดอยู่ในไฟลัม proteobacteria ทั้งหมด

## 2.7 Mitochondrial antiviral signaling (MAVS)

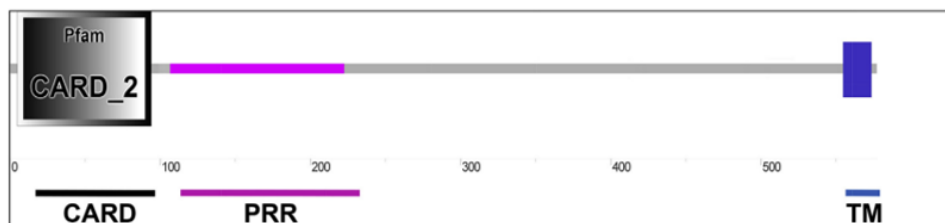
Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) หรือที่รู้จักในชื่อ Cardif / VISA / Interferon b Promoter Stimulator 1 (IPS1) (Krishnan et al., 2018) เป็นโปรตีนรับส่งสัญญาณที่สำคัญในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway ดังรูปที่ 7 ซึ่งจัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรกในการต้านไวรัส



รูปที่ 7 วิธี RIG-I-like receptor signaling pathway  
ที่มา : Yasukawa และ Koshiba (2021)

### 2.7.1 โครงสร้างของ MAVS

ยีน MAVS ในสายพันธุ์ของปลาน้ำจืดถูกอนุรักษ์ลำดับพันธุกรรม (orthologs) ไว้ (Biacchesi et al., 2009) จากรายงานของ Krishnan และคณะ (2018) พบว่าโปรตีน MAVS ของปลากะพงขาว *Lates calcarifer* มีบทบาทสำคัญในการต้านไวรัส โดยประกอบด้วย 3 โดเมนสำคัญ ได้แก่ N-terminal CARD-like domain, central proline-rich domain และ C-terminal trans-membrane domain ดังรูปที่ 8



รูปที่ 8 โดเมนสำคัญของโปรตีน MAVS ในปลากระพงขาว  
ที่มา : Krishnan และคณะ (2018)

N-terminal CARD domain ของโปรตีน MAVS มีความสำคัญในการรับสัญญาณโดยการจับกับ CARD domain ของตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัส เช่น Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) หรือ melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5 หรือ IFH1) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformation) ของ MAVS ดังรูปขยายในรูปที่ 7 และทำให้ MAVS อยู่ในสภาพ active พร้อมส่งสัญญาณต่อไป โดยขั้นตอนการจับกันของ CARD domain เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่มีผลต่อศักยภาพของวิถี RIG-I sig ส่วน C-terminal transmembrane domain มีบทบาทในการสะสมและยึดเกาะของ MAVS บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย (Yasukawa and Koshiba, 2021) การสะสมตัวของ MAVS บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรีย มีความจำเป็นต่อการส่งสัญญาณไปยังโมเลกุลอื่น ๆ ในลำดับถัดไป (Seth et al., 2005) อย่างไรก็ตาม ในสภาวะปกติการทำงานของ MAVS จะถูกควบคุมในเชิงลบ (negative regulated) และจะหยุดการควบคุมเชิงลบทันทีที่มีการติดเชื้อไวรัสเกิดขึ้น (Yasukawa and Koshiba, 2021)

### 2.7.2 กลไกการต้านไวรัสของ MAVS

เมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส โปรตีน MAVS จะทำงานประสานกับตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัส (pathogen recognition receptors; PRRs) 2 ชนิด ได้แก่ RIG-I และ MDA5 เพื่อกระตุ้นยีนต้านไวรัส โดยเริ่มจาก RIG-I และ MDA5 ตรวจจับอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัส (viral dsRNA) หลังจาก RIG-I และ MDA5 จับกับอาร์เอ็นเอสายคู่ของไวรัสแล้ว RIG-I และ MDA5 เคลื่อนที่มายังบริเวณไมโทคอนเดรีย จากนั้น CARD domain ของ RIG-I และ MDA5 จะจับกับ CARD ของ MAVS (CARD-CARD interactions) ทำให้โครงสร้าง (conformation) ของ MAVS มีการเปลี่ยนแปลง และทำให้เกิดการสะสม MAVS บริเวณ outer mitochondrial membrane (Krishnan et al., 2018; Yasukawa and Koshiba, 2021) จากนั้น activated MAVS จะสามารถแพร่กระจายสัญญาณกระตุ้นได้ด้วยตนเอง (Hou et al., 2011) และสามารถกระตุ้น MAVS โมเลกุลอื่น ๆ ได้ activated MAVS จะทำ

ให้เกิดการกระตุ้นโมเลกุลอื่น ๆ ต่อ เช่น nuclear factor-kB (NF-kB) และ interferon regulatory factor 3/7 (IRF 3/7) ซึ่งจะนำไปสู่การเหนี่ยวนำอินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 1 (type I IFN) และยีนที่กระตุ้นโดย IFN (Lauksund et al., 2009; Tait and Green, 2012) โดย IFN คือโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่จะช่วยไม่ให้ไวรัสแพร่กระจายไปยังเซลล์ใกล้เคียงได้ ช่วยส่งเสริมการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และการตอบสนองต่อการอักเสบ และช่วยกระตุ้น adaptive immune

จากงานวิจัยของ Krishnan และคณะ (2018) พบว่าโปรตีน MAVS ของปลากะพงขาว *Lates calcarifer* มีบทบาทสำคัญในการต้านไวรัส โดยพบว่าปลากะพงขาวที่ติดเชื้อ nervous necrosis virus (NNV) มีการแสดงออกของยีน MAVS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จากงานวิจัยของ Gao และคณะ (2022) พบว่าปลาเก๋าดอกแดง (*Epinephelus coioides*) ที่ติดเชื้อไวรัส NNV และการจำลองการติดเชื้อไวรัสด้วย poly(I:C) มีการแสดงออกของยีน Interferon (IFN)-induced protein 35 (IFI35) สูงขึ้น และยีนดังกล่าวก็จะกระตุ้นให้ยีน MAVS แสดงออกมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญผ่านการควบคุมเชิงบวกในวิถีภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และจากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2022) พบว่าปลาเรนโบว์เทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่ติดเชื้อ infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) มีการแสดงออกของยีน Tripartite motif proteins 25 (TRIM25) สูง โดยยีน TRIM25 ส่งเสริมการจับของ MAVS กับตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัสในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway จึงกระตุ้นยีน MAVS ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า MAVS เป็นตัวกลางในการการเหนี่ยวนำอินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 1 (type I IFN) และยีนที่กระตุ้นโดย IFN ซึ่งมีบทบาทให้การต้านไวรัสได้ดีทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอไวรัส เช่น infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), hiram rhabdovirus (HIRRV), viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), marine birnavirus (MABV) และ redspotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) เป็นต้น (Biacchesi et al., 2009; Lauksund et al., 2009; Simora et al., 2010; Kasthuri et al., 2014; Jia et al., 2016) อย่างไรก็ตาม ในปลากัดมีรายงานการค้นพบยีน MAVS (Amparyup et al., 2020) แต่ยังไม่มีการศึกษาวิจัยมาก่อน

## 2.8 เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนเป้าหมายผ่านการถอดรหัสเป็นอาร์เอ็นเอ โดยเริ่มจากการทำปฏิกิริยา Reverse transcription ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสารพันธุกรรมชนิด RNA ให้เป็น complementary DNA (cDNA) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ Oligo(dT) primer ซึ่งจะจำเพาะกับอาร์เอ็นเอที่เป็น Poly (A) เท่านั้น จากนั้นนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาเป็นแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือ พีซีอาร์ (PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเป้าหมาย โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องใช้ส่วนประกอบได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template), เอนไซม์ DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphate (dNTPs) ทั้ง 4 ชนิด, โพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะอาศัยการทำปฏิกิริยาต่อเนื่องหลายรอบ ในแต่ละรอบดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณของรอบก่อนหน้า โดยแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้ (1) Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว โดยการเพิ่มอุณหภูมิที่ 90-95 องศาเซลเซียส (2) Annealing เป็นการลดอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้โพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอแม่แบบ และให้เอนไซม์ DNA polymerase สร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากโพรเมอร์ (3) Extension เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอในทิศทาง ทิศทาง 5' ไป 3' โดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เขาที่ปลาย 3' ของโพรเมอร์โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ 2563; Gibthai training center, 2018)



### บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 ตัวอย่าง

ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ประเทศไทย ดังนี้

- ตัวอย่างลูกปลากัดไทย *Betta splendens* 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi* และกลุ่มที่ 2 คือลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยไรแดงน้ำจืด (*Moina* sp.) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ตัวอย่างดังกล่าวผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน โดยเริ่มเลี้ยงตั้งแต่วัยแรกเกิดอายุประมาณ 3 วัน และทำการเก็บตัวอย่างลูกปลากัดที่ผ่านการทดลองโดยแช่แข็งทั้งตัวในไนโตรเจนเหลว เก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปสกัด RNA และ DNA
- cDNA จากตัวอย่างลำไส้ปลากัด 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ ปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสโดยการฉีดกรดนิวคลีอิกเลียนแบบ polyinosinic-polycytidylic acid (5 ug poly(I:C) ต่อ น้ำหนักปลา 1 กรัม) กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมโดยฉีดสารละลาย phosphate-buffer saline (PBS) เก็บตัวอย่างลำไส้ปลากัดแต่ละกลุ่มที่ 0, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังฉีดสารกระตุ้นภูมิ

#### 3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

##### สารเคมีในการสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

- Trizol™ reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
- Chloroform
- Isopropanol
- Ethanol (Merck, Germany)
- DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Nuclease free water (Thermo Fisher Scientific, USA)

##### สารเคมีในการสังเคราะห์ cDNA

- RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

ประกอบด้วย RevertAid RT (200 U/ $\mu$ L)

RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ $\mu$ L)

5X Reaction Buffer

10 mM dNTP Mix

100  $\mu$ M Oligo(dT)18 Primer

#### สารเคมีในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน

- PCR water
- 10X Taq buffer with  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 25 mM Magnesium chloride ( $\text{MgCl}_2$ ) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 100 mM dATP, dTTP, dCTP และ dGTP
- Tag DNA polymerase (5 U/ $\mu$ L) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- GeneRuler 100bp plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Agarose (Vivantis, USA)
- Tris (Vivantis, USA)
- Boric acid (Merck, Germany)
- Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (EDTA) (KemAus, Australia)
- Ethidium bromide (Sigma-Aldrich, Germany)

#### สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

- 100 mM Tris-HCl
- 100 mM EDTA pH 8.0
- 250 mM NaCl
- SDS
- RNase A (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Proteinase K
- Phenol
- Chloroform

- Isoamyl alcohol
- Sodium acetate
- Absolute ethanol

#### สารเคมีในการทำ DNA ให้บริสุทธิ์

- NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL)  
ประกอบด้วย Binding buffer NT1  
Washing buffer NT3  
NucleoSpin gel and PCR clean-up columns (yellow rings)  
Collection tubes

#### อุปกรณ์

- Autoclave (TOMY, Japan)
- Handheld salinity refractometer
- Aquarium air pump
- Micropipettes (Labnet International, USA)
- - 80°C Freezer (Sanyo, Japan)
- - 20°C Freezer (Mitsubishi electric, Japan)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Latvia)
- Microcentrifuge (Tomy, Japan)
- WiseSpin microcentrifuge CF-10 (Witeg, Germany)
- Refrigerated Microcentrifuge (Tomy, Japan)
- Chemical Fume Hood
- Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Thermal cycle (Bio-Rad, Germany)
- Microwave
- Submarine Electrophoresis System (Mupid, Japan)
- Gel documentation

### 3.3 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.3.1 การศึกษาผลของโคพิพอดในการเป็นอาหารมีชีวิตต่อภูมิคุ้มกันของลูกปลากัด

##### 3.3.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA)

นำตัวอย่างลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพิพอด และตัวอย่างลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยไรแดง (กลุ่มควบคุม) กลุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำ มาบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อเพื่อทำให้เซลล์แตก จากนั้นสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) โดยเติม TRIzol™ Reagent ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 2 นาที เพื่อผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเศษเซลล์ (cell debris) ที่ไม่ต้องการออก ดูดแยกสารละลายส่วนใสใสไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วอร์เทกซ์เป็นเวลา 2 นาที วางบนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอ โปรตีน และสารอินทรีย์อื่นๆ ในขั้นตอนนี้สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น อาร์เอ็นเอจะถูกแยกอยู่ในสารละลายส่วนใสชั้นบน ดูดเฉพาะสารละลายส่วนใสชั้นบนใสไมโครทิวบ์หลอดใหม่ได้ประมาณ 500 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวติดบริเวณก้นหลอด ดูดสารละลายใสทิ้ง เติมเอทานอล (ethanol) เข้มข้น 75% (%v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอทานอลทิ้ง เปิดฝาวางไว้เพื่อให้เอทานอลระเหยจนหมด จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease free water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาย่อยสลายดีเอ็นเอ โดยปรับปริมาตรสารละลายอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสให้ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อย่อยสลายดีเอ็นเอ เติม TRIzol™ Reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร วอร์เทกซ์เป็นเวลา 2 นาที เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วอร์เทกซ์เป็นเวลา 2 นาที แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น โดยดีเอ็นเอจะอยู่ชั้นล่าง อาร์เอ็นเอจะถูกแยกอยู่ในสารละลายส่วนใสชั้นบน ดูดเฉพาะสารละลายส่วนใสชั้นบนใสไม่โครทิวบ์หลอดใหม่ ได้ประมาณ 250 ไมโครลิตร เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะได้ตะกอนอาร์เอ็นเอสีขาวติดบริเวณก้นหลอด เปิดสารละลายใส่ที่ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทานอลเข้มข้น 75% (%v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิดเอทานอลทิ้ง เปิดฝาวางไว้เพื่อให้เอทานอลระเหยจนหมด ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเออีกครั้งด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

