ศักยภาพของโคพีพอด *Apocyclops royi* เพื่อใช้อนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*

น.ส.ฮับเซาะ มามะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

POTENTIAL OF COPEPOD *Apocyclops royi* FOR USING AS LARVICULTURE OF GIANT RIVER PRAWN *Macrobrachium rosenbergii*

Miss Habsoh Mama

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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	ศักยภาพของโคพีพอด *Apocyclops royi* เพื่อใช้อนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*
โดย	น.ส.ฮับเซาะ มามะ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.ปิติ อำพายัพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา ธนานุวงศ์)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.ปิติ อำพายัพ)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากร)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ฮับเซาะ มามะ : ศักยภาพของโคพีพอด *Apocyclops royi* เพื่อใช้อนุบาลลูกกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii*. (POTENTIAL OF COPEPOD *Apocyclops royi* FOR USING AS LARVICULTURE OF GIANT RIVER PRAWN *Macrobrachium rosenbergii*) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.ปิติ อำพายัพ

กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย *โคพีพอดเป็น*สัตว์น้ำขนาดเล็กอยู่ในกลุ่ม*ครัสเตเชีย* โคพีพอดมีบทบาทสำคัญเป็นอาหารธรรมชาติของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในการใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน เช่น ปลาและหอย อย่างไรก็ตาม การศึกษาการใช้โคพีพอดในการอนุบาลกุ้งก้ามกราม*วัยอ่อน M. rosenbergii ยัง*มีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้โคพีพอด *A. royi* เป็นอาหารมีชีวิตต่ออัตราการเจริญเติบโต การแสดงออกของยีน และชีวนิเวศจุลชีพของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (กลุ่มควบคุม) ผลจากการศึกษาพบว่ากุ้งก้ามกราม*วัยอ่อน M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* ให้เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย ทั้งนี้ จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน Myostatin (*Mr*MSTNa) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบในกุ้งก้ามกราม พบว่าลำดับกรดอะมิโนของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกรามมีความเหมือนกับยีน Myostatin ของกุ้ง *M. nipponense* มากที่สุด และจากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม*วัยอ่อน M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอดพบมีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย นอกจากนี้พบว่าการแสดงออกของยีน *Ar*LGBP มีการแสดงออกสูงขึ้นในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* และยีน Hsp70 ไม่พบการเปลี่ยนแปลง ทั้งนี้จากการวิเคราะห์ชีวนิเวศจุลชีพพบว่าการเพิ่มขึ้นของกลุ่มแบคทีเรียที่ดี (Firmicutes) หลังจากการให้โคพีพอดเป็นอาหาร และพบการลดลงของกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ดี (Proteobacteria) จากข้อมูลทั้งหมดที่ได้ บ่งชี้ว่ากุ้งก้ามกราม*วัยอ่อน M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพการเจริญเติบโต และสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกัน และเพิ่มแบคทีเรียที่ดีแก่เจ้าบ้าน ผลจากการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา	2565	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....
		ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม ....

6370043523 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORD: Macrobrachium rosenbergii, Copepod (Apocyclops royi), Growth rate, Immune genes

Habsoh Mama : POTENTIAL OF COPEPOD *Apocyclops royi* FOR USING AS LARVICULTURE OF GIANT RIVER PRAWN *Macrobrachium rosenbergii*. Advisor: Assoc. Prof. Dr. CHANPRAPA IMJONGJIRAK Co-advisor: Dr. Piti Amparyup

Giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) is an economically important aquatic animal in Thailand. Copepods are a group of small crustaceans and one of the important foods for fish and shellfish larvae. However, studies of the copepod as live feed for *M. rosenbergii* larvae are still very limited. This study aimed to investigate the efficiency of using copepod *Apocyclops royi* as live feed for *M. rosenbergii* larviculture. The growth performance, gene expression, and microbiota of prawn were evaluated after dietary administration of the copepod compared with Artemia as the control group. The results showed that feeding of prawn larvae with copepod *A. royi* significantly increased the percentage weight gain (PWG) and specific growth rate (SGR) as compared to the control group. The characterization of the Myostatin gene (*Mr*MSTNa) in *M. rosenbergii* which is a negative growth-regulating gene indicated that *Mr*MSTNa exhibited the highest amino acid sequence identity to the MSTN of prawn *M. nipponense*. The gene expressions of *Mr*MSTNa gene in prawn larvae fed the copepod was significantly down-regulated as compared to the control group. In addition, the mRNA expression of *Ar*LGBP gene was up-regulated in the *M. rosenbergii* fed copepod, and the Hsp70 gene remained unaffected. The microbiome analysis revealed an increase in the groups of beneficial bacteria (Firmicutes) after administration of copepod and a decrease in the groups of harmful bacteria (Proteobacteria). Together the data suggest that *M. rosenbergii* larvae rearing with copepod *A. royi* efficiently promoted the growth performance and can enhance immune-gene expression, and increase the good microbiota of the host. The results of this study demonstrate the importance of copepod *A. royi* as a suitable alternative larvae feed for *M. rosenbergii* larvae aquaculture.

Field of Study:	Biotechnology	Student's Signature ....
Academic Year:	2022	Advisor's Signature ....
		Co-advisor's Signature ....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องด้วยได้รับความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก รองศาสตราจารย์ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร.ปิติ อ่ำพายัพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อชี้แนะ และข้อคิดเห็นต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย คอยช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาของการทำวิจัย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานุวงศ์ ประธานสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศานิต ปิยพัฒนากร และรองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี วงศ์ปัญญา ที่ได้กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และชี้แนะ ให้คำปรึกษาในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความรู้ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ(ไบโอเทค) และศูนย์เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ และเครื่องมือในการทำวิจัยจนสามารถดำเนินการวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณโครงการทุนสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (Thailand Graduate Institute of Science and Technology: TGIST) ที่ได้สนับสนุนค่าเล่าเรียน ค่าใช้จ่ายส่วนตัว รวมถึงค่าใช้จ่ายบางส่วนในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อฮาซัน คุณแม่ปิเนาะ และครอบครัวที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าได้รับกำลังใจที่ดี และทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้เสร็จลุล่วง

ฮับเซาะ มามะ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 บทนำ 1

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์ 4

2.1 กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) 4

2.1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม 4

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 5

2.1.3 ถิ่นกำเนิด 6

2.1.4 การแพร่กระจาย 6

2.1.5 การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย 6

2.1.6 ลักษณะเพศ 7

2.1.7 การลอกคราบ 7

2.1.8 ฤดูผสมพันธุ์ 7

2.1.9 การผสมพันธุ์ 8

2.1.10 การวางไข่และการฟักไข่ 8

2.1.11 พัฒนาการของกุ้งก้ามกราม 9

2.2 โคพีพอด (Copepod) 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.2.1 ลักษณะทั่วไป (General features) 10

2.2.2 การกินอาหาร (Nutrition) 11

2.2.3 การสืบพันธุ์ (Reproduction) 11

2.2.4 วงจรชีวิตของโคพีพอด 11

2.2.5 ลักษณะของตัวอ่อนโคพีพอดแต่ละระยะมีดังนี้ 12

2.2.6 วิธีการเพาะขยายพันธุ์โคพีพอด 13

2.2.7 สายพันธุ์ของโคพีพอด 13

2.2.8 อนุกรมวิธานของโคพีพอดสายพันธุ์ *(Apocyclops royi)* 14

2.3 อาร์ทีเมีย (Artrmia) 15

3.1 อนุกรมวิธานของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) 16

2.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอาร์ทีเมีย 17

2.3.3 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย 17

2.3.4 ถิ่นกำเนิดของอาร์ทีเมีย 17

2.3.5 การเพาะขยายพันธุ์อาร์ทีเมีย 18

2.3.6 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย 18

2.3.7 การวางไข่และการฟักไข่ของอาร์ทีเมีย 18

2.4 คุณค่าทางโภชนาการของ โคพีพอด และอาร์ทีเมีย 18

2.5 ยีน Myostatin (MSTN) 21

2.6 ยีน heat shock protein 70 (HSP70) 22

2.7 ยีน lipopolysaccharide and β-1, 3-glucan binding protein (LGBP) 22

2.8 เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) 22

2.9 เทคนิค Gel electrophoresis 23

2.10 ชีวนิเวศจุลชีพ (Microbiome) 23

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 25

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.1 วัตถุดิบ.. 25
3.1.1 สาหร่าย *Tetraselmis* sp. 25
3.1.2 โคพีพอด สายพันธุ์ *Apocyclops royi* 25
3.1.3 อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*)... 26
3.1.4 กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879) 27
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.. 27
3.2.1 อุปกรณ์ 27
3.2.2 สารเคมี... 28
3.3 การวางแผนการทดลอง... 29
3.4 สถานที่ทดลอง 29
3.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน 29
3.5.1 การเตรียมสาหร่าย *Tetraselmis* sp. สำหรับให้เป็นอาหารโคพีพอด........................ 29
3.5.2 การเตรียมโคพีพอดสำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 30
3.5.3 การเตรียมอาร์ทีเมียสำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 30
3.5.4 การอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*M. rosenbergii*) ด้วยโคพีพอด 31
3.5.5 การศึกษาผลของโคพีพอดต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 31
3.5.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน Myostatin ในกุ้งก้ามกราม.................................... 31
3.5.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semiquantitative RT-PCR................. 32
3.5.8 การศึกษา Microbiome 35
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง... 39
4.1 การศึกษาผลของโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* 39
4.2 การแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* 41

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.2.1 การศึกษาลักษณะสมบัติและการแสดงออกของยีน MrMSTNa 41

4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน heat shock protein 70 (HSP70)........................ 42

4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน lipopolysaccharide and β-1, 3-glucan binding protein (LGBP) 44

4.3 การศึกษาไมโครไบโอม (Microbiome) ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน M. rosenbergii ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด A. royi 45

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ 49

5.1 สรุปผลการทดลอง 49

5.2 ข้อเสนอแนะ 49

บรรณานุกรม.. 50

ประวัติผู้เขียน.. 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 พัฒนาการของกุ้งก้ามกราม 9

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์กรดไขมันทั้งหมดของโคพีพอด โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย 21

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของโปรตีนทั้งหมดในโคพีพอด โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย 21

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR 34

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน 34

ตารางที่ 6 PCR Cycle, RNA 34

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR, DNA 36

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR, DNA 36

ตารางที่ 9 PCR Cycle, DNA 36

ตารางที่ 10 Run gel Check, DNA 37

ตารางที่ 11 การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 39

ตารางที่ 12 ประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 กุ้งก้ามกราม 5

รูปที่ 2 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของกุ้งก้ามกราม 6

รูปที่ 3 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม 9

รูปที่ 4 วงจรชีวิตของโคพีพอด 12

รูปที่ 5 สัณฐานวิทยาของนอเพลียส โคพีโพดิด และระยะตัวเต็มวัยของโคพีพอด 14

รูปที่ 6 แสดงลักษณะภายนอกของอาร์ทีเมีย 16

รูปที่ 7 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย 17

รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์อัตรารอดในแต่ละวันของตัวอ่อนปลาแมนดาริน 19

รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของปลาการ์ตูนลายปล้อง 19

รูปที่ 10 ความยาวและน้ำหนักของปลาการ์ตูนลายปล้อง 20

รูปที่ 11 สาหร่ายเตตร้าราเซลมิส 25

รูปที่ 12 ตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์แสดงสัณฐานวิทยาของโคพีพอด 25

รูปที่ 13 อาร์ทีเมีย 26

รูปที่ 14 กุ้งก้ามกราม 27

รูปที่ 15 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตตร้าราเซลมิส 29

รูปที่ 16 การเพาะเลี้ยงโคพีพอด 30

รูปที่ 17 การเตรียมอาร์ทีเมีย (American eagle, USA) 30

รูปที่ 18 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน 40

รูปที่ 19 การจัดโดเมนและ sequence alignment ของยีน MSTN 41

รูปที่ 20 ผลระดับการแสดงออกของยีน MSTN 42

รูปที่ 21 ผลระดับการแสดงออกของยีน HSP70 43

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 22 ผลระดับการแสดงออกของยีน LGBP 44

รูปที่ 23 กราฟแสดงประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* 46

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

กุ้งก้ามกราม (Giant freshwater prawn) เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดที่มีทางติดต่อกับทะเล และแหล่งน้ำกร่อยในบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879) กุ้งก้ามกรามเป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่ เนื้อกุ้งมีรสชาติที่ดีเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้มีมูลค่าสูงเมื่อเทียบกับสัตว์น้ำจืดหลายชนิด แต่ทั้งนี้ในปัจจุบันกุ้งก้ามกรามที่ได้จากในแหล่งน้ำธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงอย่างมากเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น การสร้างเขื่อนกั้นน้ำ ทำให้กุ้งไม่สามารถอพยพไปวางไข่ในบริเวณปากแม่น้ำได้ การทำการประมงที่มากเกินกำลังผลิตตามธรรมชาติ การทำประมงอย่างไม่ถูกวิธี รวมถึงปัญหามลภาวะเป็นพิษของสิ่งแวดล้อม เช่น การเน่าเสียของแม่น้ำลำคลอง เป็นต้น

ทั้งนี้ ในประเทศไทยจะเห็นได้ว่ามีการเพาะเลี้ยง*กุ้งก้ามกราม*อย่างแพร่หลาย เนื่องจากประเทศไทย มีสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศ แหล่งน้ำ และ สาธารณูปโภคที่มีความอุดมสมบูรณ์ และมีความพร้อมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สาเหตุที่เกษตรกรนิยมเพาะพันธุ์และเพาะเลี้ยงกุ้งชนิดนี้เนื่องจากกุ้งชนิดนี้เป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำจืดหลายชนิด และยังสามารถเพาะพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี จึงเป็นอาชีพที่ทำรายได้ดีให้แก่เกษตรกร ความต้องการของตลาดที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้มีการเพาะเลี้ยง*กุ้งก้ามกราม*มากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพาะพันธุ์กุ้งก้ามกรามให้ประสบผลสำเร็จนั้นต้องอาศัย ทักษะ ความรู้ความเข้าใจและประสบการณ์พร้อมทั้งการดูแลเอาใจใส่ เพื่อให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพดี กระบวนการเพาะเลี้ยงและการจัดการฟาร์มยังเป็น แบบพื้นบ้าน เกษตรกรใช้ความรู้ที่ถ่ายทอดกันมาโดยขาดหลักอ้างอิงทางวิชาการ อีกทั้งเทคนิคการเพาะพันธุ์ของฟาร์มแต่ละแห่งอาจแตกต่างกัน ทำให้ต้นทุนการผลิตแตกต่างกัน ผลผลิตที่ได้ไม่สม่ำเสมอ และไม่สามารถควบคุมคุณภาพของการผลิตได้ ซึ่งต้นทุนการผลิตแตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าต้นทุนกว่า 50 เปอร์เซ็นต์หมดไปกับอาหารที่ใช้อนุบาลลูกกุ้ง โดยเฉพาะอาร์ทีเมีย ซึ่งปัจจุบันไข่อาร์ทีเมียที่มีคุณภาพดีมีราคาสูงมาก (ประมาณ 2,000 บาท/ กระป๋อง) แต่ทั้งนี้การเพาะเลี้ยง*กุ้งก้ามกราม*ในไทยนับว่ายังมีโอกาสขยายตัวเพิ่มได้อีกเนื่องจากยังมีความต้องการของตลาด*กุ้งก้ามกรามที่สูงขึ้น* โดยในปัจจุบันการประยุกต์ใช้โคพีพอดในการอนุบาลกุ้งวัยอ่อนมีประโยชน์อย่างมากเนื่องจากคุณสมบัติของโคพีพอดที่เหมาะสมช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มอัตราการรอดของสัตว์น้ำวัยอ่อน อีกทั้งยังสามารถช่วยลดต้นทุนของอาหาร ทำให้เกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนให้มีผลผลิตเพิ่มมากขึ้นได้

โคพีพอด (Copepod) เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สำคัญในอ่าวไทย พบได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม เป็นห่วงโซ่อาหาร สำคัญที่เชื่อมระหว่างแพลงก์ตอนพืชกับสัตว์น้ำวัยอ่อน โคพีพอดมีลำตัวแบ่งเป็นปล้องและมีระยางค์ เจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบ ตัวอ่อนของโคพีพอดมี 2 ระยะ

ระยะแรกเรียกว่า นอเพลียส (nauplius) ระยะหลังเรียกว่าโคพิโพดิด (Copepodid) หลังระยะโคพิโพดิดที่ 5 จะเป็นระยะโตเต็มวัย โคพีพอด มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ทั้งนี้โคพีพอดเป็นครัสเตเชียน (crustacean) ขนาดเล็กดำรงชีพอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งโคพีพอดบางชนิดพบดำรงชีพอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น แต่ส่วนใหญ่ดำรงชีพอย่างอิสระ (free living) มีบทบาทสำคัญเป็นผู้บริโภคแพลงก์ตอนพืชและเป็นอาหารของสัตว์น้ำในห่วงโซ่อาหารของระบบนิเวศแหล่งน้ำ และยังเป็นอาหารธรรมชาติ (natural food) ที่สำคัญในแหล่งเลี้ยงสัตว์น้ำอีกด้วย จากบทบาทดังกล่าวโคพีพอดจึงจัดเป็นอาหารมีชีวิต (live feed) ที่มักใช้ร่วมกับโรติเฟอร์ (rotifer) อาร์ทีเมีย (Artemia) และแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มสาหร่ายสีเขียว (green algae) และไดอะตอม (diatom) เป็นต้น ในการอนุบาลสัตว์น้ำเค็มวัยอ่อนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากสัตว์น้ำวัยอ่อนมีการพัฒนาระบบการมองเห็นและระบบทางเดินอาหารยังไม่สมบูรณ์ จึงเป็นข้อจำกัดในการจับกินและการย่อยอาหารในช่วงแรกหลังฟักออกจากไข่ แต่พบว่าโคพีพอดระยะตัวอ่อนมีขนาดเหมาะสมต่อการกินของสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีขนาดความกว้างของช่องปากค่อนข้างเล็ก และสามารถย่อยได้ง่ายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน ทั้งนี้โคพีพอดยังมีความโดดเด่นในด้านการมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids; PUFA) ในปริมาณสูง และยังมีโปรตีน รงควัตถุ วิตามิน และสารอาหารอื่น ๆ ที่สำคัญทางโภชนาการ ซึ่งมีความเหมาะสมและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน นอกจากนี้โคพีพอดยังมีวงจรชีวิตสั้น และมีขนาดที่หลากหลาย ได้แก่ในระยะนอเพลียส (nauplius) ระยะโคพีพอดิด (copepodid) และระยะตัวเต็มวัย (adult) เหมาะสมแก่การนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มขยายปริมาณเพื่อเก็บเกี่ยวผลผลิตใช้ในโรงเพาะฟักสัตว์น้ำ

โคพีพอดสายพันธุ์ *Apocyclops royi* เป็นโคพีพอดในกลุ่มไซโคลพอยด์โคพีพอด (cyclopoid copepods) ที่นิยมนำมาใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำ เช่น ปลา และกุ้ง ในประเทศไต้หวัน เนื่องจากโคพีพอด *A. royi* เป็นโคพีพอดน้ำกร่อยที่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของความเค็มได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้โคพีพอด *A. royi* ระยะนอเพลียสและโคพิโพดิดถึงตัวเต็มวัย มีขนาดเท่ากับ 150 และ 600 ไมโครเมตร ตามลำดับ จึงเหมาะสมต่อการกินของสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีขนาดความกว้างของช่องปากค่อนข้างเล็ก อีกทั้งโคพีพอด *A. royi* เป็นโคพีพอดที่สามารถย่อยได้ง่ายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน และยังมีวงจรชีวิตที่รวดเร็วโดยใช้ระยะเวลาพัฒนาจากนอเพลียสเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยเท่ากับ 15-16 วัน ดังนั้นนอเพลียสของ *A. royi* จึงมีขนาดที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการอนุบาลลูกสัตว์น้ำเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนซึ่งมีขนาดปากที่เล็ก ทั้งนี้โคพีพอด *A. royi* จะกินสาหร่ายขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในน้ำเป็นอาหาร

มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โคพีพอดในสัตว์น้ำหลายชนิด แต่รายงานการใช้โคพีพอดในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนยังมีอยู่อย่างจำกัด งานวิจัยนี้จึงมีเป้าหมาย เพื่อประยุกต์ใช้โคพีพอดในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนต่ออัตราการเจริญเติบโต โดยมีวัตถุประสงค์ (1) เพื่อศึกษาผลของการ

อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* (2) เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* (3) เพื่อศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่อการแสดงออกของยีนในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* และ (4) ศึกษาชีวนิเวศจุลชีพ (*Microbiome*) ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* โดยโคพีพอดสามารถนำไปต่อยอดเป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลลูกกุ้งเพิ่มอัตรารอดและเสริมภูมิคุ้มกันในการต้านโรคของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน จึงมีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งองค์ความรู้พื้นฐานจากโครงการวิจัยนี้ จะนำไปสู่การมุ่งเน้นเพิ่มประสิทธิภาพของการประยุกต์ใช้โคพีพอดเป็นอาหารมีชีวิตในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน และสัตว์น้ำ ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรในการนำไปใช้เพื่อป้องกันและต่อสู้กับปัญหาของโรคต่างๆที่อาจเกิดขึ้นในสัตว์น้ำ และยังเป็นการช่วยเพิ่มความเข้มแข็งและช่วยสร้างความยั่งยืนให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii*
2. เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. Rosenbergii*
3. เพื่อศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่อการแสดงออกของยีนในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii*
4. เพื่อศึกษาชีวนิเวศจุลชีพ (*Microbiome*) ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 กุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

2.1.1 อนุกรมวิธานของกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม (Giant river prawn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Macrobranchium rosenbergii* (De Man, 1879) เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง (รูปที่ 1) ที่อยู่ในวงศ์ Palaemonidae กุ้งก้ามกรามมีชื่อเรียกที่ต่างออกไปมากมาย ในแต่ละท้องที่จะมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น กุ้งแม่น้ำ กุ้งหลวง ขณะที่กุ้งตัวเมียที่มีขนาดลำตัวเล็กกว่า เรียก กุ้งนาง เป็นต้น ทั้งนี้ สามารถจัดลำดับหมวดหมู่ (classification) ทางอนุกรมวิธานกุ้งก้ามกราม โดยละเอียดได้ดังนี้ (Holthius. 1980; Dore and Frimodt. 1987)