### 3.3.1.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

สร้าง cDNA ด้วย RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA) โดยผสมสารสกัดอาร์เอ็นเอปริมาณ 1500 นาโนกรัม, ไพริเมอร์ Oligo(dT)<sub>18</sub> ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสให้มีปริมาตรรวม 12 ไมโครลิตร โดยผสมลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR) ทั้งนี้สามารถคำนวณปริมาตรได้ตามตารางที่ 3 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในเครื่อง Thermal cycler เมื่อครบเวลาให้แช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

ตารางที่ 3 การคำนวณสารเคมีในการสังเคราะห์ First strand cDNA 1500 นาโนกรัม

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
RNA ( $A$ ng/ $\mu$ l)	$1500 \div A$
100 $\mu$ M Oligo(dT) <sub>18</sub> primer	1
Nuclease free water	$11 - (1500 \div A)$

\*  $A$  แทนความเข้มข้นของสารสกัดอาร์เอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง

สังเคราะห์ดีเอ็นเอคู่สม (cDNA) โดยผสมสารเพิ่มตามตารางที่ 4 จะได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร นำสารที่ผสมเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรม 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ

12 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลาย cDNA ย้ายใส่หลอดไมโครทิวบ์และเก็บที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4 สารเคมีในการสังเคราะห์ cDNA

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
5X reaction buffer	4
10 mM dNTP mix	2
Ribolock RNase inhibitor (200 U/ $\mu$ l)	1
RevertAid RT (20 U/ $\mu$ l)	1

### 3.3.1.3 การศึกษาการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในลูกปลากัดที่เลี้ยง ด้วยโคฟีพอด

เจือจาง cDNA ในอัตราส่วน 1:10 โดยผสม cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับน้ำ ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสปริมาตร 9 ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระบบ ภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ และใช้ยีน *BsEF1a* เป็นยีนควบคุม ดังตารางที่ 5 และเตรียมสารดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการทำ RT-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
<i>BsMAVS-F</i>	CATCATCAGCAAGCAAGAAGTC
<i>BsMAVS-R</i>	CTTACACGCACACCTGAGAAAG
<i>BsLEAP2C-F</i>	GTCTAAGGACTGGAGTGGCTTG
<i>BsLEAP2C-R</i>	TCAAGCCTCTGTATCAGAGCAG
<i>BsEF1a-F</i>	CCCATGGCAGCTGATAACTTCA
<i>BsEF1a-R</i>	CATGGGTTTTCCAGGCACCA

ตารางที่ 6 สารเคมีในการทำ RT-PCR

สารเคมี	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
PCR water	10.3*, 12.3**
10X Taq buffer	2.5

25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
1 mM dNTPs	2.5
2 μM Forward gene primer (F)	2.5
2 μM Reverse gene primer (R)	2.5
Tag DNA polymerase (5 U/μl)	0.2
1:10 diltion of cDNA	3*, 1**
<b>ปริมาตรรวม</b>	<b>25</b>

\* สำหรับตัวอย่างปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด

\*\* สำหรับตัวอย่างปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส

ทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ สำหรับยีน *BsMAVS* 25 รอบ สำหรับยีน *BsLEAP2C* 22 รอบ สำหรับยีน *BsEF1a* และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.8% (%w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE กระแสไฟฟ้า 100V ในการแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ ตรวจสอบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel documentation แสดงผลรูปเจลผ่านโปรแกรม GeneSys นำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในรูปเจลมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม Gel-Pro analyzer 3.1 คำนวณค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (relative mRNA expression) จากสมการที่ 1 โดยใช้ยีน *BsEF1a* เป็นยีนควบคุม (internal control gene) โดยศึกษาการแสดงออกของยีน 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0 ด้วยวิธี independent sample T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

$$\text{Relative mRNA expression} = \frac{\text{ความเข้มของแถบยีน } BsMAVS}{\text{ความเข้มของแถบยีน } BsEF1a} \quad (1)$$

### 3.3.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส

นำ cDNA ที่สังเคราะห์จากตัวอย่างลำไส้ปลากัดหลังจำลองการติดเชื้อไวรัสที่เวลา 0, 6, 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยการฉีดสารกระตุ้นภูมิ poly(I:C) และกลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลาย PBS กลุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำ มาทำการเจือจาง cDNA ในอัตราส่วน 1:10 โดยผสม cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับน้ำปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอสปริมาตร 9 ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ดังตาราง 5 และเตรียมสารตั้งตารางที่ 6 ทำพีซีอาร์ (PCR) ด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นจำนวน 35 รอบ สำหรับยีน *BsMAVS* 27 รอบ สำหรับยีน *BsEF1a* และสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.8% (%w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE กระแสไฟฟ้า 100V ในการแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ ตรวจสอบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel documentation แสดงผลรูปเจลผ่านโปรแกรม GeneSys นำแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในรูปเจลมาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม Gel-Pro analyzer 3.1 คำนวณค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (relative mRNA expression) จากสมการที่ 1 โดยใช้ยีน *BsEF1a* เป็นยีนควบคุม (internal control gene) โดยศึกษาการแสดงออกของยีน 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation, SD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS Version 28.0 ด้วยวิธี independent sample T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

### 3.3.3 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *BsMAVS* จากฐานข้อมูลของปลากัดไทย *B. splendens*

#### *splendens*

นำข้อมูลยีน *BsMAVS* จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* (Amparyup et al., unpublished data) มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ExpASY (<https://www.expasy.org>) ทำนายโดเมนที่สำคัญของโปรตีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ทำนาย transmembrane domain ด้วยโปรแกรม TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) ทำนายเพปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal peptide) ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) เปรียบเทียบ



ความเหมือนกันกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ทำ genomic organization โดยเปรียบเทียบกับยีน BsMAVS (Gene ID : 114848314) จากฐานข้อมูลจีโนมิกส์ของปลากัดไทยใน NCBI

### 3.3.4 การศึกษาไมโครไบโอม (Microbiome) ของลูกปลากัด

#### 3.3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ (DNA)

นำตัวอย่างลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด และตัวอย่างลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยไรแดง (กลุ่มควบคุม) กลุ่มตัวอย่างละ 3 ซ้ำ มาบดให้ละเอียดด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อเพื่อให้เซลล์แตก จากนั้นสกัดดีเอ็นเอในสารละลายบัฟเฟอร์ TEN ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม 10% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% (%w/v) กำจัด RNA โดยเติม Rnase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวอร์เทกซ์ เป็นเวลา 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม proteinase K เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 11 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกสารละลายส่วนใสใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ เติม equilibrated phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใส) พลิกไปมาเป็นเวลา 15 นาที เพื่อผสมให้กัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสอีกครั้งโดยดูดแยกสารละลายส่วนใสใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ เติม equilibrated phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายส่วนใส) พลิกไปมาเป็นเวลา 15 นาที เพื่อผสมให้กัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เติม phenol-chloroform-isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 เป็นปริมาตร 1 เท่า พลิกไปมาเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกสารละลายส่วนใสใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ เติม chloroform-isoamyl alcohol อัตราส่วน 24:1 เป็นปริมาตร 1 เท่า พลิกไปมาเป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารละลายส่วนใสชั้นบนใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1/10 ประมาณ 50 ไมโครลิตร เติม chilled absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทออก ล้างตะกอนด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% (%v/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปิดเอทานอลทิ้ง เปิดฝาวางไว้เพื่อให้เอทานอลระเหยจนหมด

ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 2 ครั้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.2% (%w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE กระแสไฟฟ้า 100V ตรวจสอบความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอโดยย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ถ่ายรูปเจลด้วยเครื่อง Gel documentation แสดงผลรูปเจลผ่านโปรแกรม GeneSys

### 3.3.4.2 การเพิ่มจำนวน 16S amplicon ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จากนั้นนำมาเพิ่มจำนวน 16S amplicon ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะดังตารางที่ 7 และเตรียมสารดังตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ในการเพิ่มจำนวน 16S amplicon

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
16S Amplicon PCR Forward primer	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCC TACGGGNGGCWGCAG
16S Amplicon PCR Reverse primer	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG ACTACHVGGGTATCTAATCC

ตารางที่ 8 สารเคมีในการทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S amplicon

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
PCR water	12.3
10X Taq buffer	2.5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	1.5
1 mM dNTPs	2.5
2 μM Forward gene primer (F)	2.5
2 μM Reverse gene primer (R)	2.5
Tag DNA polymerase (5 U/μl)	0.2

DNA (50 ng/ $\mu$ l)	1
<b>ปริมาตรรวม</b>	<b>25</b>

ทำพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction, PCR) ด้วยเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที เป็นจำนวน 30 รอบ และสุดท้ายที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) มา วิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกา โรสเข้มข้น 1.8% (%w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE กระแสไฟฟ้า 100V ในการแยกขนาดแถบ ดีเอ็นเอ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ถ่ายรูป เจลด้วยเครื่อง Gel documentation แสดงผลรูปเจลผ่านโปรแกรม GeneSys

### 3.3.4.3 ทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) 16S amplicon ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี PCR clean-up โดยใช้ NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit ผสมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และสารละลาย binding buffer NT1 ใน อัตราส่วน 1 : 2 ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปตขึ้นลง แล้วนำสารละลายมาผ่านคอลัมน์ ทำปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เติมสารละลายที่เหลือและปั่นเหวี่ยงซ้ำจนหมด จากนั้นล้างโดยการ เติม wash buffer NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที (ล้าง 2 ครั้ง) จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเมื่อให้เมมเบรนแห้งที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้าย คอลัมน์ใส่หลอดใหม่ เติม PCR water ลงไปตรงกลางเนื้อเยื่อคอลัมน์ ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ไซดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำ สารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) 16S amplicon ที่ผ่านการทำ PCR clean-up มาทำให้บริสุทธิ์โดยการ elute gel โดยแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรี ซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.8% (%w/v) ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 1X TBE กระแสไฟฟ้า 100V ในการแยกขนาดแถบดีเอ็นเอ จากนั้นตัดเจลตามแถบดีเอ็นเอ ของ 16S amplicon จากนั้นทำให้บริสุทธิ์ด้วย NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit โดยนำ

ชั้นเจลละลายในสารละลาย binding buffer NT1 ในอัตราส่วนน้ำหนักเจล 100 มิลลิกรัมต่อบัฟเฟอร์ 200 ไมโครลิตร โดยทำการละลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว นำสารละลายมาผ่านคอลัมน์ ทำปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เติมสารละลายที่เหลือและปั่นเหวี่ยงซ้ำจนหมด จากนั้นล้างโดยการเติม wash buffer NT3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที (ล้าง 2 ครั้ง) จากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเมื่อให้เมมเบรนแห้งที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ เติม PCR water ลงไปตรงกลางเนื้อเยื่อคอลัมน์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที สะเด็ดน้ำโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer

#### 3.3.4.4 การวิเคราะห์ไมโครไบโอม

ส่งตัวอย่าง 16S amplicon เพื่อทำการวิเคราะห์ Microbiome ที่ศูนย์วิทยาศาสตร์  
โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

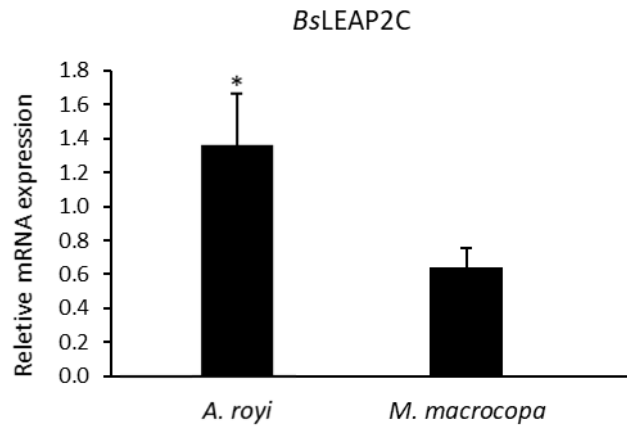
## บทที่ 4

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 การแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด

อาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำวัยอ่อน งานวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของโคฟีพอดในการเป็นอาหารมีชีวิตต่อภูมิคุ้มกันของลูกปลากัดวัยอ่อน เปรียบเทียบกับไรแดงน้ำจืดซึ่งเป็นอาหารมีชีวิตที่ใช้ในการเลี้ยงลูกปลากัดในปัจจุบัน โดยนำ cDNA (เจือจางในอัตราส่วน 1:10) ของตัวอย่างลูกปลากัดไทย *B. splendens* 2 กลุ่ม ได้แก่ ลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi* และลูกปลากัดกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และตรวจสอบด้วย 1.8% agarose gel electrophoresis

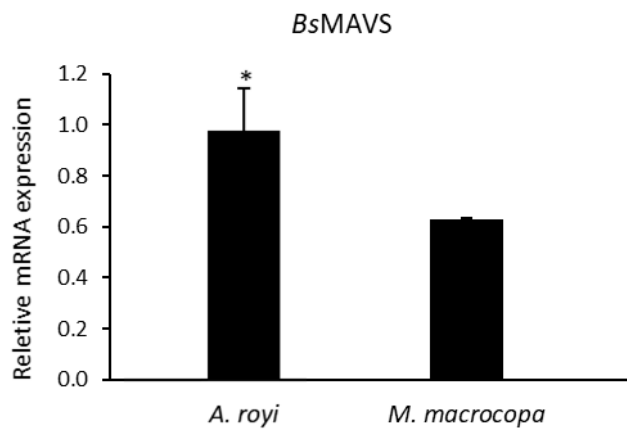
จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน โดยการนำรูปเจลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gel-Pro analyzer 3.1 โดยใช้ยีน *BsEF1a* เป็นยีนควบคุม (internal control gene) พบว่าลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi* มีระดับการแสดงออกของยีน *BsLEAP2C* และยีน *BsMAVS* เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยไรแดงน้ำจืด *Moina* sp. (รูปที่ 9 และ 10) แสดงให้เห็นว่าโคฟีพอดมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *BsLEAP2C* ซึ่งเป็นยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพและยีน *BsMAVS* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อไวรัสได้ดีกว่าไรแดงน้ำจืด สอดคล้องกับรายงานของ Abbaszadeh (2022) ซึ่งพบว่ากุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอดมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับอาหารมีชีวิตดั้งเดิม เช่น โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย โดยคาดว่าเป็นผลมาจากปริมาณกรดไขมัน DHA ที่พบในโคฟีพอดและไรแดง ซึ่งเท่ากับ 5.47 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Amparyup et al., 2022; Suhaimi et al., 2022) เนื่องจากปริมาณของ DHA มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Eslamloo et al., 2017)