Phylum	Arthropoda
Subphylum	mandibulata
Class	Crustacea
Subclass	Malacostraca
Order	Decapoda
Infraorder	Caridea
Superfamily	Palaemonoidae
Family	Palaemonidae
Subfamily	Palaemoninae
Genus	Macrobrachium
Species	rosenbergii (De Man, 1879)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมจากเกษตรกรในการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย โดยมีการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ในทุกภูมิภาคของประเทศไทย สาเหตุที่เกษตรกรนิยมเลี้ยงกุ้งชนิดนี้ เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี เป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้

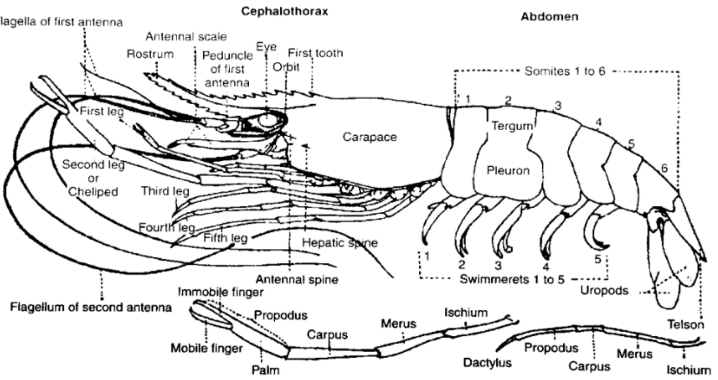
มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำจืดหลายชนิด จึงเป็นอาชีพที่ทำรายได้ดีให้แก่เกษตรกร โดยในปี พ.ศ. 2543 มีรายงานการผลิตกุ้งก้ามกรามทั่วโลกจำนวน 118,500 ตัน มูลค่า 410,481 พันล้านเหรียญสหรัฐ (FAO, 2549) ในปี พ.ศ. 2546 มีจำนวนถึง 21,804 ตัน (การประมง, 2548)

รูปที่ 1 กุ้งก้ามกราม
(ที่มา : กองวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, กรมประมง)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์เลือดเย็น หายใจด้วยเหงือก เจริญเติบโตด้วยการลอกคราบ โดยปกติชอบหลบซ่อนตัวอยู่เงียบๆ ตามพื้นน้ำ ทั้งนี้ กุ้งก้ามกรามเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังแต่มีเปลือกหุ้มอยู่ภายนอก ลักษณะโดยทั่วไปจะมีก้ามยาวมีสีครามหรือม่วงเข้ม ตลอดทั้งก้ามมีปุ่มตะปุ่มตะป่ำ ลำตัวของกุ้งก้ามกรามจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนหาง ส่วนหัว ประกอบด้วยขาเดิน 3 คู่ และขาที่มีลักษณะเป็นก้ามอีก 2 คู่ อยู่ทางส่วนหน้า คู่ที่ 2 มีขนาดความยาวและใหญ่กว่าคู่ที่ 1 ซึ่งใช้ประโยชน์ในการต่อสู้และจับเหยื่อ ส่วนคู่ที่ 1 นั้น ใช้ป้อนอาหารเข้าปากและทำความสะอาดร่างกายส่วนปลายสุดของหัวประกอบด้วยกรีมีลักษณะแบนด้านข้าง ส่วนโคนหนาและนูนเรียวแหลมไปทางส่วนปลายตรงกลางกรีโค้งแอ่นลง ส่วนปลายงอนขึ้นที่สันกรี ด้านบนและล่างมีหยักหนามคล้ายฟันเลื่อย จำนวนหนามบนสันกรีล่างมี 8-14 ซี่ สันกรีบนมี 12-15 ซี่ ตาอยู่บนก้านซึ่งยาวยื่นออกมาและเคลื่อนไหวได้ ส่วนลำตัวแบ่งออกเป็นปล้องๆ รวม 6 ปล้อง ด้านล่างของส่วนลำตัวมีขาว่ายน้ำจำนวน 5 คู่ ระหว่างปล้องที่ 1 ถึงปล้องที่ 5 ส่วนหาง ประกอบด้วยแพนหาง ข้างละ 1 คู่ ตรงส่วนกลางเป็นปลายหางแหลม (New and Singholka, 2000) (รูปที่ 2)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 2 ลักษณะทางกายภาพภายนอกของกุ้งก้ามกราม
(ที่มา : Cowles และคณะ, 1914)

2.1.3 ถิ่นกำเนิด

กุ้งก้ามกรามมีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ และพบในหลายประเทศ เช่น ไทย พม่า มาเลเซีย อินเดีย บังกลาเทศ ศรีลังกา อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ กัมพูชา และเวียดนาม พบในแม่น้ำที่ไหลมาบรรจบกับทะเล เนื่องจากตัวอ่อนต้องอยู่ในน้ำกร่อยระยะหนึ่งแล้วจึงย้ายไปอยู่ในน้ำจืดจนโตเต็มวัย (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2552)

2.1.4 การแพร่กระจาย

ในประเทศไทยพบได้เกือบทุกจังหวัดในภาคกลางและภาคใต้ พบทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อยหลายแห่ง เช่น สุราษฎร์ธานี ปัตตานี ทะเลสาบสงขลา พัทลุง ชุมพร ภูเก็ต นครศรีธรรมราช ประจวบคีรีขันธ์ ในภาคกลาง เกือบทุกจังหวัด โดยเฉพาะชุกชุมในลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา นนทบุรี แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำบางปะกง ปทุมธานี อยุธยา ชัยนาท อ่างทอง นครสวรรค์ โดยเฉพาะราชบุรี สุพรรณบุรี ยังมีสมุทรปราการ สมุทรสงคราม สมุทรสาคร หรือเกือบทุกจังหวัดในภาคกลาง (ประจวบ 2525)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.1.5 การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในประเทศไทย

กุ้งก้ามกรามมีประวัติการเลี้ยงมานานหลายปี ในประเทศไทย เริ่มตั้งแต่ปี พ.ศ. 2504 ได้มีการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในตู้กระจก และจากการสังเกตพบว่า การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามจะต้องมีการลอกคราบเป็นระยะ ๆ และระยะเวลาลอกคราบห่างกันมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของอาหารที่ให้ รวมถึงการถ่ายน้ำที่นับเป็นจุดเริ่มต้นของการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในที่กักขังและได้มีการพัฒนาเป็นลำดับ (ประจวบ, 2527) ทั้งนี้ได้ทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในระบบน้ำหมุนเวียนในบ่อซีเมนต์ พบว่าลูกกุ้งก้ามกรามสามารถโตและคว่ำได้ภายใน 26-28 วัน และสามารถลดการใช้น้ำได้ถึงร้อยละ 80

ซึ่งถือเป็นการลดต้นทุนการผลิตลูกกุ้งได้อีกขั้นหนึ่ง เพราะใช้เวลาในการเลี้ยงสั้นกว่าและต้นทุนน้อยกว่า (ประจวบ, 2525)

2.1.6 ลักษณะเพศ

กุ้งเพศผู้มีเปลือก (pleure) ที่ด้านท้องมองเห็นได้ชัดเจนกว่ากุ้งเพศเมีย โดยเฉพาะกุ้งตัวเต็มวัย กุ้งเพศผู้มีขาเดินขนาดใหญ่คู่ที่ 2 เป็นด้ามและยาวกว่ากุ้งเพศเมีย ขาว่ายน้ำของกุ้งเพศมีย 4 คู่แรกมีขนเล็กๆ ซึ่งเห็นได้ชัดในฤดูวางไข่ กุ้งเพศเมียจะสืบพันธุ์ในโคนขาคู่ที่ 3 ที่โคนขาว่ายคู่ที่ 2 มีรยางค์เล็กๆ ยื่นออกมา 2 อัน อันหนึ่งคือ อันหนึ่งเป็นระยางค์เพศผู้ (Appealit masculina) กับ (Appendix intern) ในฤดูวางไข่ เปลือกหุ้มหัวกุ้งเพศเมียจะมีสีสด หรือสีเหลืองอมแดงเด่นชัด โดยบริเวณดังกล่าวนั้นเป็นที่ตั้งของรังไข่ จะไม่ปรากฏในกุ้งเพศผู้ (บรรจง, 2531)

2.1.7 การลอกคราบ

กุ้งเมื่อจะลอกคราบมักมีอาการเบื่ออาหาร ไม่ค่อยเคลื่อนไหวสงบนิ่งอยู่ตามพื้น ตาขุ่นมัวมีเยื่อ บางๆ ปกคลุมไม่สดใสเหมือนเวลาปกติ เปลือกจะเปลี่ยนสีเป็นสีเหลืองปนน้ำตาลอ่อนๆ สังเกตได้ง่าย ลำตัวมีรอยขีดข่วน นอกจากอาการดังกล่าวแล้ว ถ้าสังเกตที่กรีกุ้งจะพบว่ากุ้งที่ลอกคราบ จะมีเปลือกที่เกิดขึ้นใหม่อยู่ภายในอย่างชัดเจน กุ้งจะลอกคราบภายใน 1 หรือ 2 วัน โดยทั่วไป กุ้งจะลอกคราบช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับขนาด ระยะเวลาผสมพันธุ์ แสง อุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส กุ้งจะสลัดเปลือกนอกทุกส่วนของร่างกายทั้งหมดในระยะเวลาเพียง 5 นาที เมื่อต้องการสลัดเปลือกเก่าทิ้ง กุ้งจะงอตัวและดีดตัวออก เปลือกที่คลุมลำตัวจะถูกสลัดออกทิ้งก่อนตามด้วยเปลือกที่ คลุมส่วนหัวและส่วนอก เมื่อกุ้งสลัดเปลือกเก่าทิ้งใหม่ๆอาจจะถูกกุ้งที่แข็งแรงกว่ารังแก หรือ ถ้าไม่มีกำลังหรือหลบซ่อนดีพอก็อาจจะถูกกัดกินเป็นอาหารได้ (บรรจง, 2531)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.1.8 ฤดูผสมพันธุ์

กุ้งก้ามกรามสามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้เกือบตลอดปี ในภาคกลางนั้นฤดูกาลผสมพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามจะอยู่ในช่วงฤดูฝน ตั้งแต่เดือน พฤษภาคม-ตุลาคม ส่วนทางภาคใต้ฝั่งตะวันตก กุ้งจะผสมพันธุ์ระหว่างเดือนตุลาคม-กุมภาพันธ์ โดยเฉพาะจะชุกชุมระหว่างเดือนธันวาคม-เดือนมกราคม ซึ่งจะสังเกตได้ที่บริเวณหัวกุ้งจะมีสีส้มเป็นก้อนยาวที่เรียกว่าแก้วกุ้งนั่นเอง นอกจากนี้กุ้งที่จับได้จาก แหล่งธรรมชาติในระหว่างเดือนเหล่านี้ มักจะมีไข่ติดท้อง หรือบางครั้งจะมีร่องรอยไข่ติดท้องให้เห็น อย่างชัดเจน สามารถเลือกซื้อไปเป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะฟักได้ การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามหรือการเลี้ยงกุ้งทะเลก็เช่นเดียวกัน

สามารถแบ่งการเลี้ยงกุ้งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. การเพาะพันธุ์ลูกกุ้งวัยอ่อน

2. การเลี้ยงกุ้งวัยรุ่นให้เป็นกุ้งใหญ่ที่สามารถขายได้ตามความต้องการของตลาด (ประจวบ, 2531)

2.1.9 การผสมพันธุ์

เมื่อกุ้งมีอายุประมาณ 6 เดือน จะมีความยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร ซึ่งเป็นขนาดที่พร้อมจะผสมพันธุ์ แม่กุ้งที่มีขนาดต่างกันจะมีความดกของไข่ต่างกันออกไป กุ้งที่มีความยาว 12 เซนติเมตร จะมีไข่ประมาณ 15,000 ฟอง แม่กุ้งขนาด 18-20 เซนติเมตร จะมีไข่ประมาณ 70,000-120,000 ฟอง และแม่ กุ้งขนาด 27 เซนติเมตร จะมีไข่ได้ถึง 2,000,000 ฟอง เป็นต้น หลังจากแม่กุ้งที่โตได้ขนาดผสมพันธุ์นั้น จะลอกคราบได้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง เปลือกก็จะแข็งตัวเป็นปกติและพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ กุ้งเพศผู้จะเข้าทำการผสมพันธุ์ทันที กุ้งเพศผู้จะทำการผสมพันธุ์โดยใช้ก้ามโอบจับลำตัวของกุ้งเพศเมียให้หงาย ท้องขึ้นจากนั้นจะปล่อยน้ำเชื้อออกทางบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 น้ำเชื้อจะเกาะอยู่บริเวณส่วนอกตอนล่างของกุ้งเพศเมีย หลังจากนั้นอีก 6 ชั่วโมงกุ้งเพศเมียจะปล่อยไข่ออกทางบริเวณโคนขาคู่ที่ 3 ออกมาผสมกับน้ำเชื้อและเลื่อนลงมาเกาะติดอยู่กับขนอ่อนบริเวณขาว่ายน้ำคู่ที่ 1-4 ขณะที่ฟักไข่แม่กุ้งจะคอยพัดโบกขาว่ายน้ำตลอดเวลา เพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับไข่ ใช้ที่ได้รับการผสมจะมีขนาดประมาณ 0.8 มิลลิเมตร มีสีเหลืองเข้มและค่อยๆเปลี่ยนเป็นสีเทา ภายใน 19 วัน และจะฟักออกเป็นตัว ลูกกุ้งก้ามกรามจะอาศัยเจริญเติบโตในน้ำกร่อย ถ้าเป็นน้ำจืดสนิทลูกกุ้งจะตายหมดภายใน 4-5 วัน ลูกกุ้งจะมีการพัฒนาในวัยอ่อนทั้งหมด 13 ระยะ และออกคราบ 15 ครั้ง จึงเข้าสู่ระยะวัยรุ่นซึ่งจะสามารถ อาศัยการเจริญเติบโตในน้ำจืดต่อไปได้ จากกุ้งวัยอ่อนจนถึงระยะลูกกุ้งวัยรุ่นจะใช้เวลา 25-40 วัน (ประจวบ, 2531)

2.1.10 การวางไข่และการฟักไข่

หลังจากผสมพันธุ์ได้ประมาณ 6 ชั่วโมง ไข่จากท่อนำไข่จะเคลื่อนตัวไปผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ที่ขับออกมาจากถุงน้ำเชื้อและเคลื่อนตัวมาติดกับขนอ่อน บริเวณขาว่ายน้ำตั้งแต่คู่ที่ 4 ย้อนขึ้นมาที่คู่ ที่ 3 2 และ1 ตามลำดับ ในขณะที่ไข่ไหลออกมานี้ ขาว่ายน้ำจะพัดโบกอย่างสม่ำเสมอเพื่อช่วยพัดโบกให้ไข่ผ่านไปติดตามขนเล็กๆ ได้สะดวก ทั้งยังเป็นวิธีทำความสะอาดและเพิ่มออกซิเจนให้ใช่ไปพร้อมกัน ไข่ที่ไหลออกมาใหม่ๆ จะมีสีเหลืองอมส้ม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.6-0.8 มิลลิเมตร ไข่จะมีการวิวัฒนาการตามลำดับขั้นจนกระทั่งพัฒนาขึ้นมีอวัยวะครบทุกอย่างภายในเปลือกไข่ ขณะเดียวกันสีของไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงจนกระทั่งระยะสุดท้ายจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม สามารถมองเห็นตา และรูปร่างของกุ้ง พับงอภายในเปลือกไข่ชัดเจนใช้เวลาประมาณ 17-19 วัน กุ้งจะฟักออกเป็นตัวหลุด ออกจาก

เปลือกไข่เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนห้อยหัวลงรอมตัวกับบริเวณผิวน้ำที่มีแสงสว่าง มองเห็นได้ชัดเจน (ชูศักดิ์, 2543)

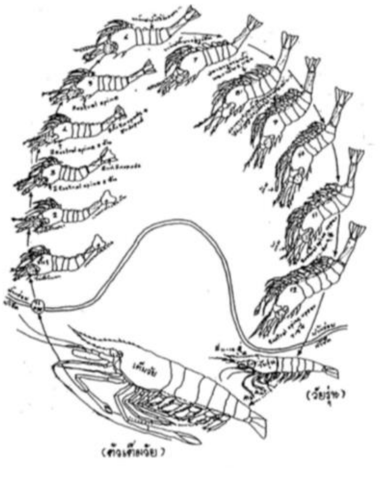
2.1.11 พัฒนาการของกุ้งก้ามกราม

ลูกกุ้งก้ามกรามตั้งแต่ฟักเป็นตัวจนโตเป็นกุ้งตัวเล็กมีพัฒนาการประมาณ 13 ขั้นตอน (ตารางที่ 1) ดัง (รูปที่ 3)

ตารางที่ 1 พัฒนาการของกุ้งก้ามกราม

ขั้นที่	ขนาด (มิลลิเมตร)	อายุ (วัน)	ลักษณะ
1	0.5-1	1-2	ไม่มีก้านตา
2	2.0 -2.30	2-4	มีก้านตา
3	2.3-2.5	3-8	ตาสามารถกรอกไปมาได้
4	2.5-3.0	7-13	ปลายหางแผ่กว้าง
5	3.0-3.50	12-17	กรีด้านบนมีฟัน 2 ซี่
6	3.5-4.0	16-21	ปลายหางแคบเรียวเข้า
7	4.0-5.0	18-24	ขาว่ายงอกเป็นปุ่ม
8	5.0-6.30	28-29	ปลายขาว่ายเป็น 2 แฉกไม่มีขน
9	6.30-6.70	24-32	แขนงนอกของขาว่ายน้ำมีขน
10	6.30-6.70	28-36	ปลายขาว่ายน้ำทั้ง 2 แขนงมีขน
11	6.60-6.80	32-40	ปลายกรีด้านบนมีฟัน 3-4 ซี่
12	6.75-6.87	35-45	กรีด้านบนมีฟันหลายซี่
13	6.8-7.45	45-55	กรีมีฟันทั้งด้านบนและด้านล่าง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHUL



รูปที่ 3 วงจรชีวิตของกุ้งก้ามกราม
(ที่มา: เกรียงศักดิ์, 2549)

2.2 โคพีพอด (Copepod)

เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ที่สำคัญในอ่าวไทย และเป็นหนึ่งในแพลงก์ตอนสัตว์ ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในระบบนิเวศน์ของน้ำ กล่าวคือ มีจำนวนชนิดและปริมาณมาก มีความหลากหลายทางสายพันธุ์สูง อีกทั้งยังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสัตว์ทะเลอีกด้วย โดยเฉพาะสัตว์ทะเลวัยอ่อนตัวอ่อนหลายชนิดมีขนาดเล็กและไม่แข็งแรงพอที่จะไล่ล่าเหยื่อ จึงต้องกินอาหารที่ลอยผ่านไปมาหาได้ง่ายและมีขนาดพอเหมาะ เช่น โคพีพอดหลายชนิดในน้ำ โคพีพอดพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำทุกภาคของประเทศไทย ทั้งน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม พบได้ทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน โคพีพอดถูกนำมาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน ๆ เช่น การประมง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเศรษฐกิจ ปลาทะเล กุ้งสวยงาม โดยมีความสำคัญเป็นอย่างมากในห่วงโซ่อาหาร เป็นอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อนทั้งลูกกุ้ง ลูกปลา หลายชนิดที่มีขนาดเล็ก นอกจากนี้ โคพีพอดยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความหลากหลายทางชีวภาพ ความอุดมสมบูรณ์ของระบบนิเวศตามธรรมชาติของแหล่งน้ำนั้น ๆ

2.2.1 ลักษณะทั่วไป (General features)

โคพีพอดมีลำตัวแบ่งเป็นปล้องและมีระยางค์ (ธิดา, 2542) ขนาดของโคพีพอดโดยทั่วไปจะมีขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร สีของโคพีพอดโดยปกติแล้วจะใสขาว แต่ก็มีบางชนิดที่อาจจะมี สีแดง, สีส้ม, สีม่วง, สีน้ำเงิน หรือสีดำก็ได้ ร่างกายของโคพีพอดที่เป็นแพลงก์ตอนมักจะมีรูป ร่างเป็นแบบทรงกระบอก ลำตัวมีปล้องยาวประมาณ 10 ปล้อง และยังแบ่งเป็นส่วนอก (Prosome) และส่วนท้อง (Urosome) ส่วนหัวมีลักษณะกลมมนตั้งอยู่ด้านหน้าของลำตัว บางทีส่วนหัวอาจจะมีกรี (Restrum) ยื่นยาวออกมา ตาของโคพีพอดจะอยู่บริเวณกึ่งกลางของส่วนหัว ในส่วนท้ายของหัวจะเชื่อมต่อติดกับปล้องลำตัวปล้องที่ 1 หรือปล้องที่ 2 ได้อย่างแนบสนิท ส่วนอกประกอบไปด้วยปล้องจำนวน 3-5 ปล้อง ซึ่งเป็นปล้องที่มีระยางค์มาเกาะติด ในบางครั้งปล้องอกทั้งสองปล้องสุดท้ายอาจจะเชื่อมติดรวมกันเป็นปล้องเดียวกันได้ ส่วนท้องของโคพีพอดจะเรียวแคบเป็นรูปทรงกระบอก ไม่มีระยางค์ในปล้องสุดท้ายของส่วนท้อง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีรูทวารมาเปิดออกนั้นจะมีขนจำนวน 2 เส้น เรียกว่า คาบ (Caudal Rami) คาบแต่ละเส้นจะมีขนเล็ก ๆ มาเกาะติดอยู่อีก 4 เส้นทำให้ดูเหมือนว่ามีขนอ่อนมาเกาะติดอยู่ทั่วไป หนวดคู่แรกของโคพีพอดจะเป็นหนวดที่ไม่แตกแขนง มีขนาดใหญ่ยาวมองเห็นได้ชัดเจน หนวดคู่ที่ 2 จะมีขนาดเล็กกว่าหนวดคู่แรกที่ฐานของหนวดจะมีระยางค์อีโซโพไดซ์ (Exopodite) ติดอยู่ ระยางค์อกคู่แรกมักจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ไปเป็นระยางค์ที่ชื่อ แมกซิลลิเพด (Maxillipeds) ซึ่งทำหน้าที่จับอาหาร ส่วนระยางค์อกคู่อื่น (ยกเว้นเพียงระยางค์อก 1-2 คู่สุดท้าย เท่านั้น) จะเป็นระยางค์อกที่มีการแตกแขนงเป็น 2 แขนง และมีลักษณะการสมดุลของรูปร่างดี ระยางค์ต่าง ๆ ของโคพีพอดนั้นต่างมีขนเส้นเล็ก ๆ ปกคลุมทั่วไป สำหรับระยางค์อก 1-2 คู่สุด ท้ายจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปมากน้อยแค่ไหนนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและเพศของโคพีพอด

2.2.2 การกินอาหาร (Nutrition)

โคพีพอดทั่วไปกินอาหารแบบกรอง ซึ่งการกรองนี้ทำได้โดยใช้ระยางค์จับอาหารคู่ที่ 2 (Second Maxillae) ซึ่งเปลี่ยนแปลงรูปร่างมาเป็นระยางค์ใช้กรองอาหารได้ อาหารหลักของ โคพีพอดที่ได้จากการกรองนี้คือ แพลงก์ตอนพืชทั่วไป จะมีโคพีพอดบางชนิดที่ไม่จำเป็นต้องมีการกินอาหารแบบกรอง เพราะโคพีพอดบางชนิดสามารถหาอาหารแบบผู้ล่าเหยื่อได้เอง เช่น โคพีพอด สกุล Anomalocera และสกุล Pareuchaeta ซึ่งจะมีอวัยวะพิเศษที่ใช้ดักจับเหยื่อซึ่งเป็นราขนาดเล็ก หรือแม้กระทั่งโคพีพอดน้ำจืดกลุ่มไซโคลพอยด์ที่เป็นแพลงก์ตอน จะสามารถกินพืชเป็นอาหาร ได้ (บัญญัติ, 2533)

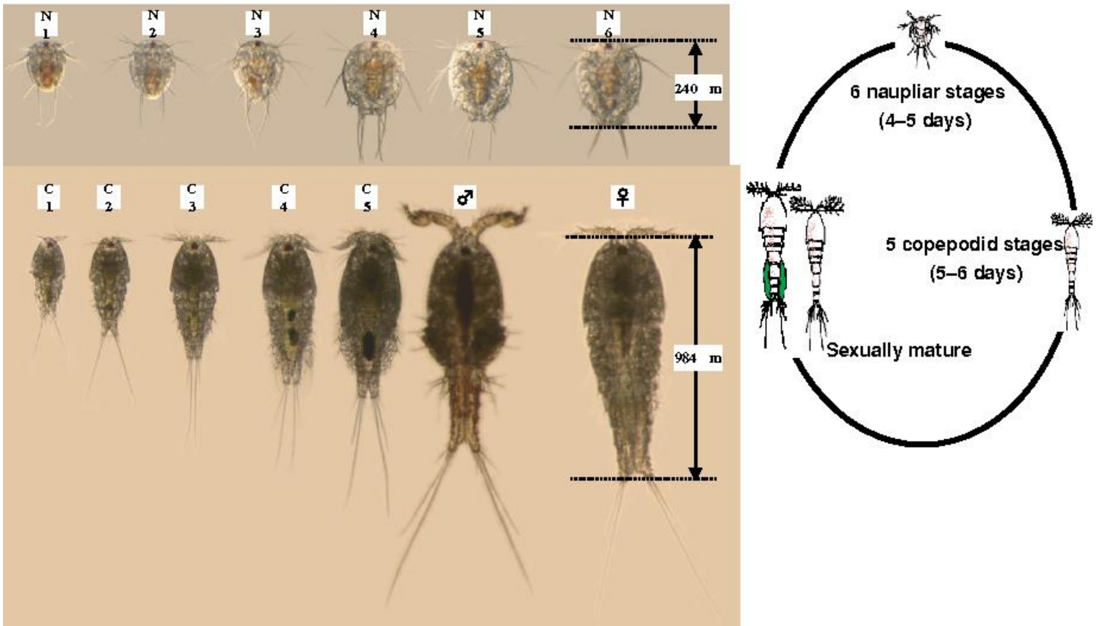
2.2.3 การสืบพันธุ์ (Reproduction)

โคพีพอดมีเพศผู้และเพศเมียแยกกันคนละตัว (Dioecious) ระบบสืบพันธุ์ของตัวเมียประกอบด้วยถุงไข่ 1-2 ถุง ท่อนำไข่ (Oviducts) 2 ท่อ แต่ละท่อสามารถเปิดออกที่ด้านท้องของปล้องท้องปล้องแรก ทั้ง 2 ช่องมีถุงเก็บสเปิร์ม (Seminal receptacle) 1 คู่ ระบบสืบพันธุ์ของตัวผู้ ประกอบด้วย Testes 1 ข้าง และท่อน้ำเชื้อ 1 ท่อ ซึ่งเปิดออกนอกตัวที่ปล้องอกปล้องที่ 1 โดยช่อง เปิดอยู่ที่ด้านข้างของช่องท้อง พวก Calanoid และ Harpacticoid มีท่อน้ำเชื้อ 1 ท่อ ส่วนพวก Cyclopoid มีท่อน้ำเชื้อ 1 คู่ (ลัดดา, 2543) ลักษณะการผสมพันธุ์ของโคพีพอดนั้นเพศผู้จะยึดติดกับเพศเมีย โดยการใช้หนวดคู่แรกจับ ยึด ซึ่งบริเวณหนวดคู่แรกนี้อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเพื่อใช้ในการจับยึดเพศเมียให้ได้ดียิ่ง ขึ้น สำหรับช่วยในการถ่ายทอดน้ำเชื้อจากเพศผู้ไปสู่เพศเมีย น้ำเชื้อจะถูกส่งไปโดยการทำหน้าที่ ของระยางค์อกในเพศผู้ น้ำเชื้อเหล่านี้จะมีชีวิตอยู่ได้โดยการอาศัยน้ำเมือกพิเศษที่ถูกสร้างขึ้นมาใน ระหว่างการผสมพันธุ์ ไข่ของโคพีพอดจะถูกเก็บไว้ระยะหนึ่งก่อนแล้วจึงจะถูกส่งออกมารับการ ผสมกับน้ำเชื้อและไข่ เมื่อได้รับการผสมแล้วก็จะถูกเก็บไว้ในร่างกายของเพศเมียระยะหนึ่งแล้วจึง ถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอก (บัญญัติ, 2533)

Chulalongkorn University

2.2.4 วงจรชีวิตของโคพีพอด

โคพีพอดเจริญเติบโตด้วยวิธีการลอกคราบ (metamorphosis) หลังการฟักตัวออกจากไข่ โดยทำการลอกคราบทั้งหมด 10 ครั้ง ก่อนเป็นตัวเต็มวัย ตัวอ่อนของโคพีพอดมี 2 ระยะ ระยะแรก เรียกว่า นอเพลียส (Nauplius larva) ตัวอ่อนระยะต่อมาเรียกว่า โคพีโพดิด (Copepodid larva) ระยะ นอเพลียส (Nauplius) มีอีก 5 ระยะ และระยะโคพีโพดิด (Copepodid) มีอีก 5 ระยะ หลังระยะ โคพีโพดิดที่ 5 จะเป็นระยะเต็มวัย (adult) บางท่านอาจแบ่งระยะโคพีโพติดออกเป็น 6 ระยะ โดย ระยะที่ 6 เป็นระยะ adult



รูปที่ 4 วงจรชีวิตของโคพีพอด
(ที่มา: Seo et al., 2006)

2.2.5 ลักษณะของตัวอ่อนโคพีพอดแต่ละระยะมีดังนี้

ระยะนอเพลียส (Nauplius stages)

<u>ระยะที่ 1</u> ลำตัวไม่แบ่งเป็นปล้อง โดยทั่วไปตัวมีรูปไข่ ค่อนข้างแบนจากบนลงล่าง ท้ายลำตัวมีขน 1 เส้น (furcal bristle) เมื่อโตขึ้นจำนวนขนจะเพิ่มขึ้น มีระยางค์ 3 คู่ คู่ที่ 1 คือหนวดคู่ที่ 1 (antennale or first antenna) และมี 3 ข้อ คู่ที่ 2 คือหนวดคู่ที่ 2 (antenna or second antenna) คู่ที่ 3 คือ กรามบน (Mandibles) ริมฝีปากบนเป็นแผ่นกลมขนาดใหญ่

<u>ระยะที่ 2</u> เริ่มมีกรามล่าง (maxillules) ลักษณะเป็นตุ่มขนาดเล็กอยู่เหนือหนวดและ กรามบน

<u>ระยะที่ 3</u> แตกต่างจากระยะนอเพลียส 2 คือ มีขนที่ปลายสุดลำตัว (furcal bristle) คู่ที่ 2 2

<u>ระยะที่ 4</u> แตกต่างจากระยะนอเพลียส 3 คือ มี furcal bristles คู่ที่ 3 ระยะนี้ กรามล่าง (maxillules) เจริญเต็มที่

<u>ระยะที่ 5</u> มีระยางค์เกิดขึ้นอีก 4 คู่ คือกรามล่าง คู่ที่ 2 กราม (maxillipeds) 1 คู่ ขาว่ายน้ำ 2 คู่ แต่ยังมี ขนาดเล็ก

ระยะโคพีโพคิด (Copepodid stages)

ระยะนี้แตกต่างจากระยะนอเพลียส คือ ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง

<u>ระยะที่ 1</u> ลำตัวมี 5 ปล้อง antennules มีมากกว่า 3 ข้อ ระยางค์รอบปากเจริญขึ้นจนเกือบเท่าระยะ adult มีขาว่ายน้ำ 3 คู่ ขา 2 คู่แรกเป็นแบบ biramnous ส่วนขาคู่ที่ 3 ยังมีขนาดเล็กอยู่

<u>ระยะที่ 2</u> ลำตัวมี 6 ปล้อง antennules มีข้อ 6-7 ข้อ (ส่วนน้อยมี 5 ข้อ) antennae และระยางค์รอบ ปากยังมีลักษณะคล้ายระยะที่ 1 ตาริมฝีปากแยกออกเห็นได้ชัด มีขาว่ายน้ำ 4 คู่ ขา 3 คู่แรก เจริญดี ส่วนขาคู่ที่ 4 ยังมีขนาดเล็กอยู่

<u>ระยะที่ 3</u> ลำตัวมี 7 ปล้อง ขาว่ายน้ำ 4 คู่เจริญดี ขาคู่ที่ 5 ยังมีขนาดเล็กอยู่ ระยางค์รอบปากเจริญเต็มที่ ระยะที่ 3 นี้เพศเมียเริ่มมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้

<u>ระยะที่ 4</u> ลำตัวมี 8 ปล้องข้อแตกต่างเรื่องขนาดเริ่มเห็นชัดมากขึ้นในระยะนี้ หนวดทั้ง 2 คู่ มีข้อเพิ่ม ขึ้น exopodite และ endopodite ของขาว่ายน้ำทุกคู่มี 2 ข้อ

<u>ระยะที่ 5</u> ลำตัวมี 9 ปล้อง ความแตกต่างของ 2 เพศเริ่มปรากฏ โดยบางปล้องของหนวดคู่ที่ 1 เริ่ม หนาและใหญ่ขึ้น บางชนิดจำนวนปล้องของตัวผู้เพิ่มมากขึ้นกว่าตัวเมียและบางปล้องใหญ่ขึ้นด้วย โคพีพอดทั้ง 2 เพศ บางชนิดมีจำนวนปล้องเท่ากัน ในพวก calanoid หนวดข้างขวาของตัวผู้จะพัฒนารูปร่างเพียงข้างเดียว ส่วนพวก cyclopoid และ พวก harpacticoid มี antennae ที่เปลี่ยนรูปร่างไปทั้ง 2 ข้าง ระยะนี้ขาว่ายน้ำมี exopodite และ endopodite 2 ข้อ บางชนิดอาจมี 3 ข้อ ขาว่ายน้ำคู่ที่ 5 เกิดขึ้น ระยะนี้ตัวอ่อนจะลอกคราบและมีอวัยวะเพศเกิด ขึ้น ซึ่งเป็นระยะที่เจริญวัยเต็มที่ (adult) (ลัดดา, 2543)

2.2.6 วิธีการเพาะขยายพันธุ์โคพีพอด

สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ.สงขลาได้ทำการทดลองเลี้ยงโคพีพอดด้วยอาหาร 4 ชนิด และพบว่ารำเป็นอาหารที่เหมาะสมที่สุด เพราะให้ผลผลิตของโคพีพอดดี การเลี้ยงควรเริ่มเลี้ยงในถังขนาดเล็กก่อนเมื่อชำนาญดีแล้วค่อยขยายปริมาณการเลี้ยงให้เพิ่ม ขึ้น โดยเริ่มเลี้ยงในถังพลาสติกความจุ 30 ลิตร จำนวนตามต้องการ ใส่น้ำทะเลที่พักและกรองแล้วถัง ละ 25 ลิตร ใส่พันธุ์โคพีพอดลงในถังเลี้ยงและให้อากาศ ให้อาหารโดยใช้รำข้าวถังละ 0.3 กรัม ทุกวัน โคพีพอดจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิน้ำประมาณ 24-27 องศาเซลเซียส ตัวอ่อนระยะ นอเพลียสจะโตเต็มวัยผสมพันธุ์ได้ในเวลา 8-10 วัน ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะฟักเป็นตัวในเวลา 3- 4 วัน ตัวเมียจะมีไข่ปริมาณ 10-48 ฟองต่อครั้ง โดยที่ตัวเมียแต่ละตัวสามารถผลิตไข่ได้ 6-9 ครั้ง ช่วง การให้ไข่แต่ละครั้งห่างกัน 2-4 วัน ด้วยวิธีนี้สามารถเลี้ยงโคพีพอดได้นานประมาณ 24 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำในถังเลี้ยง แต่เมื่อเลี้ยงได้นานประมาณ 2 สัปดาห์ ควรเติมน้ำจืดลงในถังเลี้ยงประมาณวันละ 2 ลิตร เพื่อมิให้ ความเค็มของน้ำสูงเกินไป (ธิดา, 2542)

2.2.7 สายพันธุ์ของโคพีพอด

จำแนกโคพีพอดออกได้เป็น 10 อันดับ (Order) ทั้งนี้มีเพียง 3 กลุ่มที่ดำรงชีวิตเป็นอิสระและนิยมนำมาเพาะเลี้ยงหรือมีความพยายามเพาะเลี้ยงเพื่อนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อน

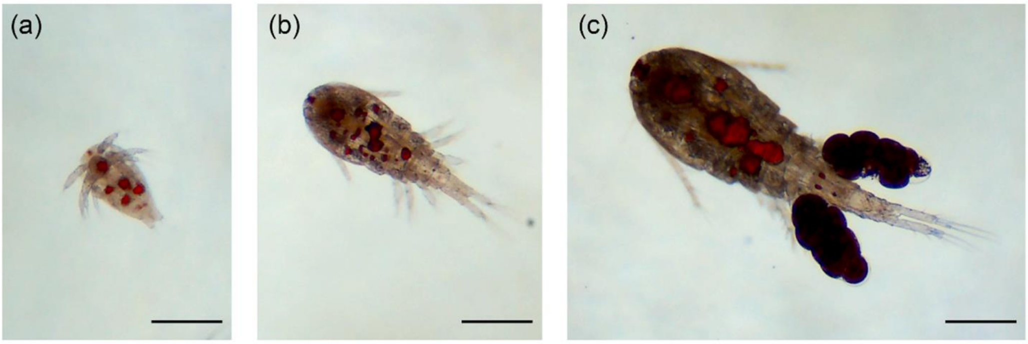
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สามารถจำแนกโคพีพอดทั้ง 3 กลุ่มนี้ออกจากกันได้อย่างง่ายๆ จากการสังเกตความยาวของหนวด และรูปร่าง คือ

1. Calanoid copepods (คาลานอยด์ โคพีพอด) มีหนวดคู่ที่หนึ่งยาวเกินครึ่งหนึ่งของลำตัว ส่วนมากมีลำตัวเป็นรูปทรงรีและยาว
2. Cyclopoid copepods (ไซโคลพอยด์ โคพีพอด) มีหนวดคู่ที่หนึ่ง สั้นกว่าส่วนหัวและอกรวมกัน และส่วนมากมีรูปร่างของลำตัวเป็นทรงรีแต่กว้างและสั้นกว่า Calanoid copepods
3. Harpacticoid copepods (ฮาร์แพคทิคอยด์ โคพีพอด) มีหนวดคู่ที่หนึ่งสั้นมาก

2.2.8 อนุกรมวิธานของโคพีพอดสายพันธุ์ *(Apocyclops royi)*

โคพีพอดสปีชีส์ *Apocyclops royi* เป็นแพลงก์ตอนที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำลำตัวค่อนข้างใส มีรูปร่างทรงกระบอก รูปไข่หรือรูปกระบอง ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง และมีรยางค์ ลำตัวจะประกอบด้วยปล้อง จำนวน 16-17 ปล้อง โคพีพอดมีรยางค์ทั้งหมด 11 คู่ โคพีพอดจะมีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ (Metamorphosis) เพื่อพัฒนาขนาดและรูปร่าง ภายหลังจากที่ฟักออกจากไข่จะมีการลอกคราบประมาณ 10 ครั้ง ใช้ระยะพัฒนาตั้งแต่ระยะนอเพลียส (ตัวอ่อน) ถึงตัวเต็มวัย 15-16 วัน โดยตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 600 ไมโครเมตร (รูปที่ 5) (วิไลลักษณ์, 2565)



รูปที่ 5 สัณฐานวิทยาของนอเพลียส โคพีโพดิด และระยะตัวเต็มวัยของโคพีพอดสายพันธุ์ *Apocyclops royi* ตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์แสดงสัณฐานวิทยาของนอเพลียส (a), โคพีโพดิด (b) และระยะตัวเต็มวัย (c) ของโคพีพอดสายพันธุ์ *Apocyclops royi ที่*ย้อมด้วยสี Oil Red สเกลบาร์แสดงขนาด 200 µm (ที่มา: Amparyup et al., 2022b)

ทั้งนี้ สามารถจัดลำดับหมวดหมู่ (classification) ทางอนุกรมวิธานโคพีพอด *Apocyclops royi* โดยละเอียดได้ดังนี้

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Copepoda
Order	Cyclopoids
Family	Cyclopidae
Genus	Apocyclops
Species	royi

2.3 อาร์ทีเมีย (Artrmia)

อาร์ทีเมีย หรือ ไรทะเล ไรน้ำเค็ม ไรน้ำสีน้ำตาล (Brine shrimp, Sea-monkey) เป็นสัตว์น้ำจำพวกครัสเตเชียนสกุลหนึ่ง ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการประมงและเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ไรทะเลเป็นครัสเตเชียน ในสกุล *Artemia* ถือกำเนิดในบริเวณเมดิเตอร์เรเนียนมานานกว่า 5.5 ล้านปีมาแล้ว อาร์ทีเมียจัดว่าเป็นอาหารธรรมชาติที่สำคัญที่สุดต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำ โดยเฉพาะมีคุณสมบัติที่พิเศษกว่าอาหารธรรมชาติชนิดอื่นๆ คือ ตัวอ่อนมี ขนาดเล็กมีความยาวประมาณ 0.4 – 0.5 มิลลิเมตร เหมาะสำหรับใช้อนุบาลลูกสัตว์น้ำแทบทุกชนิด เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยจะค่อนข้างมีขนาดใหญ่มีความยาวประมาณ 0.8 – 1.2 เซนติเมตร เหมาะที่จะใช้เป็นอาหารเลี้ยงปลาสวยงาม นอกจากนั้นไรที่สมบูรณ์เพศแล้วยังสามารถแพร่ขยายพันธุ์ทั้งในแบบออกลูกเป็น ตัว คือให้ตัวอ่อนออกมาเลย หรือแพร่พันธุ์แบบออกลูกเป็นไข่ โดยไข่ที่ปล่อยออกมาจะมีตัวอ่อนอยู่ภายใน ฟองละ 1 ตัว เป็นไข่ที่สามารถนำมาเก็บรักษาไว้ได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อใดที่ต้องการตัวอ่อนจึงนำมาดำเนินการฟัก ก็จะได้ตัวอ่อนตามต้องการและมีความแน่นอน ที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ อาร์ทีเมียยังสามารถดำรงชีวิตอยู่ในความเค็ม ระดับต่างๆที่กว้างมาก มีการเจริญเติบโตรวดเร็วและไม่ค่อยมีปัญหาเรื่องโรค ทำให้ดำเนินการเพาะเลี้ยงได้ง่าย ปัจจุบันได้มีการเลี้ยงอาร์ทีเมียในนาเกลือตามจังหวัดแถบชายทะเล ซึ่งส่วนใหญ่จะเลี้ยงเพื่อการรวบรวมอาร์ทีเมียตัวเต็มวัย สำหรับจำหน่ายในสภาพสดเพื่อนำไปเป็นอาหารสัตว์น้ำต่างๆ โดยเฉพาะอาหารของปลาสวยงาม สายพันธุ์ของอาร์ทีเมีย แบ่งออกได้เป็น 10 ชนิด ได้แก่

1. *Artemia franciscana* Kellogg, 1906
2. *Artemia gracilis* Verrill, 1869
3. *Artemia monica* Verrill, 1869

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. *Artemia parthenogenetica* Bowen and Sterling, 1978
5. *Artemia persimilis* Piccinelli & Prosdocimi, 1968
6. *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)
7. *Artemia sinica* Cai, 1989
8. *Artemia tibetiana* Abatzopoulos, Bo Zhang, and Patrick Sorgeloos, 1998
9. *Artemia tunisiana* Bowen and Sterling, 1978
10. *Artemia urmiana* Gunther, 1900

3.1 อนุกรมวิธานของอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*)

Phylum	Arthropoda
Class	Crustacea
Subclass	Branchiopoda
Order	Anostraca
Family	Artemiidae
Genus	Artemia
Species	salina

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALON

รูปที่ 6 แสดงลักษณะภายนอกของอาร์ทีเมีย
(Artemia salina) (ที่มา : http://en.wikipedia.org/wiki/Artemia_salina)

2.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมียมีลำตัวแบนเรียวยาวคล้ายใบไม้ ลักษณะเป็นสัตว์สีน้ำตาลแดงหรือสีน้ำตาลส้ม ลำตัวใสแกมชมพู ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มลำตัว (Shelless) แต่มีเนื้อเยื่อบางๆหุ้มไว้ ว่ายน้ำเคลื่อนที่ในลักษณะหงายท้อง ลำตัวแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

- ส่วนหัว (Head) แบ่งออกได้เป็น 6 ปล้อง มีตาเดี่ยวและตารวมที่มีก้านตา 1 คู่ และหนวด 2 คู่
- ส่วนอก (Thorax) แบ่งออกเป็น 11 ปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ปล้องละ 1 คู่ ทำหน้าที่ทั้งในการว่ายน้ำ หายใจ และช่วยกรองอาหารเข้าปาก
- ส่วนท้อง (Abdomen) แบ่งออกเป็น 8 ปล้อง ปล้องแรกเป็นที่ตั้งของอวัยวะเพศ ปล้องที่ 2 – 7 ไม่มีระยางค์ และปล้องที่ 8 มีแพนหาง 1 คู่