**รูปที่ 9** ระดับการแสดงออกของยีน *BsLEAP2C* ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi*

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD คำนวณจาก 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง

\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



**รูปที่ 10** ระดับการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi*

ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD คำนวณจาก 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง

\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2 ลักษณะสมบัติของยีน *BsMAVS* ในปลากัด

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน MAVS ของปลากัดไทย *B. splendens* (Amparyup et al., unpublished data) ด้วยโปรแกรม ExPasy พบว่ายีน *BsMAVS* มี open reading frame (ORF) ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 569 กรดอะมิโน (รูปที่ 11) มีน้ำหนักโมเลกุล 60.8 kDa และค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.79 และจากการวิเคราะห์หาคำแหน่งโดเมนที่สำคัญด้วยโปรแกรม SMART และวิเคราะห์ Transmembrane domain ด้วยโปรแกรม THMM พบว่า *BsMAVS* ประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ ได้แก่ N-terminal Caspase recruitment domain (CARD) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 5-94, proline-rich domain (PRR) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 57-328 และ C-terminal transmembrane domain (TM) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 550-567 (รูปที่ 12) สอดคล้องกับโดเมนสำคัญของยีน MAVS ที่มีรายงานในปลากะพงขาว *Lates calcarifer* โดยเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส ตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัส ได้แก่ MDA-5 จะตรวจจับ viral dsRNA จากนั้น CARD domain ของ MDA5 จะเข้าไปจับกับ CARD domain ของ MAVS ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีน MAVS บริเวณ outer mitochondrial membrane โดยอาศัย C-terminal transmembrane domain (Krishnan et al., 2018; Yasukawa et al., 2021)

```

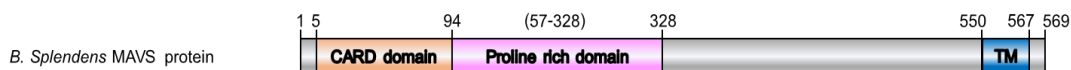
atg tcg tat gcc agt gaa aaa ctg cgt aaa gga tac ctg cgg agg aaa atg gcg gtt att
M S Y A S E K L R K G Y L R R K M A V I
gta tcc aat gtg aaa gtg aaa gaa ata att gtc cgc ctg cct tgc ttg act gat cat gac
V S N V K V K E I I V R L P C L T D H D
agg gac act ata gaa gcc aaa aca gag aca cgc gcc aac ttt gat ggg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

```

### รูปที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *BsMAVS* ของปลากัดไทย *B. splendense*

จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ExPASy กรดอะมิโนแสดงด้วยตัวย่อล่างนิวคลีโอไทด์แต่ละโคดอน (codon) ตัวอักษรสีแดงแสดงถึง CARD domain ตัวอักษรสีชมพูแสดงถึง Proline rich domain และตัวอักษรสีน้ำเงินแสดงถึง TH domain





รูปที่ 12 โดเมนสำคัญของโปรตีน *BsMAVS*

สีส้ม, ชมพู และน้ำเงิน แสดงถึง CARD domain, proline rich domain and transmembrane domain ตามลำดับ

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของกรดอะมิโน (sequence alignment) ของโปรตีน *BsMAVS* กับโปรตีน MAVS ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastP พบว่า *BsMAVS* มีความเหมือนกับโปรตีน MAVS ของปลาเสือพ่นน้ำลายบั้ง *Toxotes jaculatrix* มากที่สุด (71% identity) ปลากระพงขาว *Lates calcarifer* (67% identity) และปลาหมอเทศข้างลาย *Oreochromis aureus* (67% identity) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความเหมือนของโปรตีน *BsMAVS* กับโปรตีน MAVS ในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

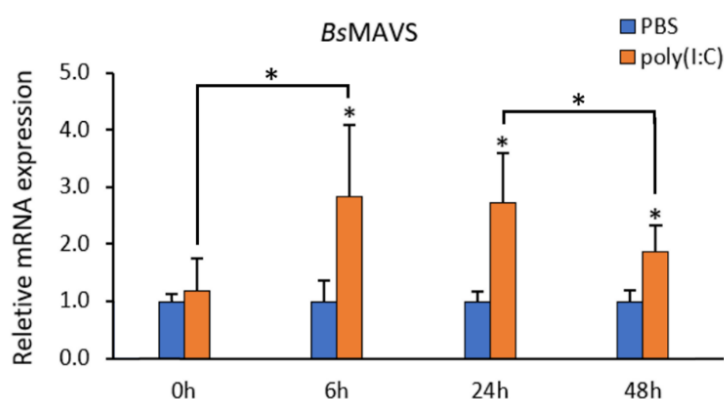
โปรตีน MAVS ในสิ่งมีชีวิตอื่น	%identity
ปลาเสือพ่นน้ำลายบั้ง <i>Toxotes jaculatrix</i>	71
ปลากระพงขาว <i>Lates calcarifer</i>	67
ปลาหมอเทศข้างลาย <i>Oreochromis aureus</i>	67

<b>CARD domain</b>		
BsMAVS	-----MSYASEKLRKGYLRRKMAVIVSNVKVEIIVRLPCLTDHDDRTIEAK	47
XP_028994560.1	-----MSYASEKLRKGYLRRKMAVIVSNVKVEIIVRLPCLTDHDDRTIEAK	47
XP_026195752.1	-----MSFASEKLRKGYLRRKMAVIVSNVKVEIIVRLPCLTDHDDRTIEAK	47
AHX56245.1	-----MSFASDKLYKGYLRRKMAVIVSNVKVEIIVRLPCLTDHDDRTIEAK	47
XP_035530403.1	-----MSYANDKLYKGYMRRNMPTIVSQVKREIVTHLPCLDHDDRTIEAK	47
XP_035530402.1	MCVKRTAQVVTVREKHPRRRHEELKTGKMSYANDKLYKGYMRRNMPTIVSQVKREIVTHLPCLDHDDRTIEAK	75
AKG54866.1	-----TAQVVTVREKHPRRRHEELKTGKMSYANDKLYKGYLRRNMPAIVSQVKREIVTHLPCLDHDDRTIEAK	70
XP_051237705.1	-----MSYASDKLYKGYLRRNMPAIVSQVKREIVTHLPCLDHDDRTIEAK	47
**.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.* **.*.*		
<b>Proline rich domain</b>		
BsMAVS	TETRGNFDGMVLLLDCLKRRENWPEQLIEALEACEHPTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
XP_028994560.1	TETRGNFDGMVLLLDCLKRRENWPEQLIEALEACEHPTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
XP_026195752.1	RENNGNFDGMVLLLDCLKRRENWPEQLIEALEACEHPTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
AHX56245.1	RETSNGFNMGELLVDCLKRRENWPEQFIKALEACEHLTLADEIRAEYDALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
XP_035530403.1	RETGNGVDSMVLDDCLKRRESWPEQFIRALEEELFTTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
XP_035530402.1	RETGNGVDSMVLDDCLKRRESWPEQFIRALEEELFTTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	150
AKG54866.1	RETGNGVDSMVLDDCLKRRESWPEQFIRALEEELFTTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	145
XP_051237705.1	RETGNGVDSMVLDDCLKRRESWPEQFIRALEEELFTTLAAEIRAEYNALRGINDSNPSP--SSIVNAHVHPPPS	122
* . **.*		
BsMAVS	ATELFPVQGAEKSTSNVAPSEPE-----VSPKPNVPRQADQSPAQFTGAASLPES--VPPESTDIEAA	189
XP_028994560.1	ATELFPVQGAEKSTSNVAPSEPE-----VSPKPNVPRQADQSPAQFTGAASLPES--VPPESTDIEAA	189
XP_026195752.1	GSHLFTPESGK--SQATVAPSAEAPTLEPVAAHTTQPETPVHAAQ--SPAQIIPRDLVPP--KPPRAIEIEVA	196
AHX56245.1	ASHLSIPESGGNSQAAVSLPAEASAPPEAAQASPPLEIPVQPAQNAQAQVPEAVSPPEVAEPPPOPTHVIVA	197
XP_035530403.1	ASQLSIPESGGNSQVAVPPEASASPEAAQSPPEVPEVQVQAPP--AAQVPEAVAPPELVAEPPQSAQIEAA	197
XP_035530402.1	ASQLSIPESGGNSQVAVPPEASASPEAAQSPPEVPEVQVQAPP--AAQVPEAVAPPELVAEPPQSAQIEAA	225
AKG54866.1	ASQLSIPESGGNSQVAVPPEASASPEAAQSPPEVPEVQVQAPP--AAQVPEAVAPPELVAEPPQSAQIEAA	220
XP_051237705.1	ASQLSIPESGGNSQVAVPPEASASPEAAQSPPEVPEVQVQAPP--AAQVPEAVAPPELVAEPPQSAQIEAA	197
..* .**.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
BsMAVS	PLPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	257
XP_028994560.1	PLPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	257
XP_026195752.1	PLPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	263
AHX56245.1	PPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	272
XP_035530403.1	PAPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	270
XP_035530402.1	PAPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	298
AKG54866.1	PAPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	293
XP_051237705.1	PAPSTPPSPETQRAVPVATPPVPPQRELVHQEPEENSDDSDIQDITGGTGIIPQVETGTSM--ISSVVPAPPSCP	270
* . **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
BsMAVS	VEHSKTDALPCSEPLQ---TITEVKPPQSPPPPQKQPSVNDQSAFLTRTPEKGFVQDTPPVGGVPG--TVLEPEQ	329
XP_028994560.1	VEHSKTDALPCSEPLQ---TITEVKPPQSPPPPQKQPSVNDQSAFLTRTPEKGFVQDTPPVGGVPG--TVLEPEQ	329
XP_026195752.1	VEQSETDLSCESESLQTTTITEIRAPQSPPTQTNSHVTDRSSFPIITPEKPPVQDTPPVLEKVPV--VLEPEE	338
AHX56245.1	VEQSETDLSCESESLQTTTITEIRAPQSPPTQTNSHVTDRSSFPIITPEKPPVQDTPPVLEKVPV--VLEPEE	340
XP_035530403.1	VEECETD-----SLQTT-TTTEAGPPRSPSPTQIDSDVTDGSSFEATLPEKPPVQDTPPVVDIKPAAAVLQPEE	338
XP_035530402.1	VEECETD-----SLQTT-TTTEAGPPRSPSPTQIDSDVTDGSSFEATLPEKPPVQDTPPVVDIKPAAAVLQPEE	366
AKG54866.1	VEPCETDTPSHDPLQTT-TTTEAGPPRSPSPTQIDSDVTDGSSFEATLPEKPPVQDTPPVVDIKPAAAVLQPEE	367
XP_051237705.1	VEPCETDTPSHDPLQTT-TTTEAGPPRSPSPTQIDSDVTDGSSFEATLPEKPPVQDTPPVVDIKPAAAVLQPEE	344
** .**.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
BsMAVS	TSESNTAKVVESSKQTKIAGSASTLPAATGVDFLLADDVTGYLSKPEQLISYQFQNVGSPNIPAV---VEPYSGN	403
XP_028994560.1	TSESNTAKVVESSKQTKIAGSASTLPAATGVDFLLADDVTGYLSKPEQLISYQFQNVGSPNIPAV---VEPYSGN	403
XP_026195752.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	412
AHX56245.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	414
XP_035530403.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	413
XP_035530402.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	441
AKG54866.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	438
XP_051237705.1	TSEPPVTVQVLESSPQTEAATTSPLPAEMDASLDDSNVCMKPGVLSIQFQNDSSSTIPAPSSVPVAPYSGN	415
*** .**.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
BsMAVS	SERLLISDGAPDPTASACNLAWSDITSTITDTGSGVPCQDYGITLNHNEPEENHYESPSRSLQEVREHVMHVS	475
XP_028994560.1	SERLLISDGAPDPTASACNLAWSDITSTITDTGSGVPCQDYGITLNHNEPEENHYESPSRSLQEVREHVMHVS	475
XP_026195752.1	TDRLMSDDAQTDFVFAHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	487
AHX56245.1	SERLEISNA---AVTSTHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	486
XP_035530403.1	SERLEMSA---AVTSTHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	485
XP_035530402.1	SERLEMSA---AVTSTHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	513
AKG54866.1	SDRLEMSD---AVTSTHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	510
XP_051237705.1	SDRLEMSD---AVTSTHVPACSAVSSPTGNTVGSVYQENGIALNPNPEENHYESPCSLDMQEVRRNVVQIS	487
**.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
BsMAVS	NEVSIILNLEGQTPAPQAQIFNSGTSASS-----TIKADTVNAHSRENYRPSYPAPSNTSSQLPDPPEEKE	550
XP_028994560.1	NEVSIILNLEGQTPAPQAQIFNSGTSASS-----TIKADTVNAHSRENYRPSYPAPSNTSSQLPDPPEEKE	550
XP_026195752.1	GEVSIILNLDGQTSPPQAQISSSDTAKKITSAPLSTTTTAAATASLNAHSSENY-STEPVVDISSQSPDPPEESG	562
AHX56245.1	EVVSIILNLDGQTSPPQAQIVNGEAAKEITSAPPLSTNAADS-VSSVNTPSSENYHPSEAPADITE-----ERET	561
XP_035530403.1	EEPSIILNLEGQNPAPQAQINGEAAKEITSAPPLSTDGADA-VSSVNTPSSENYHPSEAPADITE-----E-KT	560
XP_035530402.1	EEPSIILNLEGQNPAPQAQINGEAAKEITSAPPLSTDGADA-VSSVNTPSSENYHPSEAPADITE-----E-KT	588
AKG54866.1	EEPSIILNLEGQNSGAQAQINGEAAKEITSAPPLSTDGADT-VSSVNTPSSENYHPSEAPADITE-----E-KT	585
XP_051237705.1	EEPSIILNLEGQNSGAQAQINGEAAKEITSAPPLSTDGADT-VSSVNTPSSENYHPSEAPADITE-----E-KT	561
* . **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		
<b>TM domain</b>		
BsMAVS	VS-CMTRKNTKYIVMAAGVGAFALLVAVKLRN	569
XP_028994560.1	VS-CMTRKNTKYIVMAAGVGAFALLVAVKLRN	569
XP_026195752.1	ASWILTNNTKYIATAAGVAAALALLITWKLKN	592
AHX56245.1	ASRTLNPANTKYILTAAGVGACALLMAWKFKN	586
XP_035530403.1	PSRALNPANTKYILTAAGVGACALLMAWKFKN	584
XP_035530402.1	PSRALNPANTKYILTAAGVGACALLMAWKFKN	612
AKG54866.1	PSRVLNPANTKYILTAAGVGACALLMAWKFKN	609
XP_051237705.1	PSRVLNPANTKYILTAAGVGACALLMAWKFKN	586
* . **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.* **.*		