2.3.3 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย

ความแตกต่างระหว่างเพศ โดยปกติเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย และหนวดคู่ที่ 2 ของเพศผู้จะมีขนาดใหญ่คล้ายตะขอใช้เกาะเพศเมีย ทำให้ดูว่ามีส่วนหัวขนาดใหญ่ และเพศเมียจะมีถุงไข่ที่ปล้องแรกของส่วนท้อง รูปที่ 7

รูปที่ 7 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย
อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) เพศเมีย (ซ้าย) เพศผู้ (ขวา)
(ที่มา : http://www.americanaquariumproducts.com)

2.3.4 ถิ่นกำเนิดของอาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมีย มีถิ่นกำเนิดในทะเลสาบน้ำเค็ม ในสหรัฐอเมริกา, ยุโรป และจีน ไม่พบในประเทศไทย

2.3.5 การเพาะขยายพันธุ์อาร์ทีเมีย

ปัจจุบัน อาร์ทีเมียสามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ เป็นอาหารหลักของสัตว์น้ำขนาดเล็ก ทั้งสัตว์น้ำเศรษฐกิจและสัตว์น้ำสวยงาม เนื่องจากมีคุณค่าทางอาหาร โดยเฉพาะโปรตีนสูง อีกทั้งไข่ของอาร์ทีเมียสามารถอบแห้ง เก็บไว้ในกระป๋องได้เป็นระยะเวลานาน เมื่อนำออกมาฟัก ก็สามารถทำได้ง่าย

2.3.6 ลักษณะเพศของอาร์ทีเมีย

โดยปกติเมื่อโตเต็มวัย เพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย และจะมีหนวดคู่ที่ 2 ขนาดใหญ่กว่ารูปร่างคล้ายตะขอใช้เกาะจับเพศเมีย บริเวณปล้องแรกของส่วนท้องของเพศผู้จะมีอวัยวะเพศผู้อยู่ 1 คู่ ในเพศเมียตัวเต็มวัย หนวดคู่ที่ 2 จะมีขนาดเล็กลง และเปลี่ยนมาทำหน้าที่รับความรู้สึก บริเวณปล้องแรกของส่วนท้องจะมีอวัยวะเพศเมียทำหน้าที่เก็บตัวอ่อนหรือเก็บไข่

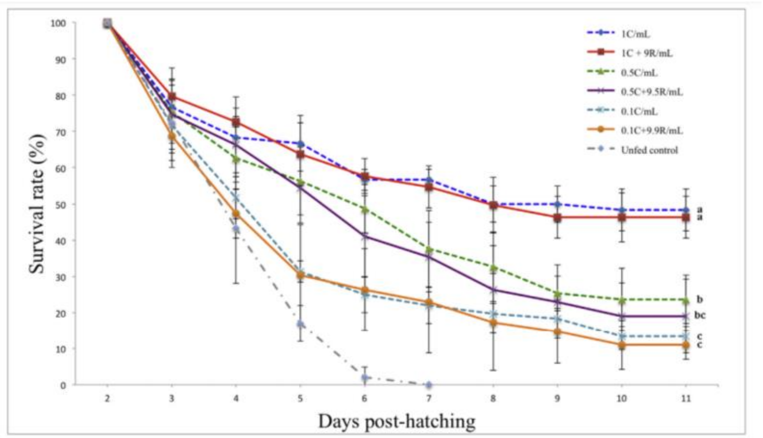
2.3.7 การวางไข่และการฟักไข่ของอาร์ทีเมีย

อาร์ทีเมีย สืบพันธุ์ได้ทั้งอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ให้ลูกทั้งแบบเป็นตัว โดยจะมีไข่ฟักเป็นตัวภายในมดลูก ไข่ไม่มีเปลือกหนาแข็งหุ้ม สามารถวางไข่ได้ครั้งละ 300-500 ฟอง ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์, ความสมบูรณ์ของไรทะเล หรืออุณหภูมิของสภาพแวดล้อมที่อาศัย ใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง ในการฟักเป็นตัว

2.4 คุณค่าทางโภชนาการของ โคพีพอด และอาร์ทีเมีย

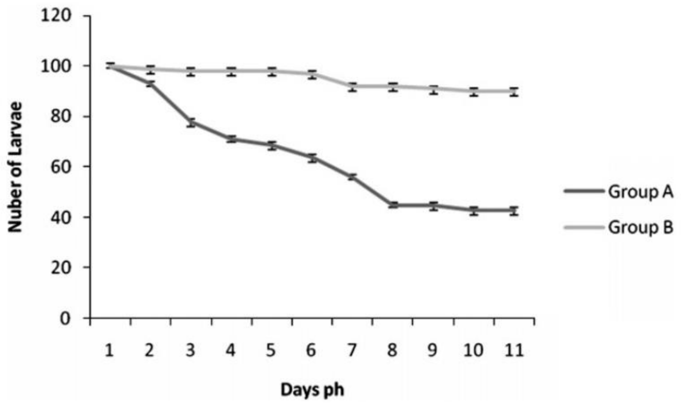
มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาอัตรารอด และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนปลาแมนดาริน (*Synchiropus splendidus*) ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *Parvocalanus crassirostris* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยโคพีพอดร่วมกับโรติเฟอร์ ผลการวิจัยพบว่าลูกปลาที่ไม่ได้รับอาหารไม่เหลือรอดในวันที่ 7 ของการทดลอง ในขณะที่ลูกปลาที่ได้รับอาหารทั้งการให้โคพีพอดเพียงอย่างเดียว หรือการให้โคพีพอดร่วมกับโรติเฟอร์เป็นอาหาร พบว่าลูกปลาให้อัตรารอดชีวิตยาวนานกว่า 11 วัน โดยเฉพาะลูกปลาที่ได้รับโคพีพอดดเพียงอย่างเดียว เป็นอาหาร โดยโคพีพอด 1 ตัวต่อน้ำ 1 มิลลิตร ให้อัตรารอดของลูกปลามากที่สุด เพิ่มขึ้น 50% ในขณะที่อัตราการเจริญเติบโตไม่พบความแตกต่างที่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) และจากผลแสดงให้เห็นถึงความนิยมของลูกปลาที่นิยมกินโคพีพอดเดี่ยวๆมากกว่า โคพีพอดร่วมกับโรติเฟอร์ โดยลูกปลามีการปฏิเสธการกินโรติเฟอร์สูงถึง 60% ดังนั้น การให้โรติเฟอร์ร่วมกันกับโคพีพอดจึงไม่ก่อให้เกิดประโยชน์ที่ชัดเจน ซึ่งบ่งชี้ว่าการให้โรติเฟอร์ร่วมกันนั้นไม่จำเป็นสำหรับการเลี้ยงตัวอ่อนของปลาในระยะแรก (Shao et al., 2020) รูปที่ 8

CHULALONGKORN UNIVERSITY

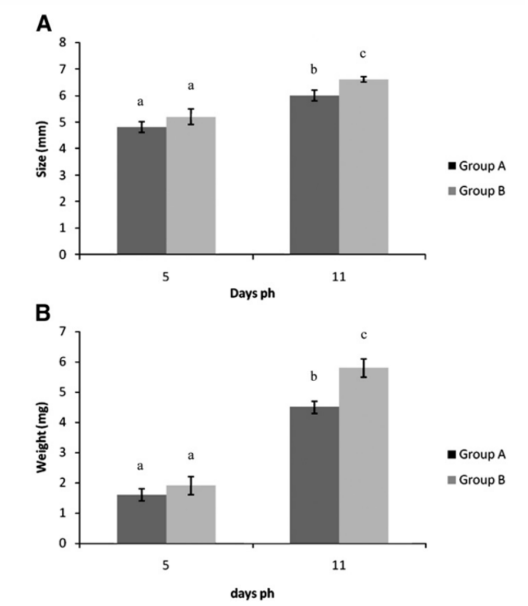


รูปที่ 8 เปอร์เซ็นต์อัตรารอดในแต่ละวันของตัวอ่อนปลาแมนดาริน *S. splendidus* ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน ‘C’ แทนโคพีพอด *Parvocalanus crassirostris* และ ‘R’ โรติเฟอร์ *Brachionus rotundiformis* ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .05$) (ที่มา: Shao et al., 2020)

นอกจากนี้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้โคพีพอดเพื่อเลี้ยงลูกปลาการ์ตูนลายปล้อง *Amphiprion clarkia* วัยอ่อน พบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 11 ลูกปลาที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *Centropages typicus* ให้อัตรารอด 90±2 % และการเจริญเติบโตความยาวรวม 6.6±0.2 มิลลิเมตร และน้ำหนักตัว 5.8±0.3 มิลลิกรัม ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์รวมกับอาร์ทีเมีย ที่ให้อัตรารอด 43±2% และการเจริญเติบโตความยาวรวม 6.0±0.2 มิลลิเมตร และน้ำหนักตัว 4.5±0.3 มิลลิกรัม (Olivotto et al., 2008b) รูปที่ 9 และรูปที่ 10



รูปที่ 9 เปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของปลาการ์ตูนลายปล้อง *A. clarkii* วัยอ่อน ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน กลุ่ม A: (กลุ่มควบคุม) เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ตามด้วยอาร์ทีเมีย ระยะนอเพลียสจนถึงสิ้นสุดการทดลอง วันที่ 11 และกลุ่ม B: เลี้ยงด้วยโคพีพอด *C. typicus* ระยะนอเพลียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ตามด้วย โคพีพอด *C. typicus* ระยะโคพีโพดิด ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง



รูปที่ 10 ความยาวและน้ำหนักของปลาการ์ตูนลายปล้อง *clarkii* วัยอ่อน (A, B) *ที่*สุ่มตัวอย่างในวันที่ 5 และ 11 ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่แตกต่างกัน กลุ่ม A: (กลุ่มควบคุม) เลี้ยงด้วยโรติเฟอร์ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ตามด้วยอาร์ทีเมีย ระยะนอเพลียส จนถึงสิ้นสุดการทดลอง วันที่ 11 และกลุ่ม B: เลี้ยงด้วยโคพีพอด *C. typicus* ระยะนอเพลียส ตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 ตามด้วย โคพีพอด *C. typicus* ระยะโคพีโพดิด ตั้งแต่วันที่ 7 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

สืบเนื่องจากโคพีพอดระยะตัวอ่อนมีขนาดเหมาะสมต่อการกินของสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีขนาดความกว้างของช่องปากค่อนข้างเล็ก และสามารถย่อยได้ง่ายในระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำวัยอ่อน ทั้งนี้โคพีพอดยังมีความโดดเด่นในด้านการมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน ในปริมาณสูง และยังมีโปรตีน รงควัตถุ วิตามิน และสารอาหารอื่น ๆ ที่สำคัญทางโภชนาการ ซึ่งมีความเหมาะสมและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อน จึงตอบสนองความต้องการทางโภชนาการของสัตว์น้ำตัวอ่อน (Rasdi et al., 2016)

ทั้งนี้ มีงานวิจัยที่พบว่าโคพีพอด *A. royi* ระยะนอเพลียส โคพีโพดิด และตัวเต็มวัย สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ได้ผ่านทางวิถีโมเลกุลของการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA (Amparyup et al., 2022b) แสดงให้เห็นว่าโคพีพอด *A. royi* มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีศักยภาพในการใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกเพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำ ตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์กรดไขมันทั้งหมดของโคพีพอด โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย (ที่มา: Pitchaya et al., 2016)

กรดไขมัน	% กรดไขมันทั้งหมด		
	โคพีพอด	โรติเฟอร์	อาร์ทีเมีย
n-3 HUFA	39.3-40.5	10.0-12.6	46.1-47.2
DHA	28.6-30.3	0.00-1.14	0
EPA	7.3-7.6	0.15-1.83	3.9-4.3
ARA	4.7-11.7	0.07-0.67	0.28-0.30

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งของโปรตีนทั้งหมดในโคพีพอด โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมีย (ที่มา: Pitchaya et al., 2016)

โปรตีน	โคพีพอด	โรติเฟอร์	อาร์ทีเมีย
โปรตีน (% น้ำหนักแห้ง)	63.12	61.48	60.19

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.5 ยีน Myostatin (MSTN)

เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบยับยั้งการสร้างกล้ามเนื้อในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Patel and Amthor, 2005) สำหรับในครัสเตเชียนพบว่าการลดระดับการแสดงออกของยีน Myostatin ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง *Litopenaeus vannamei* (Qian et al., 2013) *Fenneropenaeus chinensis* (Yan et al., 2020) และ *M. rosenbergii* (Easwvaran et al., 2019) แสดงให้เห็นว่า Myostatin ในครัสเตเชียนมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีรายงานการศึกษาวิจัยในปลาการ์ตูนลายปล้อง *Amphiprion clarkii* ซึ่งพบว่าการอนุบาลลูกปลา ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน Myostatin (Olivotto et al., 2008b) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีน Myostatin มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน MSTN

2.6 ยีน heat shock protein 70 (HSP70)

จัดเป็นหนึ่งในกลุ่มของยีน Heat shock proteins (hsp) ที่ใช้สร้างโปรตีนความเครียด (Stress protein) ที่จำเป็นต่อการตอบสนองต่อความเครียดระดับเซลล์ พบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Basu et al., 2002) หน้าที่หลักเป็นการรักษาสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำงานเป็นปกติ ช่วยในการย่อยโปรตีนที่เสื่อมสภาพ และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปยังส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fairfield, 2004) ความเครียดจากสิ่งแวดล้อม เคมี หรือสรีรวิทยา จะมีการตอบสนองต่อความเครียด โดยทำให้เซลล์สังเคราะห์ HSP70 ได้มากขึ้น ซึ่งการศึกษา HSP70 ในสัตว์น้ำ เป็นการศึกษาโปรตีน ลำดับเบส และระดับความเครียดที่สัมพันธ์กับ mRNA (Basu et al., 2002) มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน HSP70 ในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (LvHSP70) จากการศึกษาพบว่า HSP70 มีส่วนเกี่ยวข้องในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดต่อการติดเชื้อไวรัสโรคจุดขาว (WSSV) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *Litopenaeus vannamei* heat shock protein 70 (*Lv*HSP70) สามารถกระตุ้นให้กุ้งสร้างภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย

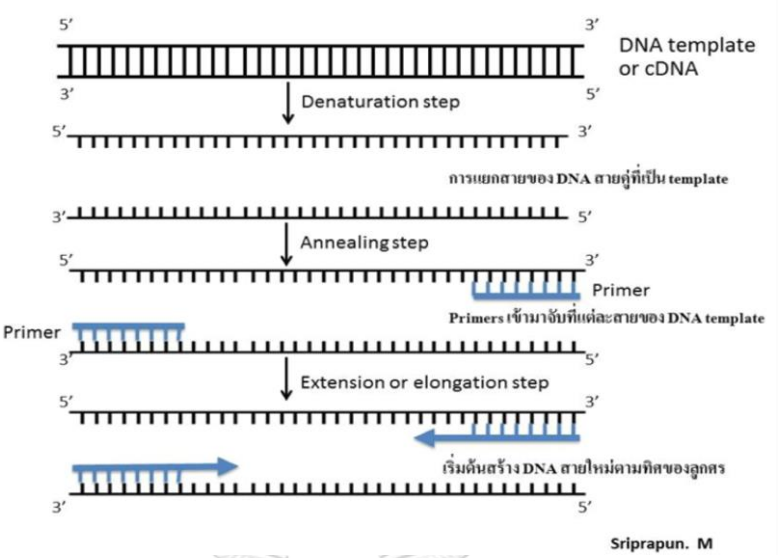
2.7 ยีน lipopolysaccharide and β-1, 3-glucan binding protein (LGBP)

เป็นโปรตีนที่มีอยู่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลากหลายชนิด รวมทั้งกุ้ง มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียน ซึ่งทำหน้าที่จดจำ และสร้างภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดผ่านการเป็นสื่อกลางในการจดจำเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามา เป็นการป้องกันภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อโรคที่บุกรุก ทั้งนี้ มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาคุณสมบัติและ บทบาททางชีวภาพของโปรตีน LGBP ที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* (*Lv*HSP70) จากการศึกษาพบว่าโปรตีน LGBP สามารถกระตุ้นการเกาะกันของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในกุ้ง *V. harveyi* ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีน LGBP อาจจับกับส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบโดยเฉพาะ มีบทบาท มีความเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรคในกุ้ง ผลลัพธ์เหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีน LGBP อาจเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค (Bao Ubon al., 2002)

2.8 เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

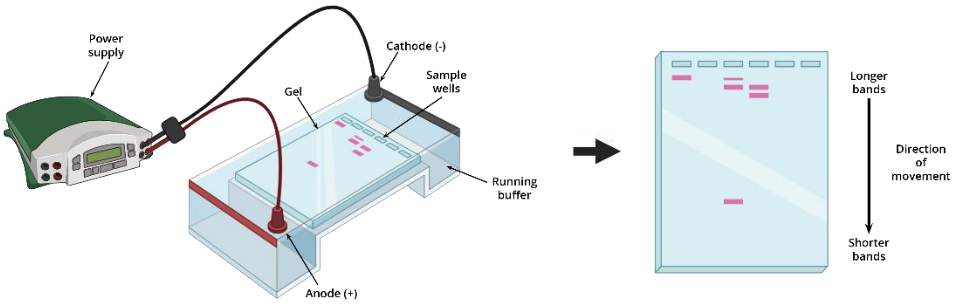
Chulalongkorn University

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ DNA หรือยีนที่สนใจในหลอดทดลอง โดยมีการทำปฏิกิริยาอย่างต่อเนื่องเป็นลูกโซ่ เพื่อให้ได้ DNA สายใหม่เพิ่มขึ้นในระยะเวลารวดเร็ว โดยใช้เอนไซม์พอลิเมอเรสที่มีคุณสมบัติทนความร้อน (thermostable DNA polymerase) Reverse transcription PCR (RT-PCR) เป็นเทคนิคที่พัฒนามาจาก PCR แบบเดิม (Conventional PCR) โดยใช้ RNA เป็นแม่แบบ แล้วจึงสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) โดยปฏิกิริยา Reverse transcription โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase แล้วใช้ cDNA ที่ได้เป็นแม่แบบในปฏิกิริยา PCR รูปที่ 11



รูปที่ 11 ขั้นตอนของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) (ที่มา: https://www.anhsci.com/omics)

2.9 เทคนิค Gel electrophoresis



รูปที่ 12 เทคนิค Gel electrophoresis (ที่มา: https://www.anhsci.com/omics)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกส่วนผสมของ DNA RNA และโปรตีนเพื่อทำให้บริสุทธิ์ โมเลกุลถูกถูกผลักโดยสนามไฟฟ้าผ่านเจลที่มีรูพรุนขนาดเล็ก สารผสมที่มีขนาดต่างกันเคลื่อนผ่านรูพรุนด้วยความเร็วต่างกัน เพื่อแยกของผสมออกจากกัน จะทำการติดตั้งขั้วไฟฟ้าไว้ที่อุปกรณ์โดยที่ปลายด้านหนึ่งของเจลมีประจุบวกและอีกด้านหนึ่งมีประจุลบ เนื่องจาก DNA และ RNA มีประจุเป็นลบ มันจึงเคลื่อนที่เข้าหาประจุบวก รูปที่ 12

2.10 ชีวนิเวศจุลชีพ (Microbiome)

ไมโครไบโอม คือ สารพันธุกรรมของไมโครไบโอต้า ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าสนใจสำหรับการวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการเพาะเลี้ยงกุ้ง สัตว์น้ำมีความสัมพันธ์กับไมโครไบโอม ที่มีทั้งภายนอกร่างกายของสัตว์น้ำนั้นคือสิ่งแวดล้อม และไมโครไบโอมที่อยู่ภายในร่างกายสัตว์น้ำหากสัตว์น้ำมีการกินอาหารที่ดีและอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ดีก็จะช่วยเพิ่มจุลินทรีย์ดีในร่างกายของสัตว์น้ำ นำไปสู่การมีไมโครไบโอมที่ดีทำให้สัตว์น้ำแข็งแรงไม่เจ็บป่วยไม่เป็นโรค สัตว์น้ำได้รับจุลชีพเหล่านี้มาจาก

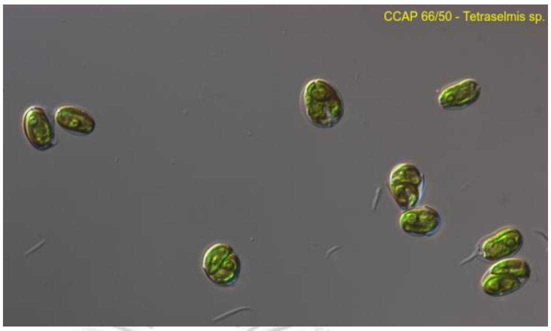
สิ่งแวดล้อม จากการบริโภคแพลงก์พืชและแพลงก์ตอนสัตว์ รวมทั้งอาหารที่สัตว์น้ำรับประทาน โดยหน้าที่ของไมโครไบโอมในระบบทางเดินอาหาร คือ ช่วยสัตว์น้ำในด้านของสุขภาพ ไมโครไบโอมในทางเดินอาหารของสัตว์น้ำยังทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างฮอร์โมน และยังสนับสนุนระบบภูมิคุ้มกันและปกป้องสัตว์น้ำจากโรคต่างๆ ทั้งนี้ สัตว์น้ำมีไมโครไบโอมในระบบทางเดินอาหารแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์น้ำรับประทาน สภาพแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัย (Holt al., 2021)

มีงานวิจัยที่ได้ทำการทบทวนการเพาะเลี้ยงกุ้งและปัจจัยที่มีผลต่อไมโครไบโอมในลำไส้ของกุ้ง พบว่า ระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทะเลมีจุลินทรีย์ที่อยู่ร่วมกัน จุลินทรีย์ในลำไส้แสดงบทบาทที่สำคัญในการปรับปรุงการตอบสนองทางสรีรวิทยาและภูมิคุ้มกันของเจ้าบ้าน (Host) ในขณะเดียวกันก็ส่งเสริมโภชนาการที่ดี อีกทั้งยังสามารถสังเคราะห์วิตามินสำหรับเจ้าบ้าน (Host) และควบคุมกระบวนการเมแทบอลิซึม (Cornejo-Granados et al. 2017) ทั้งนี้ยังมีการรายงานว่าอาหาร ความเครียด การหลั่งของฮอร์โมน การใช้ยาปฏิชีวนะ โปรไบโอติก พรีไบโอติก ปัจจัยสภาพอากาศ ระยะของการพัฒนา เมแทบอลิซึม และสภาวะทางสรีรวิทยา เป็นตัวกำหนดจุลินทรีย์ที่จะพบในร่างกายสัตว์น้ำ (Cornejo-Granados et al. 2017) กุ้งหลายสายพันธุ์ *Fenneropenaeus chinensis*, *Penaeus monodon*, *Penaeus penicillatus*, *Penaeus merguiensis* และ *Litopenaeus vannamei* ได้มีการศึกษาเพื่อหาว่าปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อไมโครไบโอมของลำไส้อย่างไร ระหว่างโรคกับอาหาร การเติบโตที่ไม่ดี และการใช้ยาปฏิชีวนะมากเกินไปซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตกุ้งลดลงในทศวรรษที่ผ่านมา (Li et al. 2018) อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ของกุ้งที่ได้รับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงระบุแบคทีเรียที่แยกได้ แบคทีเรียในลำไส้ของ *Litopenaeus vannamei* ส่วนใหญ่มาจาก ไฟลัม Proteobacteria, Bacteroidetes และ Actinobacteria ทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ Firmicutes มีสัดส่วนที่น้อยกว่า (Huang et al. 2016) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาองค์ประกอบ ความหลากหลาย และหน้าที่ของจุลินทรีย์ในลำไส้ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งพบแบคทีเรียที่สำคัญในลำไส้ของกุ้งขาว ได้แก่ ไฟลัม Proteobacteria (63.5%), Firmicutes (4.1%), Bacteroidetes (3.6%) , Planctomycetes (2.9%) และ Actinobacteria (0.8%) (Zeng et al., 2017) แบคทีเรียดังกล่าวในลำไส้อุดมไปด้วยศักยภาพในการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ transporters, ABC transporters, DNA repair, recombination proteins, secretion system, bacterial motility proteins และ purine metabolism การค้นพบนี้ให้หลักฐานใหม่เกี่ยวกับจุลชีพของแบคทีเรียในลำไส้กุ้ง นอกจากนี้ ยังพบไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes ในกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon) และกุ้งแชบ๊วย (Penaeus merguiensis) (Oxley et al., 2002; Rungrassamee et al., 2014)

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 สาหร่าย *Tetraselmis* sp.

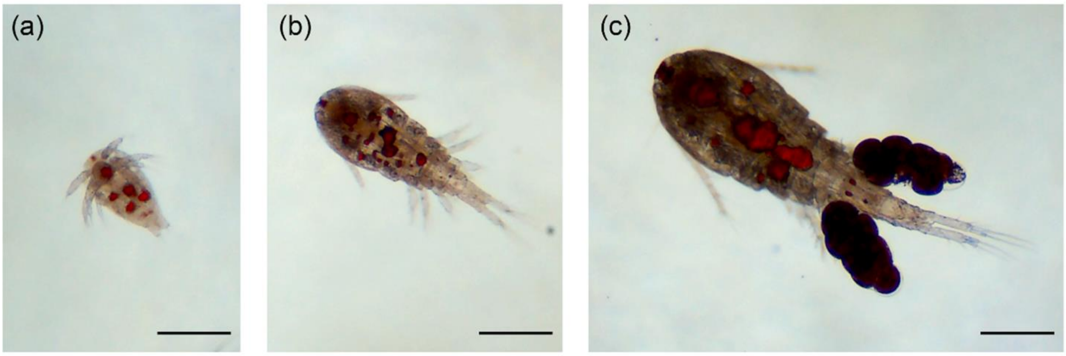


รูปที่ 11 สาหร่ายเตตร้าราเซลมิส

Tetraselmis sp.(ที่มา: https://www.ccap.ac.uk/catalogue/strain-66-50)

สาหร่าย *Tetraselmis* sp. ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ประเทศไทย รูปที่ 13 เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่ม*สาหร่าย*สีเขียว เช่นเดียวกันกับคลอเรลล่า สาหร่ายชนิดนี้เป็นสาหร่ายที่มีแฟลกเจลลา ว่ายน้ำได้ และมีขนาดที่เล็กมาก เจริญเติบโตได้ดีในสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกับคลอเรลล่า แต่แฟลกเจลลาหลุดได้ง่ายมากเมื่อมีภาวะไม่ปกติ เช่น การใส่ฟอร์มาลีน สามารถใช้เป็นอาหารแก่แพลงก์ตอนสัตว์ได้ เช่น โรติเฟอร์ ไรน้ำกร่อย อาร์ทีเมีย และโคพีพอด เป็นต้น เนื่องจากมีกรดไขมันในปริมาณที่สูงสำหรับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในสภาพธรรมชาติ 2-4 วัน

3.1.2 โคพีพอด สายพันธุ์ *Apocyclops royi*



รูปที่ 12 ตัวอย่างจากกล้องจุลทรรศน์แสดงสัณฐานวิทยาของโคพีพอด

สายพันธุ์ *Apocyclops royi*นอเพลียส (a), โคพีโพดิด (b) และระยะตัวเต็มวัย (c) ที่ย้อมด้วยสี Oil Red สเกลบาร์แสดงขนาด 200 μm (ที่มา: Amparyup et al., 2022b)

โคพีพอด *Apocyclops royi* (*A. royi*) ได้รับความอนุเคราะห์จากทีมวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) ประเทศไทย รูปที่ 12 โคพีพอด (*A. royi*) เป็นแพลงก์ตอนที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำลำตัวค่อนข้างใส มีรูปร่างทรงกระบอก รูปไข่หรือรูปกระบอง ลำตัวแบ่งเป็นปล้อง และมียางค์ ลำตัวจะประกอบด้วยปล้อง จำนวน 16-17 ปล้อง โคพีพอดมีรยางค์ทั้งหมด 11 คู่ โคพีพอดจะมีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ (Metamorphosis) เพื่อพัฒนาขนาดและรูปร่าง ภายหลังจากที่ฟักออกจากไข่จะมีการลอกคราบประมาณ 10 ครั้ง ใช้ระยะพัฒนาตั้งแต่ระยะนอเพลียส (ตัวอ่อน) ถึงตัวเต็มวัย 15-16 วัน โดยตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 600 ไมโครเมตร สามารถสังเกตเห็นระบบสืบพันธุ์ที่แบ่งแยกเพศผู้เพศเมียจากกันได้ชัดเจน

3.1.3 อาร์ทีเมีย (*Artemia salina*)

รูปที่ 13 อาร์ทีเมีย
(*Artemia salina*) (ที่มา: https://www.derma-innovation.com/content/7373/artemia-salina)

อาร์ทีเมีย (*Artemia*) ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม และเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีลักษณะเป็นสัตว์สีน้ำตาล ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มตัว มีเพียงเนื้อเยื่อบาง ๆ เท่านั้นที่หุ้มตัว ว่ายน้ำเคลื่อนที่ในลักษณะหงายท้อง ลำตัวเรียวยาวคล้ายใบไม้แบ่งออกได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว แบ่งออกได้เป็น 6 ปล้อง ส่วนอกแบ่งออกเป็น 11 ปล้อง และส่วนท้องแบ่งออกได้ 8 ปล้อง แต่ละปล้องประกอบด้วยระยางค์ เป็นอวัยวะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ การหายใจและการกรองรวบรวมอาหาร โดยปกติเมื่อโตเต็มวัยเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย รูปที่ 13 โดยอาร์ทีเมียสายพันธุ์ *A. salina* ที่ใช้ในการทดลองได้มากจากการเพาะไข่อาร์ทีเมียยี่ห้อ American eagle ไข่เกรดคุณภาพ เปอร์เซ็นต์ฟักสูง จากประเทศสหรัฐอเมริกา (USA) เพาะได้ง่าย เหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการอาหารสด สะอาด มาเพาะหรือเลี้ยงลูกสัตว์น้ำวัยอ่อน

3.1.4 กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* (De man, 1879)

รูปที่ 14 กุ้งก้ามกราม
Macrobrachium rosenbergii (De man, 1879) ระยะโพสลาวาร์ (PL) (ที่มา: https://www.shutterstock.com/th/search/prawn-hatchery)

ลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*M. rosenbergii*) ระยะโพสลาวาร์ (PL) จากฟาร์ม สมชายฟาร์ม ตำบลบ้านช้าง อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี ลูกกุ้งในระยะ PL เป็นระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้ายก่อนจะพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย ระยะนี้มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลูกกุ้งในระยะนี้ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากเนื่องจากในระยะนี้ลูกกุ้งมีรยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย ซึ่งลูกกุ้งจะวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ ก่อนที่ลูกกุ้งจะเริ่มคว่ำ และมีลักษณะเหมือนกุ้งโตทุกประการ ทั้งนี้ลูกกุ้งในระยะนี้จำเป็นจะต้องได้รับการดูแลทั้งสภาพแวดล้อม และอาหารที่ดี เพื่อให้ได้กุ้งที่มีคุณภาพ เจริญไปเป็นตัวเต็มวัยที่มีสุขภาพ อัตราการเจริญเติบโต และอัตรารอดที่ดี ทั้งนี้ลูกกุ้งที่มีคุณภาพ มีความสำคัญในกระบวนการผลิตเป็นอย่างมาก ถ้าลูกกุ้งมีคุณภาพดีโอกาสที่เกษตรกรจะเลี้ยงได้ผลผลิตและขนาดตามเป้าหมายก็เพิ่มสูงขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

-20^{o}C Freezer	Mitsubishi Electric/Japan
-20 ^{o}C Refrigerator	Haier/ China
-80 ^{o}C Freezer	Sanyo/Japan
Analytical balance	Sartorius/Germany
Aquarium air pump	
Autoclave	Tomy/Japan
High-speed refrigerated Microcentrifuge	Tomy/Japan
Automatic micropipettes P10, P20, P200 และ P1000	Labnet International, Inc. /USA
96 well plate	Costar/USA

Microplate	BioTek/USA
Microtubes (0.6, 1.5)	Axygen Scientific/China
PCR tubes	Axygen Scientific/China
Pipette tips	Axygen Scientific/China
Gel documentation	Syngene/UK
Handheld salinity refractometer	
Microwave	
Laboratory balance	Sartorius/Germany
Nano drop 2000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific/USA
Thermal cycler	Bio-Rad/Germany
Vortex mixer	Biosan/Latvia

3.2.2 สารเคมี

<u>สารเคมีสำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ (RNA extraction)</u>

Chloroform	AnalaR NORMAPUR/France
Ethanol	MERCK/Germany
Isopropanol	MERCK/Germany
Nuclease free water	Thermo Fisher Scientific/USA
TRI Reagent	*Molecular Research Center* (MRC)/USA

<u>สารเคมีสำหรับการสังเคราะห์ cDNA</u>

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Oligo(dT) primer	Thermo Fisher Scientific, USA
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (5X Reaction buffer, 10 mM dNTP mix, RevertAid และ Ribolock)	Thermo Fisher Scientific, USA

<u>สารเคมีสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR</u>

10X Taq Buffer with $(NH_4)_2SO_4$	Thermo Fisher Scientific/USA
100 mM dATP, dCTP, dGTP และ dTTP	Thermo Fisher Scientific/USA
25 mM Magnesium chloride ($MgCl_2$)	Thermo Fisher Scientific/USA
Agarose	Vivanitis/Malaysia
Boric acid	Merck/Germany

Ethidium bromide	Sigma-Aldrich/Germany
Ethylenediaminetetra-acetic acid disodium salt (EDTA)	KemAus/Australia
GeneRuler 100 bp plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific/USA
Taq DNA polymerase	Thermo Fisher Scientific/USA
Tris hydroxymethyl methylamine	Vivantis/Malaysia

3.3 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาประสิทธิภาพของโคพีพอด *Apocyclops royi* ในการเป็นอาหารสำหรับอนุบาลกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* วัยอ่อนต่อการเติบโต และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ออกแบบการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหาร (กลุ่มควบคุม)

3.4 สถานที่ทดลอง

ทำการทดลอง ณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงาน

3.5.1 การเตรียมสาหร่าย *Tetraselmis* sp. สำหรับให้เป็นอาหารโคพีพอด

รูปที่ 15 การเพาะเลี้ยงสาหร่ายเตตร้าราเซลมิส

Tetraselmis sp. สำหรับให้เป็นอาหารโคพีพอด

ทำการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในขวดแก้วดูแรนขนาด 5 ลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงสาหร่ายสูตรกิลลาร์ด F/2 ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อสาหร่าย *Tetraselmis* sp. และนำไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้อากาศที่

ผ่านตัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร และให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ ตลอดเวลา เมื่อสาหร่ายเติบโตเข้าสู่ระยะทวีคูณทำให้เข้มข้นด้วยวิธีการกรอง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเตรียมโคพีพอดสำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

รูปที่ 16 การเพาะเลี้ยงโคพีพอด

Apocyclops royi สำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

ทำการเพาะเลี้ยงโคพีพอด (*A. royi*) ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ในขวดแก้วดูแรนขนาด 5 ลิตร จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อสาหร่าย *Tetraselmis* sp. โดยให้อากาศที่ผ่านตัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร และให้แสงความเข้ม 5,500 ลักซ์ ตลอดเวลา จากนั้นนำไปเลี้ยงโคพีพอดเป็นเวลา 15 วัน ก่อนนำไปใช้อนุบาลลูกกุ้ง

3.5.3 การเตรียมอาร์ทีเมียสำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

รูปที่ 17 การเตรียมอาร์ทีเมีย (American eagle, USA)

สำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

ฟักไข่อาร์ทีเมีย (American eagle, USA) ในน้ำทะเลความเค็ม 25 ppt ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในขวดพลาสติกขนาด 5 ลิตร โดยมีการให้อากาศตลอดเวลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ทำการกรองเก็บอาร์ทีเมียที่ฟักแล้วแยกออกจากเปลือกไข่ก่อนนำไปใช้อนุบาลลูกกุ้งในขั้นตอนต่อไป

3.5.4 การอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*M. rosenbergii*) ด้วยโคพีพอด

เตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน (*M. rosenbergii*) ระยะ Post Larvae (PL) ซึ่งเป็นระยะตัวอ่อนขั้นสุดท้ายก่อนจะพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัย ได้รับความอนุเคราะห์จาก*สมชายฟาร์ม* ตำบลบ้านช้าง อำเภอสองพี่น้อง จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 120 ตัว มีความยาวประมาณ 0.5 เซนติเมตร ทำการสุ่มแบ่งกุ้งจำนวน 60 ตัวมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการทดลองโดยแบ่งกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มทดลอง ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร (กุ้งจำนวน 30 ตัว) และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหาร (กุ้งจำนวน 30 ตัว) ทำการทดลองเลี้ยงลูกกุ้งที่อุณหภูมิ 28 °C มีการให้อากาศออกซิเจนตลอดเวลา ในน้ำทะเลที่มีค่าความเค็มของน้ำเท่ากับ 5 ppt โดยให้อาหารวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

3.5.5 การศึกษาผลของโคพีพอดต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

ทำการชั่งน้ำหนักของลูกกุ้งก้ามกรามภายหลังจากการทดลองอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* และอาร์ทีเมีย (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกราม 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)

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

3.5.6 การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน Myostatin ในกุ้งก้ามกราม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Myostatin จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* (Amparyup et al., unpublished data) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ทำนายหาบริเวณ Signal peptide ทำโดยใช้โปรแกรม SignalP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP) ทำนายหาโดเมนที่มีความสำคัญโดยใช้โปรแกรม SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) และทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

3.5.7 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Semiquantitative RT-PCR

การเตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

เตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนโดย แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่ให้โคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร (กุ้งจำนวน 30 ตัว) และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia salina*) (กุ้งจำนวน 30 ตัว) ทั้ง 2 กลุ่มจะแบ่งเป็นกลุ่มย่อยออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มย่อยละ 10 ตัว ให้อาหารวันละ 4 ครั้ง ทำการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนทั้ง 2 กลุ่มภายหลังการทดลองมาสกัดแยก RNA ด้วย Tri reagent จากนั้นนำ RNA ไปสังเคราะห์ first-strand cDNA โดยใช้ ImProm-IITM Reverse Transcriptase System kit (Promega) ทำการคัดเลือกยีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งก้ามกรามจากฐานข้อมูล GenBank ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อแต่ละยีน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเบื้องต้นด้วยเทคนิค RT-PCR วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบดีเอ็นเอ รายงานผลเป็นค่า relative mRNA expression โดยใช้ยีน 18S ribosomal RNA เป็นยีนควบคุม

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่กินโคพีพอดและอาร์ทีเมียเป็นอาหาร ในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มล. กลุ่มละ 3 หลอด (1 หลอดมีกุ้ง 1 ตัว) บดตัวอย่างกุ้งก้ามกรามให้ละเอียด จากนั้นเติม TRI Reagent (Molecular Research Center, USA) ลงในหลอดปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างกับ TRI Reagent วอร์เทกซ์ (vortex) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายที่ไม่มีตะกอนแล้วแยกใส่ไมโครทิวบ์ (microtube) หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นผสมคลอโรฟอร์ม (chloroform) กับสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันด้วยการวอร์เทกซ์ (vortex) ก่อนนำไปวางบนน้ำแข็ง 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดชั้นสารละลายใสด้านบน แยกใส่หลอดไมโครทิวบ์ (microtube) เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อทำให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 60 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งจากนั้นดูดสารละลายใสทิ้งไป เหลือตะกอนสีขาวของอาร์เอ็นเอไว้ก้นหลอด เติมเอทานอลเข้มข้น 75 % 1,000 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเสร็จสิ้นทำการดูดเอทานอลทิ้งและเปิดฝาเพื่อระเหยเอทานอลจนหมด ก่อนจะละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำที่ปราศจากเอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease- free water) และนำไปวัดคุณภาพและปริมาณ *RNA* ด้วยนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop Spectrophotometer)

จากนั้นจึงสกัดแยก RNA อีกครั้ง ก่อนการสกัดจะมีการเติมดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase I) 0.5 ไมโครลิตรและบ่มเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อสลายดีเอ็นเอ ทำกรสกัดซ้ำด้วย TRI Reagent ตามวิธีข้างต้น

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA)

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัด เติมไพรเมอร์ oligo(dT) ในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ก่อนทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำจนครบ 12 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบ 5 นาที แช่น้ำแข็งทันทีอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นผสมสารตามตารางที่ 4 แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler และควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ 25 °C เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 42 °C เป็นเวลา 90 นาที และที่ 72 °C เป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนสุดท้ายที่ 12 °C เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (reverse transcription)

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
5x reaction buffer	4
10 mM dNTP mix	2
RiboLock RNase inhibitor	1
RevertAid	1

การติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน

ศึกษาผลของการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ด้วยโคพีพอด *A. royi* โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน Myostatin ยีน heat shock protein (*Mr*HSP70) และยีน lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (*Mr*LGBP) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนดังกล่าวดังตารางที่ 5 ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยผสมสารที่ใช้ในการทำ PCR ตามตารางที่6 โดยใช้ ยีน *18S ribosomal* RNA (*Mr*18SrRNA) เป็นยีนควบคุม (internal control) และทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 1.7 % w/v และตรวจวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วยเอริเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide, EtBr) โดยใช้โปรแกรม Gel-Pro® Analyzer และคำนวณ ค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (relative expression) ของยีน Myostatin ยีน heat shock protein (*Mr*HSP70) และยีน lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (*Mr*LGBP) เทียบกับยีนควบคุม 18S ribosomal RNA (*Mr*18SrRNA) ค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ของแต่ละกลุ่มทดลองได้จากการคำนวณตามสมการด้านล่าง ดังนี้

$$\text{Relative expression} = \frac{\text{ความเข้มแถบของยีนที่ตรวจสอบ}}{\text{ความเข้มแถบของยีน 18S ribosomal RNA } (Mr\text{18SrRNA})} \times 100$$

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	เทคนิคที่ใช้
*Mr*MSTNa-F	AGCACCCAAGGTCTACGATG	RT-PCR
*Mr*MSTNa-R	CACAACGATCCACGACCATA	RT-PCR
*Mr*HSP70-F	GCTGCCATCGCTTATGGCTTAG	RT-PCR
*Mr*HSP70-R	GCGAAGAGCACGTTTGTTCTCA	RT-PCR
*Mr*LGBP-F	AAACCAGGGGCAACGACAACTA	RT-PCR
*Mr*LGBP-R	GAGCCAGGATCAGCTGTCATCA	RT-PCR
*Mr*18SrRNA-F (ยีนควบคุม)	TCCGTGCACTTACTGGTGATGACT	RT-PCR
*Mr*18SrRNA-R (ยีนควบคุม)	GCTCATTCCAATTACGCAGACTCG	RT-PCR

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O PCR	12.3
10x Taq buffer with $(NH_4)_2SO_4$	2.5
25 mM $MgCl_2$	1.5
1 mM dNTP	2.5
Forward primer (F)	2.5
Reverse primer (R)	2.5
Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)	0.2
cDNA (1:10)	1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 6 PCR Cycle, RNA

อุณหภูมิ °C	เวลา	
94	12.3 นาที	
94	2.5 วินาที	
55	1.5 วินาที	25, 30 รอบ
72	2.5 วินาที	
72	2.5 นาที	
12	1 นาที	

3.5.8 การศึกษา Microbiome

การสกัดแยกดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามที่กินโคพีพอดและอาร์ทีเมียเป็นอาหาร ในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มล. กลุ่มละ 3 หลอด (1 หลอดมีกุ้ง 1 ตัว) จากนั้นบดตัวอย่างกุ้งก้ามกรามด้วย microspestle ใน precilled 1-5 มิลลิลิตร และทำการผสมตัวอย่างกับ TEN Buffer ซึ่งประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA pH 8.0 และ 250 mM NaCl จากนั้นทำการเติม 10% SDS ให้ได้ Final Conc. เป็น 10% W/V จากนั้นเติม RNase A solution 10 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร ให้ได้เป็น Final Conc. เป็น 0.1 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร โดยทำสารละลายตัวอย่างให้เข้ากันด้วยการวอร์เทกซ์ (vortex) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม Proteinase K solution 10 มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิตร ให้ได้เป็น Final Conc. เป็น 0.2มิลลิกรัม ต่อ 1 มิลลิลิต Vortex และ Spin จากนั้นทำให้สารละลายตัวอย่างให้เข้ากันด้วยการวอร์เทกซ์ (vortex) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายที่ไม่มีตะกอนแล้วแยกใส่ไมโครทิวป์ (microtube) หลอดใหม่ เติม Equilibrated phenol วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นทำการดูดสารละลายแยกใส่ไมโครทิวป์ (microtube) หลอดใหม่ ทำซ้ำในขั้นตอนการเติม Equilibrated phenol วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติม Phenol, Chloroform และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่า วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 15 นาที และดูดสารละลายแยกใส่ไมโครทิวป์ (microtube) หลอดใหม่ ก่อนจะเติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน (24:1) ปริมาตร 1 เท่า วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะดูดสารละลายแยกใส่ไมโครทิวป์ (microtube) หลอดใหม่ โดยสารละลาย ทำซ้ำในขั้นตอนการเติมคลอโรฟอร์ม (Chloroform) และ Isoamyl alcohol ในอัตราส่วน (24:1) ปริมาตร 1 เท่า วอร์เทกซ์ (vortex) เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเจือจางด้วย TE Buffer 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจะตกตะกอนด้วย 3M Sodium Acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 ต่อ 10 เติม Chilled absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของ Final volumeและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -80 °C เป็นเวลา 90 นาที ก่อนจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จสิ้นทำการดูดสารละลายใสทิ้งไป เติมเอทานอลเข้มข้น 70 % 1,000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจะ air dried ในตู้บ่ม 37 °C เป็นเวลา 15-20 นาที หลังจากนั้นละลายดีเอ็นเอใน 30 ไมโครลิตร TE Buffer ซึ่งประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA pH 8.0 นำไปบ่ม 37 °C เป็นเวลา 15 นาที และนำไปวัดคุณภาพและปริมาณ *DNA concentration* ด้วยนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop Spectrophotometer) ทั้งนี้จะทำการรันเจลเช็คการมีอยู่ของดีเอ็นเอ โดยใช้ 1.8% Agarose gel ตามตารางที่ 11 และจัดเก็บดีเอ็นเอที่ 4 °C