รูปที่ 13 เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน BsMAVS กับโปรตีน MAVS ที่มียารงานในฐานะข้อมูล

### 4.3 การแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส

ศึกษาการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในลำไส้ปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสโดยการฉีดกรดนิวคลีอิกเลียนแบบ polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลาย phosphate-buffer saline (PBS) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในลำไส้ปลากัด โดยใช้ยีน *BsEF1a* เป็นยีนควบคุม (internal control gene) พบว่าปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสด้วยการฉีด poly(I:C) มีระดับการแสดงออกของยีน *BsMAVS* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังการจำลองการติดเชื้อไวรัสที่ 6 ชั่วโมง และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังการจำลองการติดเชื้อไวรัสที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีด PBS พบว่าปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสด้วยการฉีด poly(I:C) มีระดับการแสดงออกของยีน *BsMAVS* มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) หลังการจำลองการติดเชื้อไวรัสที่เวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 14) สอดคล้องกับรายงานที่มีก่อนหน้า ซึ่งพบว่าปลาที่ติดเชื้อไวรัสหรือถูกกระตุ้นด้วย poly(I:C) จะมีการแสดงออกของยีน MAVS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Krishnan et al., 2018; Gao et al., 2022; Zhang et al., 2022) และสอดคล้องกับรายงานของ Wan และคณะ (2016) ว่าการตอบสนองต่อ poly(I:C) จะถูกควบคุมผ่านการแสดงออกของยีน MAVS และรายงานของ Yasukawa และ Koshiba (2021) ว่ายีน MAVS จะถูกควบคุมในเชิงลบ (negative regulated) ในสภาวะที่ไม่มีการติดเชื้อไวรัสและจะทำงานอย่างโดดเด่นเมื่อเกิดการติดเชื้อไวรัส ดังนั้น แสดงให้เห็นว่ายีน *BsMAVS* มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในปลากัด



รูปที่ 14 ระดับการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ในลูกปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส

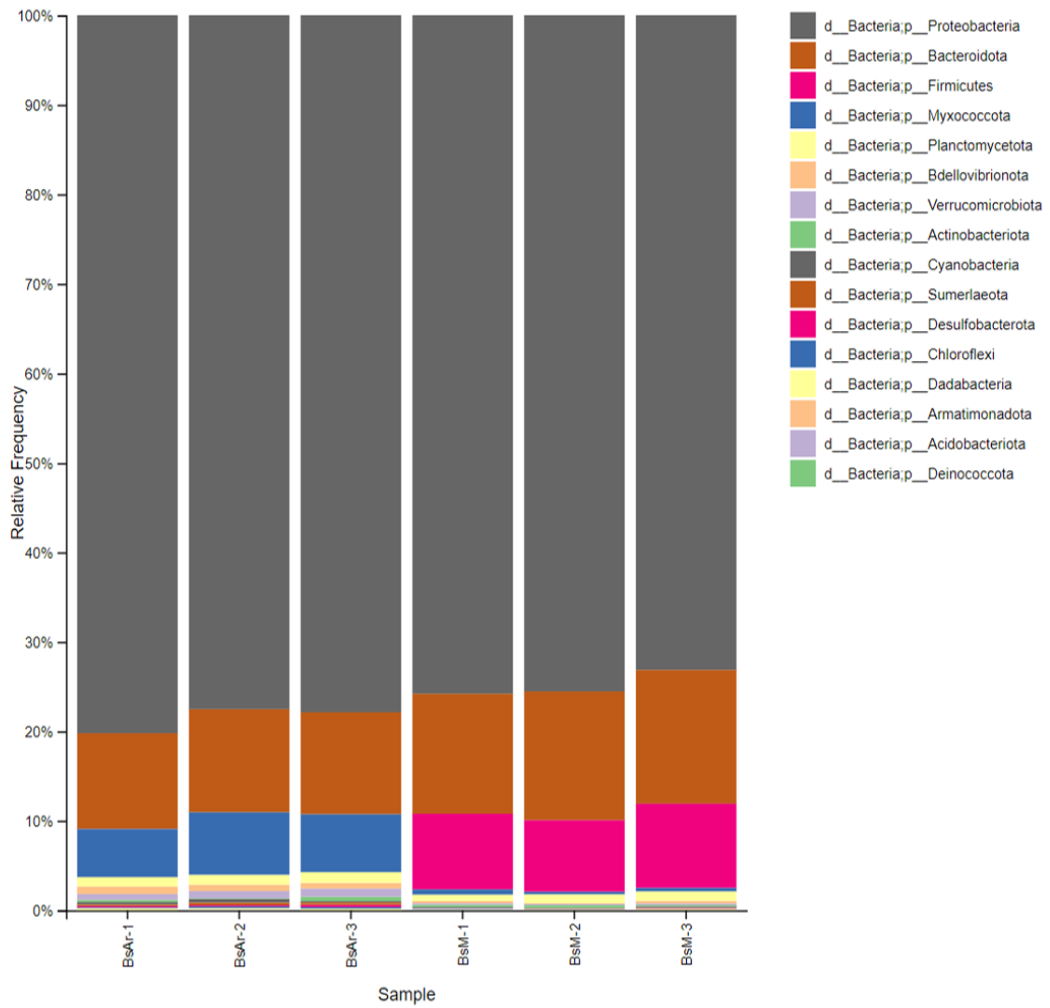
ตัวเลขแสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD คำนวณจาก 3 ซ้ำในแต่ละกลุ่มทดลอง

\* แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.4 ไมโครไบโอมของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด

จากการวิเคราะห์ไมโครไบโอมของตัวอย่างลูกปลากัด พบแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria มากที่สุดประมาณ 70-80% สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งจะพบว่าไฟลัม Proteobacteria เป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในปลาชนิดต่าง ๆ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Grunec และคณะ (2022) พบไฟลัม Proteobacteria ในลำไส้ปลากัดในช่วงอายุต่าง ๆ มากถึง 80% แบคทีเรียส่วนใหญ่ในไฟลัมนี้เป็นผู้ผลิตเอนไซม์ protease ช่วยย่อยโปรตีน โดยเฉพาะในปลาที่กินเนื้อเป็นอาหาร (Wei et al., 2021) ดังนั้น ระดับแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria อาจเป็นผลมาจากโปรตีนในอาหารที่ปลากัดกิน (Grunec et al., 2022) นอกจากนี้ พบว่าลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ดี ได้แก่ Firmicutes, Deinococcota และ Bacteroidota และส่งเสริมกลุ่มแบคทีเรียที่ดี ได้แก่ Bdellovibrionota, Chloroflexi, Dadabacteria, Desulfobacterota, Myxococcota, Sumerlaeota, Verrucomicrobiota (รูปที่ 15 และตารางที่ 10)





รูปที่ 15 กราฟแสดงประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยคอฟีพอด *A. royi*

ตารางที่ 10 ประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัม ของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi*

Bacteria Phylum	BsAr-1	BsAr-2	BsAr-3	BsM-1	BsM-2	BsM-3
Acidobacteriota	0.000	0.077	0.000	0.106	0.000	0.018
Actinobacteriota	0.265	0.094	0.507	0.277	0.377	0.189
Armatimonadota	0.000	0.000	0.000	0.047	0.065	0.147
Bacteroidota	10.700	11.531	11.401	13.422	14.400	14.960
Bdellovibrionota	0.848	0.719	0.636	0.253	0.094	0.306
Chloroflexi	0.130	0.212	0.200	0.047	0.024	0.000
Cyanobacteria	0.259	0.389	0.147	0.106	0.000	0.130
Dadabacteria	0.194	0.147	0.153	0.000	0.000	0.000
Deinococcota	0.000	0.000	0.000	0.041	0.047	0.041
Desulfobacterota	0.153	0.141	0.259	0.006	0.047	0.047
Firmicutes	0.018	0.000	0.000	8.467	8.001	9.421
Myxococcota	5.379	7.000	6.469	0.601	0.300	0.407
Planctomycetota	1.043	1.084	1.208	0.689	0.972	1.043
Proteobacteria	80.209	77.528	77.875	75.790	75.542	73.126
Sumerlaeota	0.159	0.271	0.253	0.000	0.000	0.000
Verrucomicrobiota	0.642	0.807	0.890	0.147	0.130	0.165
รวม %	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

การเลี้ยงลูกปลากัดด้วยโคฟีพอด *A. royi* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ดี ได้แก่ Firmicutes ซึ่งเป็นกลุ่มไฟลัมที่ประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรคในปลา เช่น *Streptococcus iniae* เป็นต้น (โซเฟีย, 2561) Deinococcota ซึ่งพบมากในปลาที่เป็นโรค และ Bacteroidota ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรค (Duan et al., 2020) จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานว่าไฟลัม Bacteroidota จะพบได้มากในปลาที่กินพืชเป็นอาหาร (Sullam et al., 2012) ในทางตรงกันข้าม ปลากัดเป็นสัตว์กินเนื้อ (carnivore) โดยจะกินสัตว์ในกลุ่มแมลงและตัวอ่อนของแมลง (Monvises et al., 2009) ดังนั้น เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ เป็นแบคทีเรียที่มีมาแต่กำเนิด (innate bacteria) ซึ่งจะมีปริมาณ

มากขึ้นหรือลดลงตามภาวะโภชนาการหรืออาหารที่กิน เนื่องจากอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดจุลินทรีย์ในลำไส้ของปลา (Gruneck et al., 2022)

จากผลการวิเคราะห์ไมโครไบโอมพบว่า ลูกปลากัดที่เพาะเลี้ยงด้วย *A. royi* มีประชากรแบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes และ Bacteroidota ลดลง ซึ่งคาดว่าเป็นผลมาจากปริมาณกรดไขมัน โดยเฉพาะ n-3 PUFA ที่พบมากใน *A. royi* สอดคล้องกับรายงานของ Fu และคณะ (2021) ซึ่งได้รายงานว่า n-3 PUFAs มีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเฉพาะอัตราส่วนของ Firmicutes ต่อ Bacteroidetes (F/B) โดยการเพิ่มขึ้นของ n-3 PUFA ทำให้อัตราส่วน F/B ลดลง หากอัตราส่วน F/B เพิ่มมากขึ้นจะนำไปสู่ภาวะโรคอ้วนและน้ำหนักเกินได้ จากการทดลองในหนูพบว่า อาหารที่มี n-3 PUFA สูงสามารถลดอัตราส่วนของ F/B ได้ (Onishi et al., 2017) อีกทั้งพบว่า n-3 PUFAs สามารถฟื้นฟูไมโครไบโอมของผู้ป่วยในกลุ่มโรคทางเดินอาหารอักเสบเรื้อรัง (Inflammatory bowel disease; IBD) ได้ โดยทำให้อัตราส่วนของ F/B ลดลง (Belluzzi et al., 2004)

นอกจากนี้พบว่า การเลี้ยงลูกปลากัดด้วยโคพีพอด *A. royi* ส่งเสริมกลุ่มแบคทีเรียที่ดี ได้แก่ Bdellovibrionota, Chloroflexi, Dadabacteria, Desulfobacterota, Myxococcota, Sumerlaeota, Verrucomicrobiota สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีก่อนหน้าซึ่งพบว่า หนูที่ได้รับปริมาณ n-3 PUFA มาก จะมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Verrucomicrobiota มากขึ้น (Bidu et al., 2018) โดย Verrucomicrobiota เป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายเมือก มีส่วนช่วยในสุขภาพของลำไส้และสถานะสมดุลกลูโคส (Solar et al., 2019) Bdellovibrionota ซึ่งเป็นผู้ล่าแบคทีเรียแกรมลบและถูกนำไปใช้ในการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรีย และใช้ในการรักษาการติดเชื้อของเชื้อแบคทีเรีย (Li et al., 2021) Chloroflexi ซึ่งมีบทบาทในการสลายสารอินทรีย์กลุ่มคาร์บอน ซัลเฟอร์ และฮาโลเจน (Liu et al., 2022) Dadabacteria ซึ่งมีบทบาทในการสลายสารอินทรีย์ที่ได้มาจากมาจากจุลินทรีย์เช่น เพปติโดไกลแคนและฟอสโฟลิปิด (Graham et al., 2021) Desulfobacterota ซึ่งมีความสามารถในการรีดิวซ์ซัลเฟต ถูกนำไปใช้ในการบำบัดน้ำเสีย Myxococcota ซึ่งเป็นผู้ล่า สามารถหลั่งสารเมแทโบไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) จำนวนมาก เช่น สารไซเดอโรฟออร์ (siderophore) ช่วยในการจับธาตุเหล็กเข้าสู่เซลล์ แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น และยาปฏิชีวนะ (Murphy et al., 2021) Sumerlaeota ซึ่งทำหน้าที่เป็นจุลินทรีย์กินซากเป็นอาหาร (scavengers) และใช้ประโยชน์จากสารอินทรีย์ที่ยากแก่การบำบัด (refractory organic) เช่น โคติน และเซลลูโลส (Fang et al., 2021)