การทำ PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามที่กินโคพีพอดและอาร์ทีเมียเป็นอาหาร ผสมสารที่ใช้ในการทำ PCR ตามตารางที่ 9 โดยมี ยีน *16S Amplicon_F/R เป็น* ไพรเมอร์ ทั้งนี้ผลิตภัณฑ์ PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบอะกาโรสเจล โดยใช้อะกาโรสเข้มข้น 1.8 % w/v ตามตารางที่ 11 และตรวจวัดความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ถูกย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide, EtBr) โดยใช้โปรแกรม Gel-Pro® Analyzer

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอน semiquantitative RT-PCR, DNA

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' - 3')	เทคนิคที่ใช้
16S Amplicon -F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGC C TACGGGNGGCWGCAG	RT-PCR
16S Amplicon -R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG G ACTACHVGGGTATCTAATCC	RT-PCR

ตารางที่ 8 สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR, DNA

สารเคมี	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
H_2O PCR	24.6
10x Taq buffer with $(NH_4)_2SO_4$	5
25 mM $MgCl_2$	3
1 mM dNTP	5
Forward primer (F)	5
Reverse primer (R)	5
Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific, USA)	0.4
cDNA (1:10)	2

ตารางที่ 9 PCR Cycle, DNA

อุณหภูมิ °C	เวลา	
94	1 นาที	
94	30 วินาที	35 รอบ
55	30 วินาที	35 รอบ
72	30 วินาที	35 รอบ
72	10 นาที	
12	10 นาที	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 10 Run gel Check, DNA

สารเคมี	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	
Agarose	0.45	Wave
1x TBE	25	
H_2O	7.5	

การเตรียม PCR products เพื่อส่งวิเคราะห์ Microbiome

การทำ PCR Clean-up

นำ PCR product กุ้งก้ามกรามที่กินโคพีพอดและอาร์ทีเมียเป็นอาหาร ที่ถูกเพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR ด้วย 16S Amplicon นำมาทำ PCR Clean-up โดยใช้ชุด kit nucleospin Gel and PCR Clean-up โดยทำการเติม NT1 2 เท่าของ PCR product ลงใน PCR product จากนั้น Vortex, Spin จากนั้นทำการดูดใส่ Column ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อเสร็จสิ้นทำการทิ้ง Solution เติม NT3 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที (ทำซ่ำ 2 ครั้ง) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ก่อนทำการเติม PCR Water 25 ไมโครลิตร ปิดผาวางไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที นำ Column ออกจากหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) Vortex, Spin และนำ 1 ไมโครลิตร วัดคุณภาพและปริมาณ *DNA concentration* ด้วยนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop Spectrophotometer) ก่อนจะนำไปจัดเก็บที่ -20 ℃

การทำ Gel Extraction

นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1.8% อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโพริซิส ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต จากนั้นทำการตัดแถบเจล และนำมาแยกดีเอ็นเอโดยใช้ Nucleospin Gel and PCR Clean-up โดยนำชิ้นส่วนเจลที่ตัดใส่ในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มล. จากนั้นนำไปชั่งเพื่อหาน้ำหนักเจล เมื่อได้น้ำหนักเจลจะทำการเติม NT1 2 เท่าของน้ำหนักเจล (มิลลิกรัม) ก่อนจะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 ℃ เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน ทุก 2-3 นาที (จนเจลละลาย)เมื่อเจลละลายทำการดูดใส่ Column นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm จนกระทั่งเป็นเวลา 30 วินาที นำสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์ทิ้งไป เติมสารละลายบัฟเฟอร์ NT3 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที (ทำซ่ำ 2 รอบ) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ย้าย Column ลงในหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มล. เติม PCR Water 25 ไมโครลิตร ปิด

ฝา Column ตั้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ย้าย Column ออกจากหลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 1.5 มล. นำไป Vortex นำ 1 ไมโครลิตร วัดคุณภาพและปริมาณ *DNA concentration* ด้วยนาโนดรอปสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Nanodrop Spectrophotometer) จากนั้นวิเคราะห์สารละลาย DNA โดยใช้ 1.8% Agarose gel ตามตารางที่ 11 ก่อนจะจัดเก็บที่เหลือใน -20 ℃

จากนั้นทำการส่งตัวอย่างกุ้งที่ผ่านการทำ PCR โดยใช้ยีน 16S Amplicon_F/R เป็นไพรเมอร์ ผ่านการทำ PCR Clean-up และสารละลาย DNA ที่ได้จาก Gel Extraction ของทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มแรกเป็นกลุ่มทดลอง ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia sp.*) เป็นอาหาร กลุ่มละ 3 หลอดตัวอย่างส่งวิเคราะห์ ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์โอมิกส์และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii*

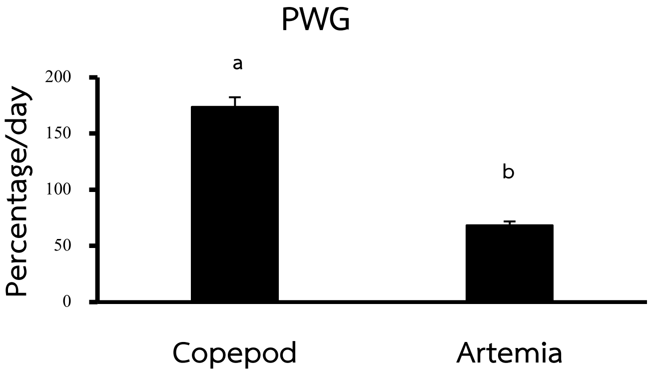
จากการศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ระยะ Post Larvae (PL) โดยติดตามตรวจสอบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและคำนวณเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโต ผลจากการทดลองพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 173.71 เปอร์เซ็นต์ และ 14.37 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) ซึ่งมีค่า PWG และ SGR เท่ากับ 68.48 เปอร์เซ็นต์ และ 7.36 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ ดัง ตารางที่ 12 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รูปที่ 20 แสดงให้เห็นว่าโคพีพอด *A. royi* เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนได้ดีกว่าอาร์ทีเมีย โดยผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานวิจัยในกุ้ง *Penaeus monodon* ซึ่งพบว่าการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. dengizicus* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งวัยอ่อนได้ดีกว่าอาร์ทีเมีย และการอนุบาลด้วยโคพีพอดมีความเหมาะสมในการนำมาทดแทนอาร์ทีเมียในการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งวัยอ่อน (Farhadian et al., 2009)

ตารางที่ 11 การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน
M. rosenbergii ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด (*A. royi*) และอาร์ทีเมีย (*Artemia sp.*)

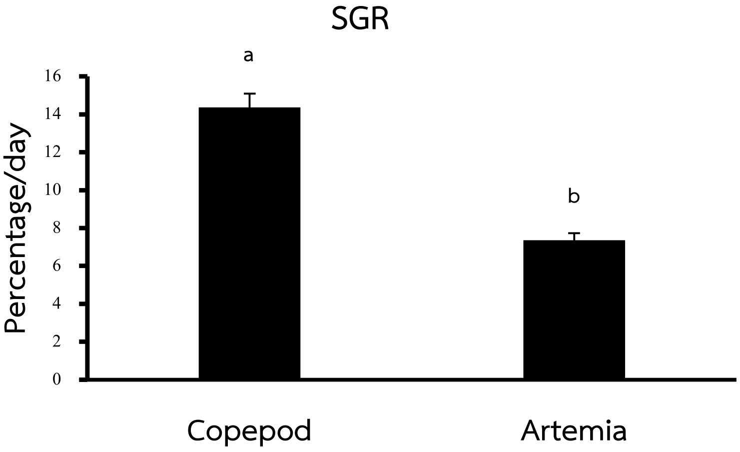
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเจริญเติบโต	เปอร์เซ็นต์/วัน	
	โคพีพอด (*A. royi*)	อาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.)
เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG)	173.71	68.48
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR)	14.37	7.36

(A)



(B)



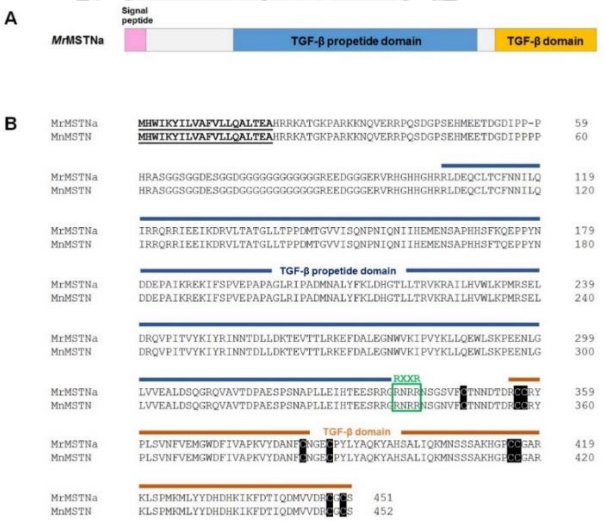
รูปที่ 18 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด (*A. royi*) และ อาร์ทีเมีย (*Artemia sp.*) (A) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) และ (B) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.2 การแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi*

4.2.1 การศึกษาลักษณะสมบัติและการแสดงออกของยีน MrMSTNa

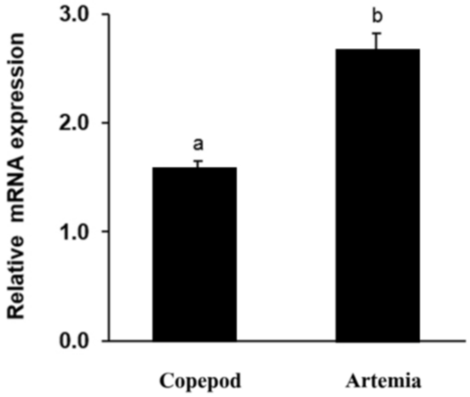
จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* พบว่ายีน *Mr*MSTNa ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Open reading frame (ORF) ขนาด 1,356 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 451 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์หา Signal peptide พบว่า *Mr*MSTNa มี Signal peptide ขนาด 20 กรดอะมิโน และ Mature peptide ขนาด 431 กรดอะมิโน โดย Mature peptide มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 48.26 กิโลดาลตัน และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 7.35

และจากการวิเคราะห์หาโดเมนที่มีความสำคัญพบว่า *Mr*MSTNa ประกอบด้วยโดเมน TGF-β propeptide domain ทางด้านปลายอะมิโน และ mature peptide หรือ TGF-β domain ทางด้านปลายคาร์บอกซิล โดยบริเวณ mature peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ Cys384, Cys356, Cys357, Cys384, Cys388, Cys415, Cys416, Cys448 และ Cys450 และบริเวณ proteolytic cleavage site RNRR (Arg338-Asp339-Arg340-Arg341) ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณอนุรักษ์ RXXR จากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน *Mr*MSTNa ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast พบว่ายีน *Mr*MSTNa มีความเหมือนกับยีน Myostatin ของกุ้ง *M. nipponense* มากที่สุด (99.34% identity) รูปที่ 21



รูปที่ 19 การจัดโดเมนและ sequence alignment ของยีน MSTN *Mr*MSTNa จากกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* (A) structural domains ของยีน MrMSTNa (B) Amino acid sequence alignment ของ *Mr*MSTNa และ *Mn*MSTN จาก *M. nipponense* โดย RXXR ของโปรตีนที่สงวนไว้ในโดเมน TGF-β จะถูกเน้นด้วยสีดำ

และจากการศึกษาผลของการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ด้วยโคพีพอด *A. royi* โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน Myostatin (*Mr*MSTNa) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเชิงลบที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตผ่านการจำกัดการสร้างกล้ามเนื้อ (Patel and Amthor, 2005) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ยีน 18S ribosomal RNA (Mr18SrRNA) เป็นยีนควบคุม (internal control) เมื่อพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีระดับการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.60 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย รูปที่ 22 โดยการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ที่ลดต่ำลงจะส่งผลทำให้ลูกกุ้งสามารถสร้างกล้ามเนื้อได้มากขึ้นและเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญเติบโต (PWG และ SGR) ที่วัดได้ในลูกกุ้งกลุ่มที่อนุบาลด้วย *A. royi* ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาวิจัยในปลาการ์ตูนลายปล้อง *Amphiprion clarkii* ซึ่งพบว่าการอนุบาลลูกปลาด้วยโคพีพอด *Centropages typicus* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน Myostatin (Olivotto et al., 2008b) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่นอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วยังมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa

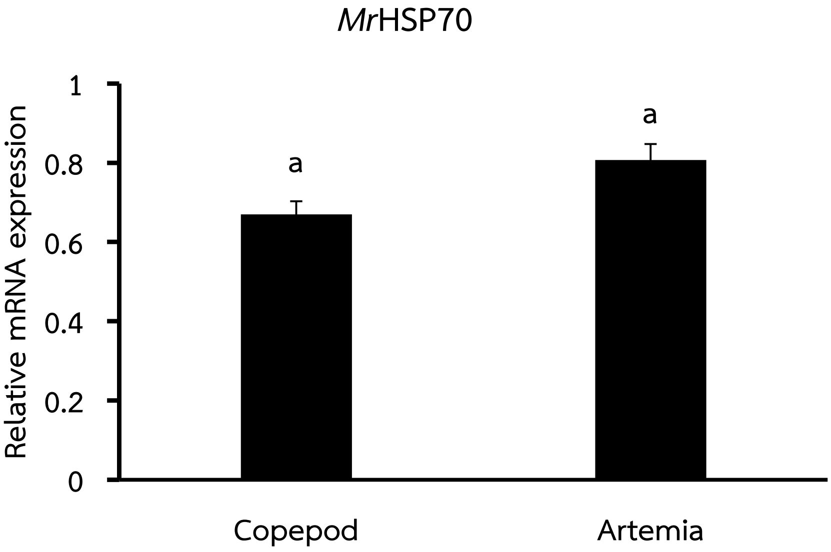


รูปที่ 20 ผลระดับการแสดงออกของยีน MSTN
*Mr*MSTNa ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่ให้โคพีพอด A. royi เป็นอาหาร ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±SD (แถบค่าความผิดพลาด) ของตัวอย่างที่ทำ 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (เหนือแต่ละแถบ) บ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่าง ($p<0.05$)

4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีน heat shock protein 70 (HSP70)

การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน heat shock protein, HSP70 (*Mr*HSP70) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการปรับตัว การอยู่รอด และการตอบสนองต่อความความเครียดใน

สิ่งแวดล้อม*ของสิ่งมีชีวิต* ด้วยเทคนิค semiquantitative RT-PCR เมื่อทำการวัดค่าการแสดงออกของยีน (mRNA expression) โดยใช้โปรแกรม Gel analyzer ได้ค่าความเข้มของแถบยีน (intensity) ในแต่ละกลุ่มเฉลี่ย โดยพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีระดับการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย การแสดงออกของยีน HSP70 ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR พบว่า เซลล์ ในทุกกลุ่มมีการแสดงออกของยีน HSP70 รูปที่ 23 แสดงให้เห็นถึงกลไกการตอบสนองระดับเซลล์ของทั้งสองกลุ่ม และให้ค่าการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์ (relative mRNA expression) ที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงถึงกลไกการทำงานระดับเซลล์ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอดที่สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ ผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาวิจัยในปลาบู่ทราย *Tigriopus japonicas* ซึ่งพบว่าการอนุบาลลูกปลาด้วยโคพีพอด *Acartia tonsa* พบการแสดงออกของยีน HSP70 มีบทบาทที่ช่วยส่งเสริมความทนทานต่ออุณหภูมิ และการแสดงออกต่อการได้รับสารแปลกปลอม (xenobiotic) ซึ่งเป็นสารเคมีที่พบในสิ่งมีชีวิต ที่สิ่งมีชีวิตนั้นไม่ได้ผลิตหรือสร้างขึ้นเอง เช่น ยารักษาโรค ซึ่งเป็นการตอบสนองเชิงป้องกัน (Rhee et al., 2009) และจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการแสดงออกของยีน *Mr*HSP70

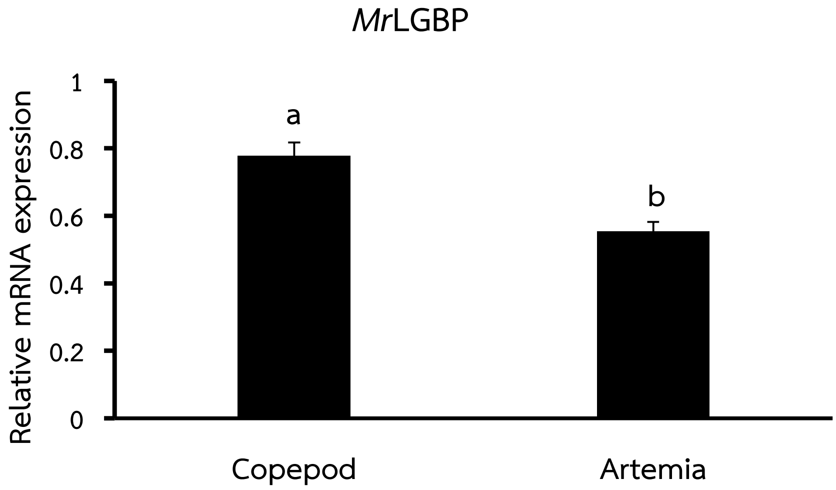


รูปที่ 21 ผลระดับการแสดงออกของยีน HSP70

*Mr*HSP70 ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่ให้โคพีพอด A. royi เป็นอาหาร ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±SD (แถบค่าความผิดพลาด) ของตัวอย่างที่ทำ 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (เหนือแต่ละแถบ) บ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่าง ($p>0.05$)

4.2.3 การศึกษาการแสดงออกของยีน lipopolysaccharide and β-1, 3-glucan binding protein (LGBP)

การติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน lipopolysaccharide and β-1,3-glucan binding protein (*Mr*LGBP) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างภูมิคุ้มกันโดยธรรมชาติผ่านการเป็นสื่อกลางในการจดจำเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามา ด้วยเทคนิค semiquantitative RT-PCR พบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีระดับการแสดงออกของยีน *Mr*LGBP เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย รูปที่ 24 โดยใช้โปรแกรม Gel analyzer ได้ค่าความเข้มของแถบยีน (intensity) ในแต่ละกลุ่ม โดยการแสดงออกของยีน *Mr*LGBP มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้การแสดงออกของยีน *Mr*LGBP ที่พบในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* จะส่งผลทำให้ลูกกุ้งสามารถจดจำเชื้อโรคที่บุกรุกเข้ามาได้มากขึ้น ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาวิจัยในกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* ซึ่งพบว่ารายงานว่ายีน LGBP ที่แสดงในกุ้งขาว (*Lv*LGBP) อาจทำหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำเชื้อโรคเพื่อเปิดใช้งานการป้องกันภูมิคุ้มกันของกุ้งต่อเชื้อโรคที่บุกรุกผ่านการเกาะติดกัน การจับตัวกันและการเพิ่มการห่อหุ้มและกิจกรรมฟีนอลออกซิเดสของเม็ดเลือด (Phupet et al., 2018) ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการภูมิคุ้มกันของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการแสดงออกของยีน *Mr*LGBP



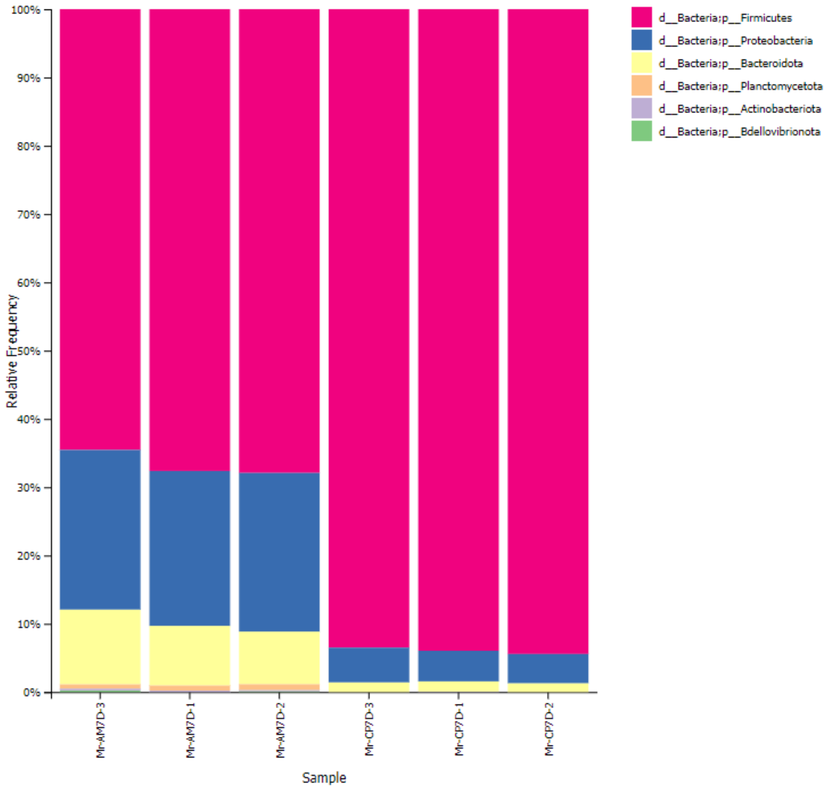
รูปที่ 22 ผลระดับการแสดงออกของยีน LGBP
*Mr*LGBP ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่ให้โคพีพอด A. royi เป็นอาหาร ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±SD (แถบค่าความผิดพลาด) ของตัวอย่างที่ทำ 3 ซ้ำ ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน (เหนือแต่ละแถบ) บ่งบอกถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่าง ($p<0.05$)

4.3 การศึกษาไมโครไบโอม (Microbiome) ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน M. rosenbergii ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด A. royi

ทำการส่งวิเคราะห์ตัวอย่างลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มแรกเป็นกลุ่มทดลอง ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหาร กลุ่มละ 3 หลอดตัวอย่าง ณ ศูนย์วิทยาศาสตร์*โอมิกส์*และชีวสารสนเทศ คณะวิทยาศาสตร์ *จุฬาลงกรณ์*มหาวิทยาลัย จากการวิเคราะห์ไมโครไบโอมของตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* พบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes มากที่สุดประมาณ 93.49-93.95% สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาองค์ประกอบความหลากหลาย และหน้าที่ของจุลินทรีย์ในลำไส้ในกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งพบแบคทีเรียที่สำคัญในลำไส้ของกุ้งขาว ได้แก่ ไฟลัม Proteobacteria (63.5%), Firmicutes (4.1%), Bacteroidetes (3.6%) , Planctomycetes (2.9%) และ Actinobacteria (0.8%) (Zeng et al., 2017) แบคทีเรียดังกล่าวในลำไส้อุดมไปด้วยศักยภาพในการทำงานที่เกี่ยวข้องกับ transporters, ABC transporters, DNA repair, recombination proteins, secretion system, bacterial motility proteins และ purine metabolism และ ribosome การค้นพบนี้ให้หลักฐานใหม่เกี่ยวกับจุลชีพของแบคทีเรียในลำไส้กุ้ง นอกจากนี้ ยังพบไฟลัม Proteobacteria และ Firmicutes ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) (Oxley et al., 2002; Rungrassamee et al., 2014)

ดังนั้น จากการศึกษาพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ดี ได้แก่ Proteobacteria และส่งเสริมกลุ่มแบคทีเรียที่ดี ได้แก่ Firmicutes รูปที่ 25 และตารางที่ 13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



รูปที่ 23 กราฟแสดงประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi*

ตารางที่ 12 ประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi*

Bacteria Phylum	Mr-CP7D-1	Mr-CP7D-2	Mr-CP7D-3	Mr-AM7D-1	Mr-AM7D-2	Mr-AM7D-3
Actinobacteriota	0.00	0.00	0.00	0.22	0.23	0.30
Bacteroidota	1.50	1.31	1.44	8.75	7.72	10.96
Bdellovibrionota	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.08
Firmicutes	93.95	94.43	93.49	67.62	67.90	64.50
Planctomycetota	0.00	0.00	0.00	0.74	0.83	0.74
Proteobacteria	4.48	4.26	5.07	22.67	23.22	23.36
รวม %	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

ประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัมในตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง กลุ่มแรกเป็นกลุ่มทดลอง ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหาร แสดงดังตารางที่ 13 การศึกษาประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัม จากค่าความถี่สัมพัทธ์ (Relative Frequency) 100% พบลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง มีการพบประชากรแบคทีเรียในระดับไฟลัม 6 ไฟลัมหลัก คือ Actinobacteriota, Bacteroidota, Bdellovibrionota, Firmicutes, Planctomycetota และ Proteobacteria

จากผลการวิเคราะห์ไมโครไบโอมพบว่า การเลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ด้วยโคพีพอด *A. royi* สามารถลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ดี ได้แก่ Proteobacteria แบคทีเรียในไฟลัมโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) เป็นกลุ่มยูแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-Negative Bacteria) ที่พบมากที่สุดประกอบด้วยเชื้อโรคหลากหลายชนิด เช่น Escherichia, Salmonella, Vibrio, Helicobacter และสกุลอื่นๆ อีกมากมาย บางชนิดมีชีวิตอิสระ และรวมถึงมีแบคทีเรียจำนวนมากที่มีหน้าที่ในการตรึงไนโตรเจน จากการศึกษาพบว่าในกลุ่มตัวอย่างของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหารให้ค่าความถี่สัมพัทธ์ (Relative Frequency) ของโพรทีโอแบคทีเรียเท่ากับ 4.26-5.07% ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุมที่ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหารที่ให้ค่าความถี่สัมพัทธ์เท่ากับ22.67-23.36% ทั้งนี้ มีงานวิจัยที่ค้นพบเกี่ยวกับบทบาทของโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) ไม่ใช่แค่ก่อโรคในลำไส้เท่านั้น แต่ยังรวมถึงก่อโรคนอกลำไส้ด้วย โดยมีข้อมูลจำนวนมากที่ชี้ว่าโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) เป็นสัญญาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นไปได้ของโรค โดยมีหลายการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงจำนวนสมาชิกที่เพิ่มขึ้นของไฟลัมนี้ในสภาพดังกล่าว มีหลักฐานสำคัญในปัจจุบันว่าโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) มีส่วนเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของการเผาผลาญและโรคลำไส้อักเสบ อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่าโพรทีโอแบคทีเรีย (Proteobacteria) มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Rizzatti et al., 2017)

นอกจากนี้ การศึกษายังพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* สามารถส่งเสริมกลุ่มแบคทีเรียที่ดี ได้แก่ Firmicutes โดยแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้ มีการพบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* สูงถึง 93.49-93.95% ในขณะที่กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) มีการพบแบคทีเรียไฟลัม Firmicutes เพียง 64.50-67.90% ในขณะที่แบคทีเรียไฟลัม Bacteroidota ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* มีการค้นพบ 1.31-1.50% ซึ่งน้อยกว่าแบคทีเรียไฟลัม Bacteroidota ซึ่งพบในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) ที่ 7.72-10.96% ทั้งนี้ แบคทีเรียไฟลัม Firmicutes เป็นแบคทีเรียที่ดีหากมีแบคทีเรียชนิดนี้มากในลำไส้ บ่งชี้ถึงความอุดมสมบูรณ์ของอาหารที่กินเข้าไป Firmicutes สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง และเพิ่มประสิทธิภาพอาหารของอาหารที่กุ้งกิน สอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในลำไส้ ที่

พบในคนอ้วนเทียบกับคนผอม พบว่า คนอ้วนมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroidetes น้อยกว่า และมีแบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes มากกว่า คนผอมในกลุ่มควบคุม ต่อมาเมื่อคนอ้วนถูกจำกัดอาหารให้ได้รับเฉพาะอาหารที่จำกัดปริมาณคาร์โบไฮเดรต หรือไขมันเป็นเวลา 52 สัปดาห์ พบว่าปริมาณแบคทีเรีย กลุ่ม Bacteroidetes เพิ่มขึ้น ขณะที่แบคทีเรียกลุ่ม Firmicutes ลดลง โดยมีสัดส่วนของ Bacteroidetes ต่อ Firmicutes ใกล้เคียงกับสัดส่วนที่พบในคนผอม (Jongsamak et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* ให้ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 173.71 เปอร์เซ็นต์ และ 14.37 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) ซึ่งมีค่า PWG และ SGR เท่ากับ 68.48 เปอร์เซ็นต์ และ 7.36 เปอร์เซ็นต์/วัน ดังนั้นโคพีพอด *A. royi* จึงเป็นทางเลือกที่มีแนวโน้มและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพาะเลี้ยงสัตว์จำพวกครัสเตเชียน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* โดยศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* ศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่อการแสดงออกของยีนในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* และศึกษาชีวนิเวศจุลชีพ (*Microbiome*) ของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ผลการศึกษาวิจัยพบว่าลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกรามมีความเหมือนกับยีน Myostatin ที่มีรายงานในกุ้ง *M. nipponense* มากที่สุด นอกจากนี้ งานวิจัยนี้พบว่าการเลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ในขณะที่การแสดงออกของยีน *Mr*HSP70 และยีน β-1,3-glucan binding protein (*Mr*LGBP) พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อวิเคราะห์ไมโครไบโอมกลุ่มประชากรแบคทีเรีย พบว่า กุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ช่วยส่งเสริมแบคทีเรียที่ดีและลดจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ดี ทำให้กุ้งก้ามกรามมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ดังนั้นโคพีพอด *A. royi* จึงเป็นอาหารมีชีวิตทางเลือกที่มีแนวโน้มและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมในการส่งเสริมการ เจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ กุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่อนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ให้การเจริญเติบโตที่ดีผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa จึงมองเห็นถึงความสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่เหมาะสมแก่การอนุบาลลูกสัตว์น้ำเพื่อส่งเสริมการเติบโต ทั้งนี้ ยังมีสัตว์น้ำวัยอ่อนอีกหลายชนิดที่ควรค่าแก่การนำโคพีพอด *A. royi* ไปทดลองใช้ในการอนุบาลเพื่อให้ได้ข้อมูลที่อาจจำเป็นต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงลูกสัตว์น้ำได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาษาไทย

กรมประมง, 2526. การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมประมง. 2544. เอกสารค้าแนะน้าการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. [On line] Avaialable http: // www.fisheries.go.th/cs-trat/Datas.pdf.

เกรียงศักดิ์ เม่งอ้าพัน. 2549. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางฐ้า มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่

คู่มือการเพาะเลี้ยงและการใช้ประโยชน์จากอาร์ทีเมีย. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรมประมง, กองส่งเสริมการประมง.

ชมรมพัฒนาประมง, 2523-2524, การเพาะเลี้ยงกุ้ง, คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทร์รัชชกูล. 2547. อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 206 หน้า.

ชูศักดิ์ แสงธรรม, 2543. กุ้งก้ามกราม, สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ

ทวี จินตธรรม และขวัญกมล กลิ่นมีสุข. 2535. การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตกุ้งก้ามกรามในภาค กลางของประเทศไทย, วารสารเศรษฐกิจการเกษตร

ธวัช อารีกุล, 2529. แนวทางการพัฒนาการเลี้ยงกุ้งแช่บ๊วยตามป่าชายเลนและการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามในบ่อ. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.72 น.

ธิดา เพชรมณี. 2542. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ าชายฝั่ง. 49 หน้า

บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2535. หลักการเลี้ยงกุ้งก้ามกราม, คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประจวบ หลำอุบล 2525. กุ้ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปวีณา ตปนียวรวงศ์, อภิญญา อยู่สบาย, ปรารถนา ปานทอง, ปาริชาติ ชุมทอง, จันทร์จรัส วัฒนะโชติ และมะลิวัลย์คุตะโค. 2563. องค์ประกอบกรดไขมันของไซโคลพอยด์โคพีพอด Apocyclops royi ที่เลี้ยงด้วยสาหร่ายชนิดแตกต่างกัน. วารสารแก่นเกษตร, 48(1) : 101-108.

พงศธร จันทรัตน์. (2557). บทบาทของโคพีพอดเพื่ออนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน. วารสารวิจัย มข., 19(6), 939-949.

ลัดดา วงศ์รัตน์. 2543. คู่มือการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 127 หน้า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิไลลักษณ์ นิยมมณีรัตน์. (2565). เรื่องจากปก: โคพีพอด (Copepods) รากฐานของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศแหล่งน้ำ. วารสาร สิ่งแวดล้อม, ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1).

อนันต์ตันสุตะพานิช, นภดล ภูวพานิช, ธนัญช์สังกรธนกิจ และธงชัย เพิ่มงาม. (2536).

ภาษาอังกฤษ

Agh, N. and P.Sorgeloos. 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. Urmia University Press, Urmia, Iran.

Amparyup, P., S. Sungkaew, W. Charoensapsri, P. Chumtong, P. Yocawibun, P. Tapaneeyaworawong, R. Wongpanya and C. Imjongjirak. 2022a. RNA-seq transcriptome analysis and identification of the theromacin antimicrobial peptide of the copepod Apocyclops royi. Developmental and comparative immunology 135: 104464.

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

Barracco, M.A., Duvic, B., & Soderhall, K. (1991). The β-1,3-glucan-binding protein from the crayfish Pacifastacus leniusculus. when reacted with a β-1,3-glucan induces spreading and degranulation of crayfish granular cells. Cell and Tissue Research, 266(3). 491-497.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72. 248-254.

Bridges, R. 2005. Fiederation of British Aquitic Societies. [Online]. Available: http://www.fbas.co.uk/STRESS.html. 13/08/2008.

Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., ... Ochoa-Leyva, A. (2017). Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition

between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. Scientific Reports, 7(1).

Cowles, R. P., 1914. Palaemons of the Philippine Islands. The Philippine Journal of Science, (D) 9(4): 319–403, Fig. 1, Pls. 1–3.

Dhont, J., K. Dierckens, J. Støttrup, G. Van Stappen, M. Wille and P., Sorgeloos. 2013. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture, pp. 157-202. In G. Allan and G. Burnell, eds. Advances in Aquaculture Hatchery Technology. Woodhead Publishing, Oxford.

Drillet, G., N.O.G. Jørgensen, T.F. Sørensen, H. Ramløv and B.W. Hansen. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. Aquaculture Research 37: 756-772.

Duvic, B., & Soderhall, K. (1990). Purification and characterization of β-1,3-glucan binding protein from the plasma of the crayfish Pacifastacus leniusculus. Journal of Biological Chemistry, 265(16). 9332-9337.

Easvaran, S.P., S. Bhassu, M.B.B. Maningas and R.Y. Othman. 2019. Enhanced muscle regeneration in freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii achieved through in vivo silencing of the myostatin gene. Journal of the world aquaculture society 50: 1026-1039.

Fairfield, D. A. 2004. Heat shock transcription factor1 (HSF1) and the stress response in the auditory system. Ph.D. Thesis, Michigan University. Michigan.

Farhadian, O., F.M. Yusoff, S. Mohamed and C.R. Saad. 2009. Use of cyclopoid copepod Apocyclops dengizicus as live feed for Penaeus monodon postlarvae. Journal of the World Aquaculture Society 40: 22-32.

Gornati, R., E. Papis, S. Rimoldi, G. Terova, M. Saroglia and G. Bernardini. 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (Dicentrarchus labrax, L.). Gene. 34:111–118.

Holt, C. C., Bass, D., Stentiford, G. D., & van der Giezen, M. (2020). Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. Journal of Invertebrate Pathology, 107387.

Hornung, B.V.H., Zwittink, R.D., Kuikper, E.J., 2019. Issues and current standards of

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

controls in microbiome research. FEMS Microbiol. Ecol. 95 (5), fiz045.

Hoseinifar, S.H., Zare, P., Kolangi Miandare, H., 2015. The effects of different routes of inulin administration on gut microbiota and survival rate of Indian white shrimp post-larvae (Fenneropenaeus indicus)., Veterinary research forum: an. international quarterly journal 6 (4), 331-335.

Hou, D., et al., 2018a. Comparative analysis of the bacterial community compositions of the shrimp intestine, surrounding water and sediment. J. Appl. Microbiol. 125 (3), 792-799.

Hou, D., et al., 2018b. Intestinal bacterial signatures of white feces syndrome in shrimp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 3701-3709.

Huang, Z., et al., 2014. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of
white shrimp, Litopenaeus vannamei. Aquac. Res. 47 (6), 1737-1746.

Huang, F., et al., 2018. Microbiota assemblages of water, sediment, and intestine and their associations with environmental factors and shrimp physiological health. Appl. Microbiol. Biotechnol. 102, 8585-8598.

Huang, L., et al., 2020a. The bacteria from large-sized bioflocs are more associated with the shrimp gut microbiota in culture system. Aquaculture 523, 735159.

Huang, Z., et al., 2020b. Microecological Koch's postulates reveal that intestinal microbiota dysbiosis contributes to shrimp white feces syndrome. Microbiome 8 (1), 1-13.

Iwana, J.K., M. V. Mathilakath, B. F. Rob and N.D. Paige. 1999. Heat shock proteins and physiological stress in fish. American zoologist. 39:901-909.

Johansson, M.W., Lind, M., Holmblad, T., Thornqvist, P.O., & Soderhall, K. (1995). Peroxinectin, a novel cell adhesion protein from crayfish blood. Biochemical and Biophysical Research Communications, 216(3). 1079-1087.

Jung, H., R.E. Lyons, D.A. Hurwood and P.B. Mather. 2013. Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. Reviews in Aquaculture 5: 77-110.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure protein during assembly of head of bacteriophage T4. Nature, 227. 680-685.

Lee, W.J., Lee, J.D., Kravchenko, V.V., Ulevitch, R.J., & Brey, P.T. (1996). Purification and molecular cloning of an inducible Gram-negative bacteria-binding protein from the silkworm, Bombyx mori. Immunology, 93(15). 7888-7893.

Lee, S.Y., R. Wang., & Söderhäll, K. (2000). A lipopolysaccharide- and β -1, 3-glucanbinding protein from hemocytes of the freshwater crayfish Pacifastacus leninusculus. Purification, characterization, and cDNA cloning. Journal of Biological Chemistry, 275(2). 1337-1343.

Magne, F., Gotteland, M., Gauthier, L., Zazueta, A., Pesoa, S., Navarrete, P., & Balamurugan, R. (2020). The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients, 12(5), 1474.

McEvoy, L.A., T. Naess, J.G. Bell and Ø. Lie. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus) fed enriched Artemia: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163: 237-250.

Medzhitov, R., & Janeway, Jr. C.A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. Science. 296, 298-300.

Molina, A., F. Biemar, F. Muller, A. Iyengar, P. Prunet, N. Maclean, J.A. Martial, and M. Muller. 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. FEBS letters. 474:5–10.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

New, M.B. & Singholka, S. 1982. Freshwater prawn farming: a manual for the culture of Macrobrachium rosenbergii. FAO Fisheries Technical Paper No. 225. Rome.

New, M.B. & Singholka, S. 1985. Freshwater prawn farming: a manual for the culture of Macrobrachium rosenbergii. FAO Fisheries Technical Paper No. 225 Rev. 1. Rome. [also published in Farsi, French, Hindi, Spanish, and Vietnamese]

New, M.B. & Valenti, W.C. 2000. Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii. Oxford, England, Blackwell Science.

New, M.B., D'Abramo, L.R., Valenti, W.C. & Singholka, S. 2000. Sustainability of freshwater prawn culture. In M.B. New & W.C. Valenti, eds. Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii, pp. 429-434. Oxford, England, Blackwell Science.

New, M.B., Singholka, S. & Kutty, M.N. 2000. Prawn capture fisheries and

enhancement. In M.B. New & W.C. Valenti, eds. Freshwater prawn culture: the farming of Macrobrachium rosenbergii, pp. 411-428. Oxford, England, Blackwell Science.

Nielsen, B.L.H., L. Gøtterup, T.S. Jørgensen, B.W. Hansen, L.H. Hansen, J. Mortensen and P.M. Jepsen. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod Apocyclops royi documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. Biology Open 8: bio038331.

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

Patel, K. and H. Amthor. 2005. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. Neuromuscular Disorders 15: 117-126.

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

Olivotto, I., I. Buttino, M. Borroni, C.C. Piccinetti, M.G. Malzone and O. Carnevali. 2008b. The use of the Mediterranean calanoid copepod Centropages typicus in Yellowtail clownfish (Amphiprion clarkii) larviculture. Aquaculture 284: 211-216.

Oxley AP, Shipton W, Owens L, McKay D. 2002. Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, Penaeus merguiensis. Journal of Applied Microbiology 93(2):214–223

Øie, G.,T. Galloway, M. Sørøy, M.H. Hansen, I.A. Norheim, C.K. Halseth, M. Almli, M. Berg M.R., Gagnat, P.A. Wold, K. Attramadal, A. Hagemann, J.O. Evjemo and E. Kjørsvik. 2015. 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.

Qian, Z., Mi, X., Wang, X., He, S., Liu, Y., Hou, F., … Liu, X. (2013). cDNA cloning and

expression analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, Litopenaeus vannamei. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 165(1), 30–39.

Rajkumar, M. and K.P.K. Vasagam. 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.

Rasdi, N. W., & Qin, J. G. (2014). Improvement of copepod nutritional quality as live food for aquaculture: a review. Aquaculture Research, 47(1), 1–20.

Rhee, S. H., Pothoulakis, C., and Mayer, E. A. (2009). Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis. Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 6, 306–314.

Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Chaiyapechara S, Jiravanichpaisal P, Karoonuthaisiri N. 2014. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (Penaeus monodon). PLOS ONE 9(3):e91853

Sambrook, J. and D. Russel. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Volume 1: Third Edition.

Seo, J. S., T.-J. Park, Y.-M. Lee, H. G. Park, Y.-D. Yoon & J.-S. Lee, 2006a. Small heat shock protein 20 gene (Hsp20) of the intertidal copepod Tigriopus japonicus as a possible biomarker for exposure to endocrine disruptors. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 76: 566–572.

Shao, L., & Zeng, C. (2020). Survival, growth, ingestion rate and foraging behavior of larval green mandarin fish (Synchiropus splendidus) fed copepods only versus co-fed copepods with rotifers. Aquaculture, 734958.

Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase activating system in invertebrate immunity. Current Opinion in Immunology, 10(1). 23 - 28.

Sritunyalucksana, K., Wongsuebsantati, K., Johansson, M.W., & Soderhall, K. (2001).

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Peroxinectin, a cell adhesive protein associated with the ProPO system from the black tiger shrimp, Penaeus monodon. Developmental and Comparative Immunology, 25(5-6). 353-356.

Sun, B. and J.W. Fleeger. 1995. Sustained mass culture of Amphiasacoides atopus a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. Aquaculture 136: 313-321.

Thornqvist, P.O., Johansson, M.W., & Soderhall, K. (1994). Opsonic activity of cell adhesion proteins and β-1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. Developmental and Comparative Immunology, 18(1). 201-209.

Wang, H., L. Song, L., Li, C., Zhao, J., Zhang, H., Ni, D., & Xu, W. (2007). Cloning and characterization of a novel C-type lectin from zhikong scallop Chlamys farreri. Molecular Immunology, 44(5). 722-731.

Basu, N., A.E. Todgham, P.A. Ackerman, M.R. Bibeau, O. K. Nakan, P.M. Schulte, and G. K.

Iwana, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. Gene. 295:173–183.

Yan, Y., Kong, J., Lu, X., Luan, S., Meng, X., Dai, P., … Luo, K. (2020). Integrative phenotypic and gene expression data identify myostatin as a muscle growth inhibitor in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis. Scientific Reports, 10(1).

Yan, Y., X. Lu, J. Kong, X. Meng, S. Luan, P. Dai and K. Luo. 2020. Molecular characterization of myostatin and its inhibitory function on myogenesis and muscle growth in Chinese shrimp, Fenneropenaeus chinensis. Gene 758: 144986.