โดยคาดว่ากลุ่มแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นเกี่ยวข้องกับการดูดซึมไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน จากรายงานวิจัยของ Shi และคณะ (2020) พบว่าเคยแอนตาร์กติก (*Euphausia superba*) ที่อุดมไปด้วยกรดไขมันโดยเฉพาะ n-3 PUFAs (DHA และ EPA) ช่วยเพิ่มความหลากหลายขององค์ประกอบไมโครไบโอมในลำไส้หมึกได้ อีกทั้งยังสันนิษฐานว่าความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลำไส้มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณ goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโพแทสเซียม การควบคุมเมือก (protective mucus) และการตอบสนองต่อการอักเสบ จากรายงานวิจัยของ Chiang และคณะ (2020) พบว่าการแสดงออก (overexpression) ยีน delta-5 และยีน delta-6 desaturase ซึ่งเป็นยีนสังเคราะห์ n-3 PUFA ในปลานิล ช่วยให้ปลานิลมีความต้านทานโรคเพิ่มมากขึ้น ลดปริมาณแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการอักเสบในกลุ่ม bacteriodota และเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ให้ดีขึ้น โดยมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบลดลง เช่นเดียวกับรายงานของ Martinez-Bubio และคณะ (1012) พบว่าการให้ EPA แก่ปลาแซลมอนแอตแลนติกสามารถลดการตอบสนองการอักเสบและป้องกันการติดเชื้อไวรัส Atlantic salmon reovirus (ASRV) ได้

Fu และคณะ (2021) ได้รายงานว่าความอุดมสมบูรณ์ของจุลินทรีย์ในลำไส้มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นของ n-3 PUFAs โดยพบว่า n-3 PUFA สามารถปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์ในลำไส้ผ่านการยับยั้งสารก่อการอักเสบ (proinflammatory) หรือส่งเสริมการผลิตสารต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) อีกทั้ง n-3 PUFAs ยังมีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในลำไส้ ผ่านการควบคุมระดับของกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid; SCFAs) โดยพบว่า การได้รับ n-3 PUFAs (DHA และ EPA) เพิ่มขึ้น จะช่วยเพิ่มความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียที่ผลิต butyrate โดยแบคทีเรียเหล่านี้จะช่วยย่อยสลายสารอาหารที่ไม่ผ่านการหมัก (nonfermentable dietary) ให้เป็นกรดไขมันสายสั้น เช่น butyrate ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ช่วยเสริมสุขภาพทางเดินอาหารและภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ไมโครไบโอมของตัวอย่างลูกปลากัดทั้งตัว ยังพบอีกว่าลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi* มีแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยไรแดงน้ำจืด (ตารางที่ 11) จากรายงานวิจัยของ Grunec และคณะ 2022 ซึ่งได้ทำการศึกษาไมโครไบโอมจากตัวอย่างลำไส้ปลากัดพบแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* มากเป็นอันดับ 2 โดย *Aeromonas* spp. เป็นที่รู้จักในฐานะผู้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส (Pemberton et al., 2006; Jiang et al., 2011) ดังนั้น จึงอาจเป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต อย่างไรก็ตาม เป็นที่ทราบกันดีว่า *Aeromonas* spp. เป็นกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในปลา



(Xiong et al., 2019) โดยเฉพาะในปลากัดอายุน้อย ที่ยังพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันยังไม่สมบูรณ์ (Larsen et al., 2014; Li et al., 2016)

ตารางที่ 11 ประชากรแบคทีเรีย *Aeromonas* spp. ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคฟีพอด *A. royi*

กลุ่มตัวอย่างลูกปลากัด	BsAr-1	BsAr-2	BsAr-3	BsM-1	BsM-2	BsM-3
% <i>Aeromonas</i> spp.	0.118	0.153	0.000	0.689	0.878	0.660
Number of read constructs	20	26	0	117	149	112



## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า การอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคฟีพอด *A. royi* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนเปปไทด์ต้านจุลชีพ *BsLEAP2C* และต้านไวรัส *BsMAVS* ให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยโปรตีน *BsMAVS* มีขนาด 569 กรดอะมิโน ประกอบด้วยโดเมนสำคัญ ได้แก่ N-terminal Caspase recruitment domain, proline-rich domain และ C-terminal transmembrane domain และพบว่าปลากัดมีการแสดงออกของยีน *BsMAVS* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) หลังจำลองการที่ติดเชื้อไวรัสเป็นเวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าโคฟีพอด *A. royi* มีประสิทธิภาพช่วยกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านไวรัสของปลากัดผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *BsMAVS* และจากการศึกษาไมโครไบโอมพบว่า การเพาะเลี้ยงปลากัดแรกเกิดด้วยโคฟีพอด *A. royi* ช่วยส่งเสริมแบคทีเรียที่ดีและลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในปลากัด ทำให้ปลากัดมีสุขภาพที่ดีขึ้น

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของการอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคฟีพอดในระดับห้องปฏิบัติการ หากต้องการนำโคฟีพอดไปใช้อนุบาลลูกปลากัดด้วยอ่อนในระดับอุตสาหกรรม หรือนำโคฟีพอดไปใช้อนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อนชนิดอื่น ควรมีการศึกษาสภาวะการเลี้ยง และการศึกษภาพในการกระตุ้นยีนภูมิคุ้มกันเพิ่มเติม

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## รายการอ้างอิงภาษาไทย

- กมลพร ทองอุไร และ สุปราณี ชินบุตร. 2544. การป้องกันและกำจัดโรคปลา. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัย  
สุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- การุณ ทองประจุแก้ว. 2556. ชีววิทยาของปลากัดไทย (*Betta splendens* Regan, 1910). ว.วิทย.  
มข. 41(1): 1-15.
- กรมประมง. 2559. มาตรฐานปลากัดสวยงามในประเทศไทย (ฉบับปรับปรุง). [ออนไลน์]. แหล่งที่มา :  
[https://www4.fisheries.go.th/local/file\\_document/20200412181210\\_1\\_file.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20200412181210_1_file.pdf).  
[19 กันยายน 2565]
- กรมประมง. 2561. การเพาะเลี้ยงไรแดง. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: <https://fisheries.go.th/sf-chiangrai/cultivate/rai.htm>. [3 มีนาคม 2566]
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2563. Pitfall ในการตรวจ SARS-CoV-2 ด้วยเทคนิค Real-time RT-PCR. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [https://www3.dmsc.moph.go.th/download/files/dmsc\\_covid19.pdf](https://www3.dmsc.moph.go.th/download/files/dmsc_covid19.pdf). [20 กันยายน 2565]
- กรมประมง. 2564. สถิติการนำเข้าส่งออกสัตว์น้ำทางท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ เดือนมกราคม 2564.  
[ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [https://www4.fisheries.go.th/local/file\\_document/20210204192638\\_1\\_file.pdf](https://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20210204192638_1_file.pdf). [20 กันยายน 2565]
- จุฬามาศ กลิ่นโชดา. 2564. บทบาทของไมโครไบโอม: สู่ยุคใหม่ของห่วงโซ่อาหารและการสาธารณสุข  
หลังจากการระบาดของโรคโควิด 19. วารสารอาหาร. 51, 2, 31-39.
- โซเฟีย จารุประสิทธิ์. 2561. โรคปรสิตของปลากัดเหลือง *Mytus nemurus* (Cuvier &  
Valencienness, 1893) จากการเพาะเลี้ยงในอำเภอสะเดา จังหวัดสงขลา. วิทยานิพนธ์  
ปริญญา วิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- ณัฐกิตติ์ โตอ่อน และ ภัทรพนธ์ สุขสอาด. 2561. ผลของการเสริมดอกดาวเรืองในอาหารต่อความเข้ม  
สีของปลากัดสวยงาม. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและ  
อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ, นนทบุรี.
- ธนิดา แซ่ตั้ง. 2559. ความหลากหลายชนิดของโคฟีพอดน้ำจืด (คาลานอยด์ ไฮโคลพอยด์ และฮาร์แพคที  
คอยด์) ในทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต,  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- บุญยกร พ่วงดี และ ศรัณย์ เศรษฐมาลันนท์. 2561. การใช้ทิ้งจากการปลูกพืชระบบไฮโดรโปนิคส์  
เพาะเลี้ยงคลอเรลลาและไรแดง. คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม,  
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.

- พิชญา ชัยนาค. 2559. ข้อมูลพื้นฐานโคฟีพอด. ใน: การฝึกอบรมหลักสูตร การเพาะเลี้ยงโคฟีพอดในบ่อดินเพื่อสนับสนุนธุรกิจการเลี้ยงกุ้งทะเล, ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, ภูเก็ต.
- มะลิวัลย์ คุดะโค, ปวีณา ตปนีย์วรวงค์, สรวิศ เผ่าสุข และนภาพร. 2562. การเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและผลผลิตโคฟีพอดเพื่อใช้อุบลาลูกกุ้งขาววัยอ่อน. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์, คณะเทคโนโลยี ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา, จันทบุรี.
- วิรัตดา สิตะสิทธิ์. 2544. ไรแดงในประเทศไทย. วิเคราะห์และประมวลผลการศึกษาวิจัย. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- วัฒนา วัฒนกุล, อุไรวรรณ วัฒนกุล, จิโรจน์ พิระเกียรติขจร. 2548. การวิจัยและพัฒนาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตปลากัดไทย. รายงานการวิจัย, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.
- วัลย์พร เจริญทรัพย์ศรี, พัชรี โยควิบูล, ปารีชาติ ชุมทอง, จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก และ ปิติ อ่ำพายัพ. 2563. ทรานสคริปโตมและการวิเคราะห์ยีนมิกโซไวรัสซิสแทนซ์ในปลากัดไทย *Betta splendens*. ใน เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 58: สาขาวิทยาศาสตร์ (น. 71-78). กรุงเทพฯ: สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ.
- วิไลลักษณ์ นิยมมนิรัตน์. 2565. เรื่องจากปก: โคฟีพอด (Copepods) รากฐานของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศแหล่งน้ำ. วารสารสิ่งแวดล้อม. 26(1).
- ศุภร์เทียนชัย แซ่ไคว้ว. 2561. ผลของปริมาณน้ำและสีของภาชนะต่อการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2561. การจัดการระบบโลจิสติกส์และโซ่อุปทานปลากัดไทยเพื่อการส่งออก. **วารสารการประมงอิเล็กทรอนิกส์**. 1(1), 100-132.
- Gibthai training center. 2018. ความรู้พื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา: [https://essentialoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2018/01/1techni\\_pcr.pdf](https://essentialoil.wu.ac.th/wp-content/uploads/2018/01/1techni_pcr.pdf). [20 กันยายน 2565]

### รายการอ้างอิงภาษาอังกฤษ

- Abate, T., Nielsen, R., Nielsen, M., Jepsen, P., Hansen, B. 2016. A cost-effectiveness analysis of live feeds in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* (Linnaeus, 1758) farming: copepods versus Artemia. **Aquaculture Nutrition**. 22, 899-910.
- Algammal, A.M., Mohamed, M.F., Tawfiek, B.A., Hozzein, W.N., Kazzaz, W.M.El., Mabrok, M. 2020. Molecular Typing, Antibiogram and PCR-RFLP Based Detection of *Aeromonas hydrophila* Complex Isolated from *Oreochromis niloticus*. **Pathogens**. 9, 238.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N., Chumtong, P., Yocawiwibun, P., Imjongjirak, C. 2020. Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Fish Shellfish Immunology**. 99, 403-413.
- Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C., Powtongsook, S. 2022. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*. **Aquaculture Reports**. 23, 101064.
- Abbaszadeh, A., Mozanzadeh, M.T., Qasemi, A., Oujifard, A., Bahabadi, M.N. 2022. Effects of the addition of *Calanopia elliptica*, *Artemia franciscana*, and *Brachionus rotundiformis* in a nursery biofloc system on water quality, growth, gut morphology, health indices, and transcriptional response of immune and antioxidant-related genes in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture International**. 30, 653–676.
- Belluzzi, A. 2004. Polyunsaturated fatty acid (n-3 PUFAs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment. **European Review for Medical and Pharmacological Ences**. 8, 5, 225.
- Buskey, E.J. 2005. Behavioral characteristics of copepods that affect their suitability as food for larval fishes. In: Copepods in Aquaculture (Lee, C.-S., O'Bryen, P.J. & Marcus, N.H. eds). **Blackwell Publishing Ltd.**, Oxford, UK. 91-105.
- Biacchesi, S., LeBerre, M., Lamoureux, A., Louise, Y., Lauret, E., Boudinot, P., Bremont, M. 2009. Mitochondrial antiviral signaling protein plays a major role in

- induction of the fish innate immune response against RNA and DNA viruses. *Journal of Virology*. 83, 7815-7827.
- Busch, K.E.T., Peruzzi, S., Tønning, F., 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.
- Bidu, C., Escoula, Q., Bellenger, S., Spor, A., Galan, M., Geissler A., et al. 2018. The transplantation of omega-3 PUFA-altered gut microbiota of fat-1 mice to wild-type littermates prevents obesity and associated metabolic disorders. **Diabetes**. 67(8), 1512-1523.
- Calder, P.C. 1996. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of 12-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc Nutr Soc.* 2, 737-74.
- Coperman, L.A., Parrish, C.C., Brown, J.A., Harel, M. 2002. Effects of docosahexaenoic, eicosapentaenoic, and arachidonic acids on the early growth, survival, lipid composition and pigmentation of yellowtail flounder (*Limanda ferruginea*): a live food enrichment experiment. **Aquaculture**. 210, 285–304.
- Caipang, C.M., Hirono, I., Aoki, T. 2003. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. **Virology**. 317, 373-382.
- Clotfelter, E.D., Ardia, D.R., McGraw, K.J. 2007. Red fish, blue fish: trade-off between pigmentation and immunity in *Betta splendens*. **Behavioral Ecology**. 18, 1139-1145.
- Conceicao, L.E.C., Yufera, M., Makridis, P., Marais, F., Dinis, M.T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. **Aquaculture research**. 41, 613-640.
- Chiang, K.Y., Lin, W.C., Tsai, T.Y., Lin, C.W., Huang, S.J., Huang, C.Y., et al. 2020. Dual expression of transgenic delta-5 and delta-6 desaturase in tilapia alters gut microbiota and enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection. **PLoS ONE**. 15(7), e0236601.
- Carneiro, L.C., Willums, E.J., Saut, J.P.E., Santos, R.M., Celeghini, E.C.C. 2021. The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on immune and reproductive parameters in dairy cows: a review. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 58, e175224.

- Duan, Y., Xiong, D., Li, Y., Dong, H., Wang, W., Zhang, J. 2020. Changes in the gastrointestinal microbial community of *Lateolabrax maculatus* in a naturally occurring *Microcystis aeruginosa* bloom environment. **Aquaculture**. 528, 735444.
- Ebert, D. 2005. Introduction to Daphnia Biology. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=daph&part=ch2>)
- Eslamloo, K., Xue, X., Hall, J.R., Smith, N.C., Caballero-Solares, A., Parrish, C.C., Taylor, R.G., Rise, M.L. 2017. Transcriptome profiling of antiviral immune and dietary fatty acid dependent responses of Atlantic salmon macrophage-like cells. **BMC Genomics**. 18, 706.
- Fyhn, H.J., Finn, R., Helland, S., Ronnestad I., Lomslund E.R. 1993. Nutritional value of phyto- and zooplankton as live food for marine fish larvae. In: **Fish Farming Technology** (ed. by H. Reinertsen, L.A. Dahle, L. Jørgensen & K. Tvinnerheim), pp. 121–126. Balkema, Rotterdam, the Netherlands.
- Ferro Korovchinsky, N.M., Kotov, A.A., Petrussek, A. 2008. Global diversity of cladocera (Cladocera; crustacean) in freshwater animal diversity assessment. **Hydrobiologia**. 595, 177-184.
- Fang, Y., Yuan, Y., Liu, J., Wu, G., Yang, J., Hua, Z., Han, J., Zhang, X., Li, W., Jiang, H. 2021. Casting light on the adaptation mechanisms and evolutionary history of the widespread Sumerlaeota. **mBio**. 12(2), e00350-21.
- Fu, Y., Wang, Y., Gao, H., Li, D., Jiang, R., Ge, L., Tong, L., Xu, K. 2021. Associations among dietary omega-3 polyunsaturated fatty acid, the gut microbiota, and intestinal immunity. **Mediators of Inflammation**. 8879227.
- Gomez, G.D., Balcazar, J.L. 2008. A review on the interactions between gut microbiota and innate immune of fish. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 52, 145-154.
- Gorjao, R., Azevedo-Martins, A.K. Rodrigues, H.G. Abdulkader, F, Arcisio-Miranda, M., Procopio, J., Curi, R. 2009. Comparative effects of DHA and EPA on cell function. **Pharmacol Ther**. 122, 1, 56-64.
- Granda, J.R., Barletta, R.V., Mingoti, R.D., Verdurico, L.C., Freitas, J.E.J.R., Oliveira, L.T., Takiya, C.S., Kfoury J.R., Wiltbank, M.C., Renno, F.P. 2016. Effects of whole



- flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **J Dairy Sci.** 99, 6, 4590-606.
- Graham, E.D. and Tully, B.J. 2021. Marine *Dadabacteria* exhibit genome streamlining and phototrophy-driven niche partitioning. **ISME journal.** 15, 1248-1256.
- Gruneck, L., Jinatham, V., Therdtatha, P., Popluechai, S. 2022. Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan) gut microbiota associated with age and gender. **Fishes.** 7, 347.
- Gao, X., Zhang, Y., Zheng, J., Yang, X., Wang, Y., Qin, Q., Huang, X., Huang, Y. 2022. Grouper interferon-induced protein 35, a CP-interting protein, inhibits fish nodavirus replication via positively regulating host interferon and inflammatory immune response. **Fish and Shellfish Immunology.** 128, 113-122.
- Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q., Chen, Z. 2011. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. **Cell.** 146, 5, 841.
- Jensen, I. and Robertsen, B. 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on antiviral activity of atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. **Fish and Shellfish Immunology.** 13, 221-241.
- Jiang, Y., Xie, C., Yang, G., Gong, X., Chen, X., Xu, L., Bao, B. 2011. Cellulase-producing bacteria of *Aeromonas* are dominant and indigenous in the gut of the Ctenopharyngodon idellus (Valenciennes). **Aquaculture Research.** 42, 499-505.
- Juntarut, P. 2014. Roles of copepods in larviculture. **KKU Research Journal.** 19, 6, 939-949.
- Jia, P., Jin, Y., Chen, L., Zhang, J., Jia, K., Yi, M. 2016. Molecular characterization and expression analysis of mitochondrial antiviral signaling protein gene in sea perch, *Lateolabrax japonicus*. **Development and Comparative Immunology.** 55, 188-195.

- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K. & Tandler, A. 2001. Advances in the development of microdiets for Gilthead Seabream, *Sparus aurata*: a review. **Aquaculture**. 194, 107–121.
- Kibenge, M.J., Munis, K., Kibenge, F.S. 2005. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. **Virology Journal**. 2,75.
- Kasthuri, S.R., Wan, Q., Whang, I., Lim, B.S., Yeo, S.Y., Choi, C.Y., Lee, J. 2014. Functional characterization of the evolutionarily preserved mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS) from rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. **Fish and Shellfish Immunology**. 40, 399-406.
- Kogut, M.H. and Arsenault, R.J. 2016. Gut health: The new paradigm in food animal production. **Frontiers in Veterinary Science**. 3, 71.
- Krishnan, R., Babu, P.G., Jeena, K., Tripathi, G., Prasad, K.P. 2018. Molecular characterization, ontogeny and expression profiling of antiviral mitochondrial signaling adapter, MAVS from Asian seabass *Lates calcarifer*, Bloch (1790). **Developmental and Comparative Immunology**. 79, 175-185.
- Lauksund, S., Svingerud, T., Bergan, V., Robertsen, B. 2009. Atlantic salmon IPS-1 mediates induction of IFN $\alpha$ 1 and activation of NF-[kappa] B and localizes to mitochondria. **Developmental and Comparative Immunology**. 33, 1196-1204.
- Larsen, A.M., Mohammed, H.H., Arias, C.R. 2014. Characterization of the gut microbiota of three commercially valuable warmwater fish species. **Applied Microbiology**. 116, 1396-1404.
- Li, T., Long, M., Ji, C., Shen, Z., Gatesoupe, F.J., Zhang, X., Zhang, Q., Zhang, L., Zhao, Y., Liu, X., et al. 2016. Alterations of the gut microbiome of largemouth bronze gudgeon (*Coreius guichenoti*) suffering from furunculosis. **Scientific Reports**. 6, 30606.
- Li, Q.M., Zhou, Y.L., Wei, Z.F. Wang, Y. 2021. phylogenomic insights into distribution and adaptation of Bdellovibrionota in marine waters. **Microorganism**. 9, 757
- Liu, R., Wei, X., Song, W., Wang, L., Cao, J., Wu, J., Thomas, T., Jin, T., Wang, Z., Wei, W., Wei, Y., Zhai, H., You, C., Shen, Z., Du, J., Fang, J. 2022. Novel *Chloroflexi*

- genomes from the deepest ocean reveal metabolic strategies for the adaptation to deep-sea habitats. **Microbiome**. 10, 75.
- Martin, J.W. and Devis, G.E. 2001. An updated classification recent crustace. **Natural History Museum of Los Angeles Country Contributions in Science**. 39, 1-124.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanothai, N. and Panijpan, B. 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. **ScienceAsia**. 35, 8–16.
- Martinez-Bubio, L., Morais, S., Evensen, O., Wadsworth, S., Ruohonen, K., Vecino, JL., et al. 2012. Functional feeds reduce heart inflammation and pathology in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) following experimental challenge with Atlantic salmon reovirus (ASRV). **PLoS ONE**. 7(11), e40266.
- Murphy, C.L., Yang, R., Decker, T., Cavalliere, C., Andreev, V., Bircher, N., Cornell, J., Dohmen, R., Pratt, C.J., Grinnell, A., Higgs, J., Jett, C., Gillett, E., Khadka, R., Mares, S., Meili, C., Liu, J., Mukhtar, H., Elshahed, M.S., Youssef, N.H. 2021. Genomes of novel *Myxococcota* reveal severely curtailed machineries for predation and cellular differentiation. **Applied and Environmental Microbiology**. 87(23), e01706-21.
- Nielsen, B.L.H., Greve, 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.
- Ogle, J.T., Nicholson, L.C., Barnes, D.N., Lotz, J.M. 2005. Characterization of an extensive zooplankton culture system coupled with intensive larval rearing of red snapper *Lutjanus campechanus*. In: Lee, C.S., O'Bryen, P.J., Marcus, N.H. (Eds.), **Copepods in Aquaculture**. Blackwell Publishing, Oxford. pp. 225–244.
- Olivotto, I., Capriotti, F., Buttino, I., Avella, A.M., Vitiello, V., Maradonna, F., Carnevali, O. 2008. The use of harpacticoids copepods as live prey for *Amphiprion clarkia* larviculture: effects on larval survival and growth. **Aquaculture**. 274, 347–352.

- Oie, G., Galloway, T., Soroy, M., Holmvaag Hansen, M., Norheim, I.A., Halseth, C.K., Almli, M., Berg, M., Gagnat, M.R., Wold, P.A., Attramadal, K., Hagemann, A., Evjemo, J.O., Ejorsvik, E. 2017. Effect of cultivated copepods (*Acartia tonsa*) in first-feeding of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and ballan wrasse (*Labrus bergylta*) larvae. **Aquaculture Nutrition**. 23, 3-17
- Onishi, J.C., Campbell, S., Moreau, M., et al. 2017. Bacterial communities in the small intestine respond differently to those in the caecum and colon in mice fed low- and high- fat diets. **Microbiology**. 163, 8, 1189-1197.
- Payne, M.F., Rippingale, R.J., Cleary, J.J. 2001. Cultured copepods as food for West Australian dhufish (*Glaucosoma hebraicum*) and pink snapper (*Pagrus auratus*) larvae. **Aquaculture**. 194, 137-150.
- Pemberton, J.M., Kidd, S.P., Schmidt, R. 2006. Secreted enzymes of *Aeromonas*. **FEMS Microbiology Letters**. 152, 1-10.
- Poynton, S.L., Dachsel, P., Lehmann M.J., Steinberg, C.E.W. 2013. Culture of the cladoceran *Moina macrocopa*: Mortality associated with flagellate infection. **Aquaculture**. 146-147, 374-379.
- Ronnestad, I., Tonheim, S.K., Fyhn, H.J., Rojas-Garcia, C.R., Kamisaka, Y., Koven, W., Finn, R.N., Terjesen, B.F., Barr, Y., Conceicao, L.E.C. 2003. The supply of amino acids during early feeding stages of marine fish larvae: a review of recent feedings. **Aquaculture**. 227, 147-164.
- Ronnestad I. and Conceicao L.E.C. 2005. Aspects of protein and amino acids digestion and utilization by marine fish larvae. in **Physiological and Ecological Adaptations to Feeding in Vertebrates** (ed. by J.M. Starck & T. Wang), pp. 389-416. Science Publishers, Ençeld, NH, USA
- 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.
- Reid, J.W. and Williamson, C.E. 2010. Copepoda In: Thorp, J.H. and Covich A.P. (eds.), **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. London: Elsevier. 829-900.

- Seth, R.B., Sun, L., Ea, C.K., Chen, Z.J. 2005. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. **Cell**. 122, 669-682.
- Simora, R.M.C., Ohtani, M., Hikima, J.I., Kondo, H., Hirono, I., Jung, T.S., Aoki, T. 2010. Molecular cloning and antiviral activity of IFN- $\beta$  promoter stimulator-1 (IPS-1) gene in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Fish and Shellfish Immunology**. 29, 979-986.
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'Connell, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S., Russell, J.A. 2012. Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish. **Molecular ecology**. 21, 3363-3378.
- Solar, C., Escalona, A., Garrido, D. 2019. The Gut Microbiome After Bariatric Surgery. **Microbiome and Metabolome in Diagnosis, Therapy, and other Strategic Applications**. 235-242.
- Shi, H., Ping, H., He, J., Zhang, T., Yu, F., Lu, B., Liang, J., Zhu, W. 2020. Raw frozen Antarctic krill (*Euphausia superba*) as an alternative feed source for cuttlefish *Sepiella japonica* in artificial breeding systems. **Aquaculture Research**. 51, 1867- 1879.
- Suhaimi, H., Yuslan, A., Azani, N., Habib, A., Liew, H.J., Rasdi, N.W. 2022. Effect of dietary enhanced *Moina macrocopa* (Straus, 1820) on the growth, survival and nutritional profiles of hybrid Nile tilapia fry. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**. 48, 1, 67-73.
- Stottrup, J.G. 2003. Production and nutritional value of copepods. **Live Feeds in Marine Aquaculture**. 145-205.
- Titos, E., Rius, B., Gonzalez-Periz, A., Lopez-Vicario, C., Moran-Salvador, E., Martinez-Clemente, M., Aroyo, V., Claria, J. 2011. Resolvin D1 and its precursor docosahexaenoic acid promote resolution of adipose tissue inflammation by eliciting macrophage polarization toward an M2-like phenotype. **J Immunology**. 187, 10, 5408-18
- Tait, S.W. and Green, D.R. 2012. Mitochondria and cell signalling. **Journal of Cell Science**. 125, 4, 807-815.

- Williamson, C.E., Reid, J.W., 2001. Copepoda. In: Thorp, J.H., Covich, A.P. (Eds.), **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**, second ed. Academic Press, New York. 915–954.
- Wan, S., Ashraf, U., Ye, J., Duan, X., Zohaib, A., Wang, W., Chen, Z., Zhu, B., Li, Y., Chen, H., Cao, S. 2016. MicroRNA-22 negatively regulates poly(I:C)-triggered type I interferon and inflammatory cytokine production via targeting mitochondrial antiviral signaling protein (MAVS). **Oncotarget**. 7, 47, 76667-76683.
- Wei, Y., Bu, J., Long, H., Zhang, X., Cai, X., Huang, A., Ren, W., Xei, Z. 2021. Community structure of protease-producing bacteria cultivated from aquaculture systems. **Frontiers in Microbiology**. 21, 638129.
- Xiong, J.B., Nie, L., Chen, J. 2019. Current understanding on the roles of gut microbiota in fish disease and immunity. **Zoological research**. 40, 70-76.
- Yasukawa, K., and Koshiba, T. 2021. Mitochondrial reactive zones in antiviral innate immunity. **BBA - General Subjects**. 1865(3), 129839.
- Yuslan, A., Nasir, N., Suhaimi, H., Arshad, A., Rasdi, A.W. 2021a. The effect of enriched cyclopoid copepods on coloration and feeding rate of *Betta splendens*. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. 869, 012007.
- Yuslan, A., Najuwat, S., Hagiwara, A., Ghaffar, M.A., Suhaimi, H., Rasdi, N.D. 2021b. Production performance of *Moina macropa* (Straus 1820) (Crustacea, Cladocera) culture in different salinities: The effect on growth, survival, reproduction, and fatty acid composition of the neonates. **Diversity**. 13, 105.
- Zhang, Y., Sun, J., Shi, Y., Liu, X., Zhang, M., Xu, B., Song, J., Song, Z., Guan, X., Shi, W., Liu, M. 2022. *Oncorhynchus mykiss* OmTRIM25 activates the interferon-1 pathway and positively regulates the antiviral innate immune response to infectious hematopoietic necrosis virus. **Aquaculture**. 560, 738435

ภาคผนวก ก  
การเตรียมสาร

**เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.2% และ 1.8% (%w/v)**

ซึ่งอะกาโรส 1.2 หรือ 1.8 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและคนให้ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงก่อนนำมาเทใน gel chamber

**สารละลายบัฟเฟอร์ 1X TBE**

เตรียมสารละลาย 10X TBE โดยละลาย Tris base 24.2 กรัม, boric acid 5.5 กรัม และ Na<sub>2</sub>EDTA 0.93 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายดีทั้งหมด ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร เจือจาง 10X TBE ให้เป็น 1X TBE โดยเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ใน 10X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

**สารละลายบัฟเฟอร์ TEN**

เตรียม 1M Tris-HCl pH 8.0 โดยชั่ง Tris base 12.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เตรียม 0.5 M EDTA pH 8.0 โดยชั่ง Na<sub>2</sub>EDTA 18.6 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.0 ด้วย NaOH คนให้เข้าตลอดเวลาด้วย magnetic stirrer จากนั้น EDTA จะเริ่มละลายเมื่อค่า pH เป็น 8.0 จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ผสมสารละลาย Tris-HCl 100 mM, สารละลาย EDTA pH 8.0 100 mM และสารละลาย NaCl 250 mM

ภาคผนวก ข  
ผลงานตีพิมพ์ใน Proceedings



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**



การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

**การกระตุ้นยีนต้านไวรัส MAVS ในปลากัดไทย *Betta splendens* แรกเกิดที่เพาะเลี้ยงด้วย  
โคพีพอด *Apocyclops royi***

**Activation of antiviral gene, MAVS, in Siamese fighting fish *Betta splendens* larvae rearing with  
copepod *Apocyclops royi***

**นุสรีย์ สามาลูกา<sup>1,2</sup>, วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี<sup>3,4</sup>, ปิติ อัมพายัพ<sup>3,4,\*</sup> และจันทร์ประภา อิมจงใจรัก<sup>2</sup>  
Nusree Samaluka<sup>1,2</sup>, Walaiporn Charoensapsri<sup>3,4</sup>, Piti Amparyup<sup>3,4,\*</sup> and Chanprapa Imjongjirak<sup>2</sup>**

**บทคัดย่อ**

ปลากัดไทย (*Betta splendens*) เป็นหนึ่งในปลาสวยงามที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย งานวิจัยนี้พบว่าการอนุบาลปลากัดแรกเกิดด้วยโคพีพอด *Apocyclops royi* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน Mitochondrial antiviral signaling (BsMAVS) ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดย BsMAVS เป็นยีนต้านไวรัสที่แปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 569 กรดอะมิโน ประกอบด้วยโดเมนสำคัญ ได้แก่ N-terminal caspase recruitment domain, proline-rich domain และ C-terminal transmembrane domain และพบว่ายีน BsMAVS ในลำไส้ปลากัดมีการแสดงออกสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังกระตุ้นด้วย poly(I:C) ผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารมีชีวิตเพื่อช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต้านไวรัสของปลากัดแรกเกิด

**คำสำคัญ:** ปลากัดไทย *Betta splendens* โคพีพอด *Apocyclops royi* MAVS

**Abstract**

Siamese fighting fish (*Betta splendens*) is one of the economically important ornamental fish in Thailand. This study found that rearing of the early larval betta fish with copepod *Apocyclops royi* significantly up-regulate the expression level of mitochondrial antiviral signaling (BsMAVS) transcript. BsMAVS is an antiviral gene encoded for a predicted protein of 569 amino acids, with N-terminal caspase recruitment domain, proline-rich domain, and C-terminal transmembrane domain. BsMAVS transcript in fish gut was significantly up-regulated upon poly(I:C) stimulation. These results suggested the potential of copepod *A. royi* as live feed for enhancing the antiviral response in betta fish larvae.

**Keyword:** Siamese fighting fish, *Betta splendens*, Copepod, *Apocyclops royi*, MAVS

\* Corresponding author; e-mail address: [piti.amp@biotec.or.th](mailto:piti.amp@biotec.or.th)

<sup>1</sup> หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Program in Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Bangkok 10330

<sup>2</sup> ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University Bangkok 10330

<sup>3</sup> ทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

Marine Biotechnology Research Team, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Pathumthani 12120

<sup>4</sup> ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

### คำนำ

ปลากัดไทย (Siamese fighting fish) เป็นหนึ่งในปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมและจัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของไทยที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงจากการส่งออกทั่วโลก โดยเฉพาะชนิด *Betta splendens* Regan, 1910 (การุณ, 2554) อาหารมีชีวิตรัดเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิต สิ้นความสวยงามและความสมบูรณ์ของลูกปลากัด ในการเพาะเลี้ยงปลากัดโดยทั่วไปพบว่ายังคังนิยมใช้อาหารมีชีวิตรัดจากแหล่งน้ำตามธรรมชาติ เช่น ไรแดง ซึ่งอาจเป็นพาหะของเชื้อก่อโรค ในขณะที่อาหารมีชีวิตรัดดั้งเดิม เช่น โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย ยังมีความปลอดภัยทางโภชนาการ เช่น กรดไขมัน PUFA ต่ำและไม่คงที่ เมื่อเทียบกับโคพีพอด (พิชญา, 2559) โคพีพอดเป็นหนึ่งในแหล่งกักตุนสัตว์ที่มีความสำคัญเนื่องจากเป็นอาหารมีชีวิตรัดของสัตว์น้ำแรกเกิดในธรรมชาติ และมีขนาด รูปแบบการว่ายน้ำ และคุณค่าทางโภชนาการที่สูงและเหมาะสมกับตัวอ่อนของปลา โคพีพอดจึงเป็นอาหารมีชีวิตรัดที่น่าสนใจในการนำมาใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำ โดยโคพีพอด *Apocyclops royi* เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย จัดอยู่ในกลุ่มไซโคลพอยด์ พบอาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำและในมวลน้ำ มีวงจรชีวิตสั้น มีขนาดที่หลากหลายตามช่วงของระยะพัฒนาการ และมีคุณค่าทางโภชนาการสูง (Amparyup *et al.*, 2022) จากรายงานวิจัยพบว่าการอนุบาลด้วยโคพีพอดช่วยให้ลูกปลามีการเจริญเติบโตดีขึ้น มีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น (Olivotto *et al.*, 2010; Abbaszadeh *et al.*, 2022) นอกจากนี้ โรคระบาดเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของความสูญเสียในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงปลากัด ซึ่งเกิดขึ้นได้จากหลายสาเหตุทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส แม้ว่าปลากัดจะมีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามข้อมูลในระดับโมเลกุลและข้อมูลทางพันธุกรรมเกี่ยวกับการควบคุมและป้องกันโรคนั้นยังไม่มีข้อมูลมากนัก

Mitochondrial antiviral signaling (MAVS) เป็นโปรตีนรับส่งสัญญาณที่สำคัญในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway ซึ่งจัดเป็นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) โดยเหนี่ยวนำการสร้างอินเตอร์เฟียรอนประเภทที่ 1 (type I IFN) เพื่อกระตุ้นยีนต้านไวรัส ช่วยยับยั้งการแพร่กระจายของไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียงและตอบสนองต่อการอักเสบ โดยโปรตีน MAVS จะทำงานประสานกับตัวรับสัญญาณตรวจจับไวรัสในวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway (Krishnan *et al.*, 2018)

จากรายงานวิจัยในปลาหลายชนิดพบว่าโปรตีน MAVS มีบทบาทสำคัญในการต้านไวรัส โดยพบว่าปลาเงา *Ctenopharyngodon idella* ที่ติดเชื้อ grass carp reovirus (GCRV) ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* และปลาเก๋าดอกแดง *Epinephelus coioides* ที่ติดเชื้อ nervous necrosis virus (NNV) มีการแสดงออกของยีน MAVS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Su *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2018; Krishnan *et al.*, 2018) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมามีนักวิจัยได้ค้นพบวิถี RIG-I-like receptor signaling pathway และยีน BsMAVS ในปลากัดไทย *B. splendens* (Amparyup *et al.*, 2020) ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโคพีพอดในการเป็นอาหารมีชีวิตรัดต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากัด โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน BsMAVS และศึกษาลักษณะสมบัติและการตอบสนองต่อการจำลองการติดเชื้อไวรัสของยีน BsMAVS ในปลากัดไทย *B. splendens*

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### การเลี้ยงสาหร่ายและโคพีพอด

ทำการเลี้ยงเพิ่มจำนวนสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลที่ความเค็ม 25 ppt ใช้อาหารสูตร Guillard F/2 โดยให้แสงและออกซิเจน เป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำไปเลี้ยงโคพีพอดสายพันธุ์ *A. royi* (Amparyup *et al.*, 2022) เพิ่มจำนวนโคพีพอด *A. royi* โดยให้แสง ออกซิเจน และให้สาหร่าย *Tetraselmis* sp. เป็นอาหารแบบไม่จำกัด (*ad libitum*) เลี้ยงโคพีพอดเป็นเวลา 15 วัน ก่อนนำไปใช้อุบลาลูกปลากัด

#### การอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคพีพอด

เตรียมตัวอย่างลูกปลากัดโดยสุ่มคัดเลือกลูกปลากัดไทย *B. splendens* แรกเกิดอายุประมาณ 3 วัน จำนวน 120 ตัว และแบ่ง 60 ตัว มาชั่งน้ำหนักและวัดความยาว (น้ำหนักเฉลี่ย  $0.90 \pm 0.04$  มิลลิกรัม ความยาวเฉลี่ย  $3.39 \pm 0.18$  มิลลิเมตร) และนำลูกปลากัด 60 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1 คือ ลูกปลากัดที่อนุบาลด้วยโคพีพอด (*A. royi*) วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 21 วัน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมทำการอนุบาลลูกปลากัดด้วยไรแดง (*Moina* sp.) วันละ 3 ครั้ง เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างลูกปลากัดแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะนำไปสกัด total RNA

#### การศึกษ้อัตราการเจริญเติบโตของลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด

หลังจากสิ้นสุดการทดลอง จุดบันทึกข้อมูลความยาว และน้ำหนักตัวของลูกปลากัด จากตัวอย่างลูกปลากัดชุดทดลองที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด (*A. royi*) เป็นเวลา 21 วัน และชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยไรแดง (*Moina* sp.) เป็นเวลา 21 วัน ทำการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโต ได้แก่ เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Percent weight gain; PWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR) ตามวิธีของ (Lugert *et al.*, 2016) โดยใช้สูตรการคำนวณ ดังนี้

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Percent weight gain; PWG)

$$\text{Percent weight gain (\% (PWG))} = \frac{\text{Final weight} - \text{Initial weight}}{\text{Initial weight}} \times 100$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate; SGR)

$$\text{Specific growth rate (\% (SGR))} = \frac{\ln(\text{Final weight}) - \ln(\text{Initial weight})}{\text{Experimental days}} \times 100$$

#### การค้นหาและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน BsMAVS ในปลากัดไทย *B. splendens*

ค้นหาและนำข้อมูลยีน BsMAVS จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* (Amparyup *et al.*, 2020) มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ExPASy (<https://www.expasy.org>) ทำนายโดเมนที่สำคัญของโปรตีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ทำนาย transmembrane domain ด้วยโปรแกรม TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) ทำนายเพปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal peptide) ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 (<http://>

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

#### การจำลองการติดเชื้อไวรัสในปลากัด

แบ่งปลากัดไทย *B. splendens* ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ ปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสโดยการฉีดด้วย polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) ที่ละลายใน phosphate-buffer saline (PBS) (5 µg poly(I:C) ต่อน้ำหนักปลา 1 กรัม) จำนวน 36 ตัว กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วย PBS จำนวน 36 ตัว เก็บตัวอย่างลำไส้ ปลากัดแต่ละกลุ่มที่เวลา 0, 6, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังฉีดสารกระตุ้น โดยแช่แข็งตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะนำไปสกัด total RNA

#### การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

สกัด total RNA ด้วย TRIzol™ Reagent กำจัด DNA ที่เจือปนด้วยเอนไซม์ DNase I ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase ตรวจสอบความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของ RNA ด้วย NanoDrop spectrophotometer ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีในคู่มือของ RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### การตรวจสอบการแสดงออกของยีน BsMAVS

นำ cDNA มาตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน BsMAVS (ตารางที่ 1) วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส วิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gel-Pro Analyzer คำนวณค่า Relative mRNA expression โดยใช้ยีน BsEF1a เป็นยีนควบคุม (internal control gene) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยวิธี independent sample T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Table 1 Nucleotide sequence of the primers used.

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Product size (bp)	Purpose
BsMAVS	BsMAVS_F	CATCATCAGCAAGCAAGAAGTC	202	RT-PCR
	BsMAVS_R	CTTACACGCACACCTGAGAAAG		RT-PCR
BsEF1a	BsEF1a_F	CCCATGGCAGCTGATAACTTCA	231	RT-PCR
	BsEF1a_R	CATGGGTTTCCAGGCACCA		RT-PCR

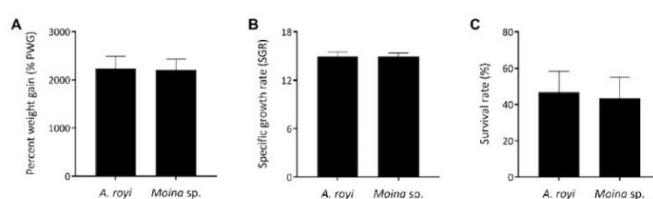
#### ผลการทดลองและวิจารณ์

##### ผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอดต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลากัด

จากการวิเคราะห์ค่าอัตราการเจริญเติบโต พบว่าลูกปลากัดไทย *B. splendens* ในกลุ่มทดลองที่ให้อินโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 21 วัน มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) เท่ากับ  $2,230.98 \pm 261.88$  เปอร์เซ็นต์ มี

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ  $14.97 \pm 0.55$  เปอร์เซ็นต์ต่อวัน และมีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ  $46.67 \pm 11.55$  เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมที่ให้กินไรแดง (*Moina* sp.) ซึ่งมีค่า PWG เท่ากับ  $2,204.35 \pm 225.96$  เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ค่า SGR เท่ากับ  $14.93 \pm 0.46$  เปอร์เซ็นต์ต่อวัน และอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ  $43.33 \pm 11.55$  เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเจริญเติบโตของลูกปลากัดที่อนุบาลด้วยโคพีพอดและไรแดง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม จากรายงานในสัปดาห์ก่อนที่ให้กินโคพีพอดพบว่าการเจริญเติบโตที่ดีกว่าสัปดาห์ก่อนที่ให้กินอาร์ทีเมีย (Olivotto et al., 2010; Abbaszadeh et al., 2022)

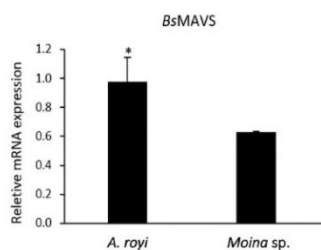


**Figure 1** Growth performance expressed as (A) percent weight gain (PWG), (B) specific growth rate (SGR) and (C) survival of *B. splendens* fed copepod *A. royi*. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate sample.

#### การแสดงออกของยีน BsMAVS ในลูกปลากัดที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด

จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน BsMAVS ในลูกปลากัดไทย *B. splendens* พบว่าลูกปลากัดที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* มีระดับการแสดงออกของยีน BsMAVS เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อนุบาลด้วยไรแดง *Moina* sp. (ภาพที่ 2) แสดงให้เห็นว่าการอนุบาลด้วยโคพีพอดมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน MAVS ซึ่งเกี่ยวข้องกับการต้านเชื้อไวรัสในปลากัดได้ดีกว่าการอนุบาลด้วยไรแดง สอดคล้องรายงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งพบว่ากุ้งขาว *Penaeus vannamei* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอดมีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Abbaszadeh et al., 2022) โดยคาดว่าเป็นผลมาจากปริมาณกรดไขมัน DHA ที่พบในโคพีพอดและไรแดง ซึ่งเท่ากับ 5.47 และ 0.03 เปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันทั้งหมด ตามลำดับ (Amparyup et al., 2022; Suhaimi et al., 2020) เนื่องจากปริมาณของ DHA มีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Eslamloo et al., 2017)

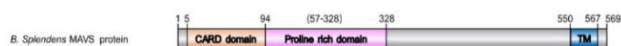
การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565



**Figure 2** The effect of dietary copepod *A. royi* on modulation of the expression of BsMAVS transcript in *B. splendens*. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate sample. \* $p < 0.05$ .

### การค้นพบและศึกษาลักษณะสมบัติของยีน BsMAVS ในปลากัด

จากการวิเคราะห์ฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* (Amparyup et al., 2020) พบว่ายีน BsMAVS มี open reading frame (ORF) ที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 569 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 60.8 kDa และมีค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.79 และพบว่า BsMAVS มีความเหมือนกับโปรตีน MAVS ของปลาเสือพ่นน้ำลายบั้ง *Toxotes jaculatrix* มากที่สุด (71%) รองลงมา คือ ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (67%) และปลาหมอเทศข้างลาย *Oreochromis aureus* (67%) โดยโปรตีน BsMAVS ประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ ได้แก่ N-terminal Caspase recruitment domain (CARD) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 5-94, proline-rich domain (PRR) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 57-328 และ C-terminal transmembrane domain (TM) บริเวณกรดอะมิโนลำดับที่ 550-567 (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับโดเมนสำคัญของยีน MAVS ที่มีรายงานในปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (Krishnan et al., 2018)

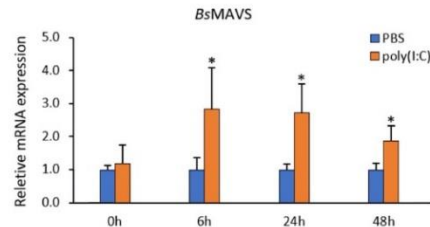


**Figure 3** Domain analysis of BsMAVS. Orange, pink and blue color indicate N-terminal caspase recruitment domain (CARD domain), proline-rich domain and C-terminal transmembrane domain (TM), respectively.

### การแสดงออกของยีน BsMAVS ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัส

จากการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน BsMAVS ในปลากัดที่จำลองการติดเชื้อไวรัสด้วยการฉีด poly(I:C) ที่เวลา 6, 24 และ 48 ชั่วโมง มีระดับการแสดงออกของยีน BsMAVS สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4) สอดคล้องกับรายงานวิจัยก่อนหน้าซึ่งพบว่าปลาที่ติดเชื้อไวรัสหรือถูกกระตุ้นด้วย poly(I:C) จะมีการแสดงออกของยีน MAVS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Su et al., 2011; Huang et al., 2018; Krishnan et al., 2018; Gao et al., 2022; Zhang et al., 2022) แสดงให้เห็นว่า BsMAVS เป็นยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัสในปลากัด

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565



**Figure 4** Relative expression levels of *BsMAVS* transcript in *B. splendens* after poly(I:C) stimulation. Data represent mean  $\pm$  SD of triplicate sample. \* $p < 0.05$ .

#### สรุปผลและเสนอแนะ

จากการศึกษาการอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคพีพอด *A. royi* และไรแดง *Moina* sp. พบว่าให้ผลการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม พบว่าการอนุบาลลูกปลากัดด้วยโคพีพอด *A. royi* สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนต้านไวรัส *BsMAVS* ให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ ผลจากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *BsMAVS* ในปลากัดพบว่ามีความเหมือนกับยีน *MAVS* ที่มีรายงานในปลาชนิดอื่น ประกอบด้วยโดเมนสำคัญ ได้แก่ N-terminal caspase recruitment domain, proline-rich domain และ C-terminal transmembrane domain โดยพบว่า *BsMAVS* เป็นยีนในระบบภูมิคุ้มกันที่มีการแสดงออกตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย poly(I:C) ผลจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่าการอนุบาลปลากัดแรกเกิดด้วยโคพีพอด *A. royi* มีประสิทธิภาพช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันต้านไวรัสของปลากัดผ่านการกระตุ้นการแสดงออกของยีน *BsMAVS* ผลการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษากลไกการต้านทานเชื้อไวรัสก่อโรคในปลากัดได้ในอนาคต

#### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ SCA-CO-2563-12238

#### เอกสารอ้างอิง

- การุณ ทองประจักษ์แก้ว. 2554. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีของเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พิชญา ชัยนาค. 2559. ข้อมูลพื้นฐานโคพีพอด. ใน การฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงโคพีพอดในบ่อดินเพื่อสนับสนุนธุรกิจการเลี้ยงกุ้งทะเล, ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, ภูเก็ต. (อัคร์ดำเนินา)

การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

- Abbaszadeh, A., Mozanzadeh, M.T., Qasemi, A., Oujifard, A., Bahabadi, M.N. 2022. Effects of the addition of *Calanopia elliptica*, *Artemia franciscana*, and *Brachionus rotundiformis* in a nursery biofloc system on water quality, growth, gut morphology, health indices, and transcriptional response of immune and antioxidant-related genes in *Penaeus vannamei*. **Aquaculture International** 30, 653-676.
- Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N., Chumtong, P., Yocawibun, P., Imjongjirak, C. 2020. Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). **Fish and Shellfish Immunology** 99, 403-413.
- Amparyup, P., Sungkaew, S., Charoensapsri, W., Tapaneeyaworawong, P., Chumtong, P., Yocawibun, P., Pantong, P., Wongpanya, R., Imjongjirak, C., Powtongsook, S., 2022. Molecular characterization of biosynthesis of polyunsaturated fatty acids during different developmental stages in the copepod *Apocyclops royi*. **Aquaculture Reports** 23, 101064.
- Eslamloo, K., Xue, X., Hall, J.R., Smith, N.C., Caballero-Soares, A., Parris, C.C., Taylor, R.G., Rise, M.L. 2017. Transcriptome profiling of antiviral immune and dietary fatty acid dependent responses of Atlantic salmon macrophage-like cells. **BMC Genomics** 18, 706.
- Huang, Y., Zhang, J., Ouyang, Z., Liu, J., Zhang, Y., Hu, Y., Huang, X., Qin, Q. 2018. Grouper MAVS functions as a crucial antiviral molecule against nervous necrosis virus infection. **Fish and Shellfish Immunology** 72, 14-22.
- Gao, X., Zhang, Y., Zheng, J., Yang, X., Wang, Y., Qin, Q., Huang, X., Huang, Y. 2022. Grouper interferon-induced protein 35, a CP-interting protein, inhibits fish nodavirus replication via positively regulating host interferon and inflammatory immune response. **Fish and Shellfish Immunology**. 128, 113-122.
- Krishnan, R., Girish Babu, P., Jeena, K., Tripathi, G., Pani Prasad, K. 2018. Molecular characterization, ontogeny and expression profiling of mitochondrial antiviral signaling adapter, MAVS from Asian seabass *Lates calcarifer*, Bloch (1790). **Developmental and Comparative Immunology** 79, 175-185.
- Lugert, V., Thaller, G., Tetens, J., Schulz, C., Krieter, J., 2016. A review on fish growth calculation: multiple functions in fish production and their specific application. **Reviews in Aquaculture** 8, 30-42.
- Olivotto, I., Tokle, N.E., Nozzi, V., Cossignani, L., Carnevali, O. 2010. Preserved copepods as a new technology for the marine ornamental fish aquaculture: a feeding study. **Aquaculture** 308, 124-131.



การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 19 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน วันที่ 8-9 ธันวาคม 2565

Su, J.G., Huang, T., Yang, C.R., Zhang, R.F. 2011. Molecular cloning, characterization and expression analysis of interferon-beta promoter stimulator 1 (IPS-1) gene from grass carp *Ctenopharyngodon idella*. **Fish and Shellfish Immunology** 30, 317-323.

Suhaimi, H., Yuslan, A., Azani, N., Habib, A., Liew, H.J., Rasdi, N.W. 2020. Effect of dietary enhanced *Moina macrocopa* (Straus, 2820) on the growth, survival and nutritional profiles of hybrid Nile tilapia fry. **Egyptian Journal of Aquatic Research** 48, 67-73.

Zhang, Y., Sun, J., Shi, Y., Liu, X., Zhang, M., Xu, B., Song, J., Song, Z., Guan, X., Shi, W., Liu, M. 2022. *Oncorhynchus mykiss* OmTRIM25 activates the interferon-1 pathway and positively regulates the antiviral innate immune response to infectious hematopoietic necrosis virus. **Aquaculture**. 560, 738435



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นุสรีย์ สามาลูกา
วัน เดือน ปี เกิด	28 มิถุนายน 2540
สถานที่เกิด	จังหวัดยะลา
วุฒิการศึกษา	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2562 และเข้าศึกษาในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2563
ที่อยู่ปัจจุบัน	85/1 หมู่ 4 ตำบลลำใหม่ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา 95160
ผลงานตีพิมพ์	Samaluka, N., Charoensapsri, W., Amparyup, P., Imjonggirak, C. 2022. Activation of antiviral gene, MAVS, in Siamese fighting fish <i>Betta splendens</i> larvae rearing with copepod <i>Apocyclops royi</i> . In The proceedings of The 19th Kasetsart University Kamphaeng Saen National Conference. pp. 2591-2599.  Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N., Chumtong, P., Yocawiwibun, P., Imjonggirak, C. 2020. Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish ( <i>Betta splendens</i> ). <i>Fish Shellfish Immunology</i> . 99, 403-413.