Yoo, J. L. and D. M. Janz. 2003. Tissue-specific HSP70 levels and reproductive physiological response in fishes inhabiting a metal-contaminated creek. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 45:0110-0120.

Zeng, S., et al., 2017. Composition, diversity and function of intestinal microbiota in pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) at different culture stages. PeerJ 5, e3986.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Zeng, S., et al., 2019. Antibiotic supplement in feed can perturb the intestinal microbial composition and function in Pacific white shrimp. Appl. Microbiol. Biotechnol. 103 (7), 3111-3122.

Zhang, J., et al., 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish Shellfish Immunol. 33 (4), 1027-1032.

Zhang, M., et al., 2014. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei, fed diets with different lipid sources. Aquaculture 434, 449-455.

Zhang, M., et al., 2016. Symbiotic bacteria in gills and guts of Chinese mitten crab (Eriocheir sinensis) differ from the free-living bacteria in water. PLOS ONE 11 (1), e0148135.

Zheng, Y., et al., 2016. Comparison of cultivable bacterial communities associated with Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) larvae at different health statuses and growth stages. Aquaculture 451, 163-169.

Zheng, Y., et al., 2017. Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) larvae and rearing water across different growth stages rearing of shrimp larvae. Front. Microbiol. 8, 1362.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

ผลงานตีพิมพ์ใน Proceedings

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การเจริญเติบโตและการแสดงออกของยีน Myostatin ในลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) วัยอ่อน ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *Apocyclops royi*

Growth and Myostatin Gene Expression of Giant Freshwater Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) Larvae Fed Copepod *Apocyclops royi*

<u>ฮับเซาะ มามะ</u>[1,2] วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี[3,4] ปิติ อ่ำพายัพ[3,4] และ จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก[2]*

<u>Habsoh Mama</u>[1,2], Walaiporn Charoensapsri[3,4], Piti Amparyup[3,4] and Chanprapa Imjongjirak[2*]

บทคัดย่อ

Myostatin (MSTN) เป็นยีนที่ควบคุมการเจริญเติบโตผ่านการยับยั้งการสร้างกล้ามเนื้อ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* และศึกษาประสิทธิภาพของโคพีพอด *Apocyclops royi* ในการเป็นอาหารสำหรับอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* วัยอ่อน ผลการทดลองพบว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่เลี้ยงด้วย *A. royi* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นและมีระดับการแสดงออกของยีน myostatin (*Mr*MSTNa) ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วย *Artemia* sp. ผลจากการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่มีบทบาทช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa

คำสำคัญ: กุ้งก้ามกราม โคพีพอด การเจริญเติบโต Myostatin

Abstract

Myostatin (MSTN) is a negative growth-regulating gene that inhibits muscle growth. This study aimed to characterize a *Mr*MSTNa gene from *Macrobrachium rosenbergii* and to investigate the efficiency of the copepod *Apocyclops royi* as live feed for *M. rosenbergii* larviculture. A significant increase in specific growth rate and decrease in myostatin (*Mr*MSTNa) gene expression were evidenced in *M. rosenbergii* larvae fed *A. royi*, compared to the control group fed *Artemia* sp. Taken together, this study demonstrated the importance of copepod *A. royi* as alternative feed to promote the growth of *M. rosenbergii* larvae via down-regulation of the *Mr*MSTNa transcript.

Keyword: *Macrobrachium rosenbergii*, copepod, Growth, Myostatin

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

---

[1] หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

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

[2] ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

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

[3] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, NSTDA, Pathumthani 12120, Thailand

[4] ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

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

คำนำ

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกรามยังคงเผชิญกับข้อจำกัดหลายด้าน โดยเฉพาะข้อจำกัดด้านการพัฒนาอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่เหมาะสมซึ่งเป็นคอขวดสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Agh and Sorgeloos, 2005) ในปัจจุบันการอนุบาลสัตว์น้ำส่วนใหญ่มักให้โรติเฟอร์และอาร์ทีเมียเป็นอาหารเนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในปริมาณมากที่ความหนาแน่นสูง แต่โรติเฟอร์และอาร์ทีเมียยังเป็นอาหารมีชีวิตที่มีคุณค่าทางโภชนาการไม่เพียงพอต่อความต้องการของลูกสัตว์น้ำ การศึกษาวิจัยอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำวัยอ่อนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (Sun and Fleeger, 1995) โคพีพอด เป็นแพลงก์ตอนสัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียนที่มีขนาดเล็กและมีคุณค่าทางโภชนาการสูงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต พัฒนาการ และการอยู่รอดของสัตว์น้ำวัยอ่อน (Drillet *et al.*, 2006) โคพีพอดจัดเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่คาดหมายว่าสามารถนำมาทดแทนโรติเฟอร์และอาร์ทีเมียได้ในอนาคต (Drillet *et al.*, 2006; Dhont *et al.*, 2013; Øie *et al.*, 2015) โดยจากรายงานวิจัยพบว่ามีการนำโคพีพอดไปใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนสำหรับอนุบาลตัวอ่อนสัตว์น้ำหลายชนิด (McEvoy *et al.*, 1998; Olivotto *et al.*, 2008a; Rajkumar and Vasagam, 2006)

การเจริญเติบโตของกุ้งขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการฟื้นฟูกล้ามเนื้อภายหลังการลอกคราบโดยอาศัยการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องหลายชนิด เช่น myostatin, crustacean hyperglycemic hormone, actin และ molt-inhibiting hormone เป็นต้น (Jung *et al.*, 2013) Myostatin (MSTN) เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต โดยทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบยับยั้งการสร้างกล้ามเนื้อในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Patel and Amthor, 2005) สำหรับในครัสเตเชียนพบว่าการลดระดับการแสดงออกของยีน Myostatin ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้ง *Litopenaeus vannamei* (Qian *et al.*, 2013) *Fenneropenaeus chinensis* (Yan *et al.*, 2020) และ *M. rosenbergii* (Easwvaran *et al.*, 2019) แสดงให้เห็นว่า Myostatin ในครัสเตเชียนมีบทบาทในการควบคุมการเจริญเติบโตคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง

Apocyclops royi เป็นโคพีพอดในกลุ่มไซโคลพอยด์ที่มีขนาดเล็ก (Amparyup et al., 2022a) สามารถสังเคราะห์กรดไขมัน PUFAs ได้จากกรดไขมันตั้งต้นที่ได้รับจากอาหารภายนอก (Nielsen et al., 2019, Pan *et al.*, 2018) จากผลงานวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยพบว่า โคพีพอด *A. royi* ระยะนอเพลียส โคพีโพดิด และตัวเต็มวัยสามารถสังเคราะห์กรดไขมัน DHA ได้ผ่านทางวิถีโมเลกุลของการสังเคราะห์กรดไขมัน PUFA (Amparyup *et al.*, 2022b) แสดงให้เห็นว่าโคพีพอด *A. royi* มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีศักยภาพในการใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกเพื่ออนุบาลลูกสัตว์น้ำ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่ออัตราการเจริญเติบโต และการแสดงออกของยีน Myostatin ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii*

อุปกรณ์และวิธีการ

การวิเคราะห์ยีน Myostatin ในกุ้งก้ามกราม

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Myostatin จากฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* (Amparyup et al., unpublished data) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ทำนายหาบริเวณ Signal peptide โดยใช้โปรแกรม SignalP 6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP) ทำนายหาโดเมนที่มีความสำคัญโดยใช้โปรแกรม SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/) และทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

การเตรียมโคพีพอดสำหรับให้เป็นอาหารกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

เพาะเลี้ยงโคพีพอด *Apocyclops royi* ด้วยสาหร่าย *Tetraselmis* sp. ที่ความเค็ม 25 ppt เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นกรองเก็บโคพีพอดด้วยผ้ากรองขนาด 33 ไมครอน ก่อนนำไปใช้อนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามในขั้นตอนถัดไป

การอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนด้วยโคพีพอด

เตรียมตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *Macrobrachium rosenbergii* ระยะ Post Larvae (PL) จำนวน 120 ตัว ทำการสุ่มแบ่งกุ้งจำนวน 60 ตัวมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำการทดลองโดยแบ่งกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนออกเป็น 2 กลุ่ม แต่ละกลุ่มประกอบด้วย 3 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยละ 10 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มทดลอง ให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินโคพีพอด (*A. royi*) เป็นอาหาร (กุ้งจำนวน 30 ตัว) และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมให้กุ้งก้ามกรามวัยอ่อนกินอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) เป็นอาหาร (กุ้งจำนวน 30 ตัว) ทำการทดลองเลี้ยงลูกกุ้งที่อุณหภูมิ 28 °C ความเค็ม 5 ppt โดยให้อาหารวันละ 4 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

การศึกษาผลของโคพีพอดต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน

ทำการชั่งน้ำหนักของลูกกุ้งก้ามกรามภายหลังจากการทดลองอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* และอาร์ทีเมีย (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกราม 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)

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

การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

เก็บตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนภายหลังจากการทดลองอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* และอาร์ทีเมีย (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 7 วัน มาสกัด RNA ด้วย Tri reagent (Molecular Research Center) กำจัด DNA ที่เจือปนออกโดยย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I (Thermo Fisher Scientific) ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ด้วย RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) โดยใช้ RNA ที่เตรียมได้เป็นต้นแบบ เก็บตัวอย่าง cDNA ที่อุณหภูมิ -80 °C ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

การศึกษาการแสดงออกของยีน Myostatin ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด

ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีน Myostatin ในตัวอย่างกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนภายหลังจากการทดลองอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่อนุบาลด้วยอาร์ทีเมีย ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน Myostatin ได้แก่ MrMSTNa-F: 5'-AGCACCCAAGGTCTACGATG-3' และ MrMSTNa-R: 5'-CACAACGATCCACGACCATA-3' โดยใช้ยีน 18S ribosomal RNA (Mr18SrRNA-F: 5'- TCCGTGCACTTACTGGTGATGACT-3' และ Mr18SrRNA-R: 5'-GCTCATTCCAATTACGCAGACTCG-3') เป็นยีนควบคุม ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย agarose gel electrophoresis จากนั้นวิเคราะห์ค่า Relative gene expression จากความเข้มของแถบ DNA โดยใช้ Gel-Pro Analyzer Software

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii*

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* พบว่ายีน *Mr*MSTNa ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ Open reading frame (ORF) ขนาด 1,356 คู่เบส สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 451 กรดอะมิโน จากการวิเคราะห์หา Signal peptide พบว่า *Mr*MSTNa มี Signal peptide ขนาด 20 กรดอะมิโน และ Mature peptide ขนาด 431 กรดอะมิโน โดย Mature peptide มีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 48.26 กิโลดาลตัน และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 7.35

จากการวิเคราะห์หาโดเมนที่มีความสำคัญพบว่า *Mr*MSTNa ประกอบด้วยโดเมน TGF-β propeptide domain ทางด้านปลายอะมิโน และ mature peptide หรือ TGF-β domain ทางด้านปลายคาร์บอกซิล โดยบริเวณ mature peptide ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเทอีนอนุรักษ์ จำนวน 9 ตำแหน่ง ได้แก่ Cys384, Cys356, Cys357, Cys384, Cys388, Cys415, Cys416, Cys448 และ Cys450 และบริเวณ proteolytic cleavage site RNRR (Arg338-Asp339-Arg340-Arg341) ซึ่งสอดคล้องกับบริเวณอนุรักษ์ RXXR จากการเปรียบเทียบความเหมือนของยีน *Mr*MSTNa ของกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* กับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Blast พบว่ายีน *Mr*MSTNa มีความเหมือนกับยีน Myostatin ของกุ้ง *M. nipponense* มากที่สุด (99.34% identity) (ภาพที่ 1)

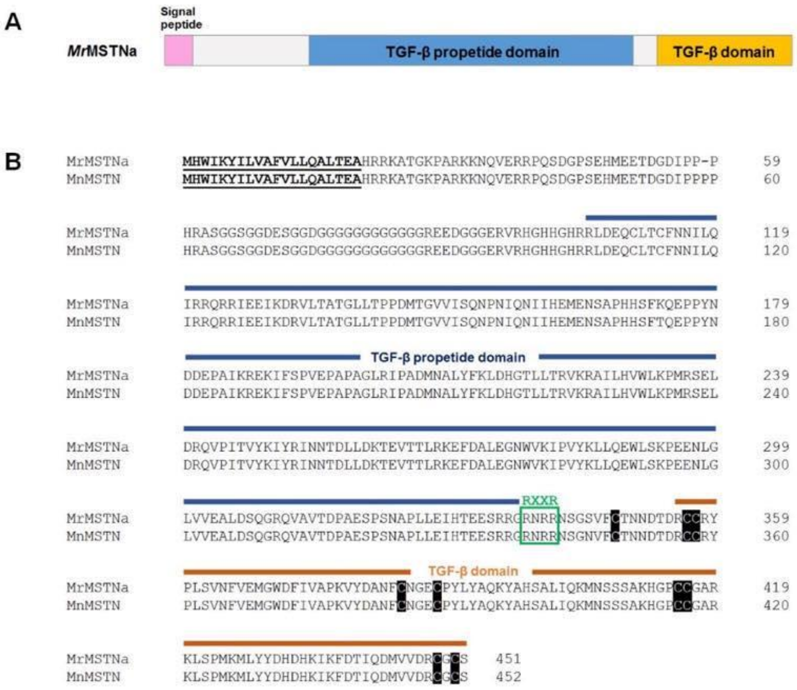


Figure 1 Domain and sequence alignment of *Mr*MSTNa from *Macrobrachium rosenbergii*. (A) Schematic representation of the structural domains of *Mr*MSTNa. (B) Amino acid sequence alignment of *Mr*MSTNa and *Mn*MSTN from *M. nipponense*. The conserved proteolytic RXXR cleavage site is boxed. The conserved cysteines in the TGF-β domain are highlighted in black.

การเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi*

จากการศึกษาผลของการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. royi* ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ระยะ Post Larvae (PL) โดยติดตามตรวจสอบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและคำนวณเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโต ผลจากการทดลองพบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (PWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) เท่ากับ 173.71 เปอร์เซ็นต์ และ 14.37 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (*Artemia* sp.) ซึ่งมีค่า PWG และ SGR เท่ากับ 68.48 เปอร์เซ็นต์ และ 7.36 เปอร์เซ็นต์/วัน ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าโคพีพอด *A. royi* เป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนได้ดีกว่าอาร์ทีเมีย โดยผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานวิจัยในกุ้ง *Penaeus monodon* ซึ่งพบว่าการอนุบาลด้วยโคพีพอด *A. dengizicus* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งวัยอ่อนได้ดีกว่าอาร์ทีเมีย และการ

อนุบาลด้วยโคพีพอดมีความเหมาะสมในการนำมาทดแทนอาร์ทีเมียในการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งวัยอ่อน (Farhadian *et al.*, 2009)

การแสดงออกของยีน Myostatin **ในกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน** *M. rosenbergii* **ที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด** *A. royi*

จากการศึกษาผลของการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ด้วยโคพีพอด *A. royi* โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน Myostatin (*Mr*MSTNa) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเชิงลบที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตผ่านการจำกัดการสร้างกล้ามเนื้อ (Patel and Amthor, 2005) ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR พบว่ากุ้งก้ามกรามวัยอ่อนที่เลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* เป็นเวลา 7 วัน มีระดับการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (0.60 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาร์ทีเมีย (ภาพที่ 2) โดยการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ที่ลดต่ำลงจะส่งผลทำให้ลูกกุ้งสามารถสร้างกล้ามเนื้อได้มากขึ้นและเจริญเติบโตได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าอัตราการเจริญเติบโต (PWG และ SGR) ที่วัดได้ในลูกกุ้งกลุ่มที่อนุบาลด้วย *A. royi* ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลจากการศึกษาวิจัยสอดคล้องกับรายงานการศึกษาวิจัยในปลาการ์ตูนลายปล้อง *Amphiprion clarkii* ซึ่งพบว่าการอนุบาลลูกปลาด้วยโคพีพอด *Centropages typicus* ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน Myostatin (Olivotto et al., 2008b) ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นถึงบทบาทสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนที่นอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วยังมีส่วนช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa

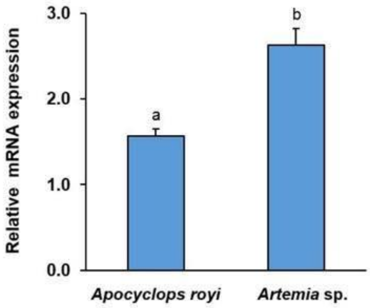


Figure 2 Effect of copepod *Apocyclops royi* feeding on modulation of the expression level of *Mr*MSTNa transcripts of the giant freshwater prawn larvae *Macrobrachium rosenbergii*. The 18S ribosomal RNA gene served as an internal reference gene. Data are shown as the mean±SD (error bars) of the triplicate samples. Different lowercase letter (above each bar) indicate a significant difference between mean of each sample (p<0.05).

สรุปผลและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาลักษณะสมบัติของยีน myostatin (*Mr*MSTNa) ในกุ้งก้ามกราม *M. rosenbergii* และศึกษาประสิทธิภาพของโคพีพอด *A. royi* ในการอนุบาลกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน *M. rosenbergii* ผลการศึกษาวิจัยพบว่าลักษณะสมบัติของยีน *Mr*MSTNa ในกุ้งก้ามกรามมีความเหมือนกับยีน Myostatin ที่มีรายงานในกุ้ง *M. nipponense* มากที่สุด นอกจากนี้ งานวิจัยนี้พบว่าการเลี้ยงด้วยโคพีพอด *A. royi* มีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนผ่านการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Mr*MSTNa ผลจากการวิจัยแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของโคพีพอด *A. royi* ในการเป็นอาหารสัตว์น้ำวัยอ่อนทางเลือกที่เหมาะสมต่อการอนุบาลลูกกุ้งก้ามกรามวัยอ่อน และได้องค์ความรู้ของยีน myostatin ชนิดใหม่ที่อาจจำเป็นต่อการพัฒนาการเพาะเลี้ยงลูกกุ้งก้ามกรามในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนจากสถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย (TGIST) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ สัญญารับทุนเลขที่ SCA-CO-2563-12075-TH

เอกสารอ้างอิง

Agh, N. and P. Sorgeloos. 2005. Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture. Urmia University Press, Urmia, Iran.

Amparyup, P., S. Sungkaew, W. Charoensapsri, P. Chumtong, P. Yocawibun, P. Tapaneeyaworawong, R. Wongpanya and C. Imjongjirak. 2022a. RNA-seq transcriptome analysis and identification of the theromacin antimicrobial peptide of the copepod *Apocyclops royi*. Developmental and comparative immunology 135: 104464.

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

Dhont, J., K. Dierckens, J. Støttrup, G. Van Stappen, M. Wille and P., Sorgeloos. 2013. Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture, pp. 157-202. In G. Allan and G. Burnell, eds. Advances in Aquaculture Hatchery Technology. Woodhead Publishing, Oxford.

Drillet, G., N.O.G. Jørgensen, T.F. Sørensen, H. Ramløv and B.W. Hansen. 2006. Biochemical and technical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. Aquaculture Research 37: 756-772.

Easwvaran, S.P., S. Bhassu, M.B.B. Maningas and R.Y. Othman. 2019. Enhanced muscle regeneration in freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* achieved through *in vivo* silencing of the myostatin gene. Journal of the world aquaculture society 50: 1026-1039.

Farhadian, O., F.M. Yusoff, S. Mohamed and C.R. Saad. 2009. Use of cyclopoid copepod *Apocyclops dengizicus* as live feed for *Penaeus monodon* postlarvae. Journal of the World Aquaculture Society 40: 22-32.

Jung, H., R.E. Lyons, D.A. Hurwood and P.B. Mather. 2013. Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. Reviews in Aquaculture 5: 77-110.

McEvoy, L.A., T. Naess, J.G. Bell and Ø. Lie. 1998. Lipid and fatty acid composition of normal and malpigmented Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) fed enriched *Artemia*: a comparison with fry fed wild copepods. Aquaculture 163: 237-250.

Nielsen, B.L.H., L. Gøtterup, T.S. Jørgensen, B.W. Hansen, L.H. Hansen, J. Mortensen and P.M. Jepsen. 2019. n-3 PUFA biosynthesis by the copepod *Apocyclops royi* documented using fatty acid profile analysis and gene expression analysis. Biology Open 8: bio038331.

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

Olivotto, I., I. Buttino, M. Borroni, C.C. Piccinetti, M.G. Malzone and O. Carnevali. 2008b. The use of the Mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii)* larviculture. Aquaculture 284: 211-216.

Øie, G.,T. Galloway, M. Sørøy, M.H. Hansen, I.A. Norheim, C.K. Halseth, M. Almli, M. Berg M.R., Gagnat, P.A. Wold, K. Attramadal, A. Hagemann, J.O. Evjemo and E. Kjørsvik. 2015. 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.

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

Patel, K. and H. Amthor. 2005. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade-new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. Neuromuscular Disorders 15: 117-126.

Qian, Z., X. Mi, X. Wang, S. He, Y. Liu, F. Hou, Q. Liu and X. Liu. 2013. cDNA cloning and expression analysis of myostatin/GDF11 in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology 165: 30-39.

Rajkumar, M. and K.P.K. Vasagam. 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.

Sun, B. and J.W. Fleeger. 1995. Sustained mass culture of *Amphiasacoides atopus* a marine harpacticoid copepod in a recirculating system. Aquaculture 136: 313-321.

Yan, Y., X. Lu, J. Kong, X. Meng, S. Luan, P. Dai and K. Luo. 2020. Molecular characterization of myostatin and its inhibitory function on myogenesis and muscle growth in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. Gene 758: 144986.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ฮับเซาะ มามะ
วัน เดือน ปี เกิด	14 กรกฎาคม 2539
สถานที่เกิด	สงขลา
วุฒิการศึกษา	ระดับปริญญาบัณฑิต สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร เกษตรศาสตร์ประมง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ที่อยู่ปัจจุบัน	38/11 หมู่ที่ 2 ตำบลกะลุวอเหนือ อำเภอเมืองนราธิวาส จังหวัดนราธิวาส รหัสไปรษณีย์ 96000
ผลงานตีพิมพ์	Mama, H., Charoensapsri, W., Amparyup, P., and Imjongjirak, C. 2022. Growth and Myostatin Gene Expression of Giant Freshwater Prawn (Macrobrachium rosenbergii) Larvae Fed Copepod Apocyclops royi. The 19th National Kasetsart University Kamphaeng Saen Conference, pp. 2600-2608. Nakhon Pathom.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY