การพัฒนาอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol เพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ในโรงเรือน

Development of 17β-Estradiol hormone Mixed Diets for Ovarian Maturation of the Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) Broodstock in Maturation Tank

รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ[1*] ธนัช เลิศพัฒนาไพบูรณ์[1] พัชธีราพร ทิพยพชรโรจน์[1] เสรี ดอนเหนือ[2] และสมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล[2,3]

Rachanimuk Hiransuchalert [1*], Thanut lertpattanapaiboon[1], puchteerapon tippachararoch[1], seri donnuea[2] and somkiat piyateratitivorakul[2,3]

[1]คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี จันทบุรี 22170

[2]ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล,

[3]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10300

*corresponding author e-mail: rachanimuk@buu.ac.th

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol ที่มีต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในระบบเพาะเลี้ยง โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุดการทดลอง คือ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (ชุดควบคุม), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน, กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 1 mg E2/kg และ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg E2/kg จากผลการทดลองพบว่า ฮอร์โมน 17β-estradiol มีผลต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในระบบเพาะเลี้ยง โดยเมื่อทำการทดลอง 35 วัน ค่าดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำในกุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน และกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 10 mg E2/kg สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ค่าดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำในกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 1 mg E2/kg ไม่มีความแตกต่างกับชุดการทดลองอื่น ($P>0.05$) ขนาดเส้นรอบวงเซลล์ไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตาและแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับฮอร์โมนมีขนาดใหญ่กว่าแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ ฮอร์โมน 17β-estradiol ยังมีผลต่อการสะสมไขมันในตับและตับอ่อน (hepatopancreas) ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติ อย่างไรก็ตาม การที่กุ้งมีการสังเคราะห์ และหลั่งเอ็นไซม์มากผิดปกติทำให้ B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย และส่งผลให้การสะสมไขมันใน R-cell มีปริมาณลดลง

คำสำคัญ : กุ้งกุลาดำ อาหารเม็ด ฮอร์โมน 17β-estradiol

Abstract

Predictable maturation and spawning of captive penaeid shrimp without eyestalk ablation is a long-term goal for the industry. The purpose of this study was to determine the impact of 17β-estradiol (E2) hormone mixed diets to the ovarian maturation of the *P. monodon* broodstock in maturation tank. The study was conducted in 35 days and divided into 4 treatments, i.e., control group (feeding shrimp with non-hormone diet), feeding eyestalk ablation shrimp with non-hormone diet, feeding shrimp with 1 and 10 mg E2/kg diets. The results showed that 17β-estradiol hormone affected on ovarian development of *P. monodon* broodstock in culture system. In 35 days, the GSI of eyestalk ablation shrimp fed with non-hormone diet and shrimp fed with 10 mg E2/kg diet were significantly higher than a control group ($P<0.05$). Perimeters of oocyte of eyestalk ablation shrimp and shrimp fed with both 1 and 10 mg E2/kg diets were significantly higher than control ($P<0.05$). In addition, the results from the histological study showed that 17β-estradiol hormone caused the increasing of lipid accumulation in hepatopancreas of *P.monodon* broodstock compared to a control group. These also caused the increasing of B-cells. However, in contrast, these caused the reducing of the lipid accumulation in R-cells.

Keywords: *Penaeus monodon*, broodstock, 17β-Estradiol, ovarian maturation, gonadosomatic index, histology

คำนำ

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) เป็นสัตว์น้ำประจำถิ่นของประเทศไทย รวมทั้งในประเทศแถบอินโด-แปซิฟิก อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำถือว่าเป็นกิจกรรมที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย อย่างไรก็ตามผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยเริ่มลดลงในปี พ.ศ. 2545 เนื่องจากเกิดการระบาดของโรคของกุ้งในฟาร์ม พ่อแม่พันธุ์ผลิตลูกกุ้งที่ไม่แข็งแรงส่งผลให้ขนาดของกุ้งกุลาดำเมื่อถึงกำหนดจับมีความหลากหลายและขนาดเล็ก เกษตรกรจึงหันมาเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) แทนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำแต่ราคาของกุ้งขาวแวนนาไมในท้องตลาดค่อนข้างต่ำและต้องนำเข้าพ่อแม่พันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์แล้วจากต่างประเทศ เช่น ฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมไม่ใช่กุ้งประจำถิ่นของประเทศไทย นอกจากนี้ ค่าแรงในการจ้างคนงานในประเทศไทยค่อนข้างสูงกว่าประเทศคู่แข่งอื่น เช่น ประเทศเวียดนามและจีน ซึ่งส่งผลต่อการแข่งขันในตลาดการส่งออก ในขณะที่ตลาดโลกยังมีความต้องการบริโภคกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่ซึ่งมีราคาสูง ดังนั้นอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำจึงยังเป็นที่สนใจ และดึงดูดใจให้เกษตรกรพยายามพัฒนาผลผลิตและการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ

โดยทั่วไปเกษตรกรเพาะพันธุ์ลูกกุ้งกุลาดำด้วยพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่จับจากธรรมชาติเนื่องจากให้อัตราการฟักและปริมาณตัวอ่อนที่แข็งแรงมากกว่าลูกกุ้งที่ผลิตจากพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำจากโรงเพาะเลี้ยง ซึ่งการปฏิบัติเช่นนี้จะส่งผลกระทบต่อขนาดประชากรของกุ้งกุลาดำในธรรมชาติ ดังนั้นการสร้างโปรแกรมการคัดพันธุ์ในกุ้งกุลาดำมีความจำเป็นอย่างมาก เพื่อให้สามารถพัฒนาระบบการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในลักษณะสัตว์เลี้ยง (Domestication) (Benzie, 1997; Ibarra *et al*., 2007) เป็นการลดการใช้ทรัพยากรธรรมชาติอย่างสิ้นเปลือง สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่แข็งแรง โตเร็ว และต้านทานโรคเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้อย่างยั่งยืน (Clifford and Preston, 2006)

ฮอร์โมน 17β-estradiol (E2) เป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ ที่สามารถชักนำให้เกิดกระบวนการไวเทลโลเจเนซีส (vitellogenesis) และการพัฒนารังไข่ในสัตว์ โดยฮอร์โมน 17β-estradiol เป็นสารที่พบในระยะต้นๆ ของการพัฒนารังไข่ของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม decapod crustaceans (Ghosh and Ray, 1993a) และยังมีโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนโพรเจสเตอโรนและฮอร์โมน 17-แอลฟา-ไฮดรอกซีโพรเจสเตอโรน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาไข่ในสัตว์กลุ่มครัสเตเชียนอีกด้วย (Yano, 1987; Quackenbush, 1992)

จากการศึกษาของ Quackenbush (1992) แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน 17β-estradiol ช่วยกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนไข่แดง (yolk protein) ในกุ้งขาวแวนนาไม แสดงให้เห็นว่าฮอร์โมน 17β-estradiol อาจกระตุ้นกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสในสิ่งมีชีวิตกลุ่มกุ้งปู (decapod crustaceans) ชนิดอื่นๆ ได้เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาในกุ้งคุรุม่า (*Marsupenaeus japonicus*) พบว่าฮอร์โมน 17β-estradiol เหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin) ในรังไข่ระยะ primary vitellogenesis ของรังไข่ของกุ้งด้วย (Yano and Hoshino, 2006) ซึ่งผลของฮอร์โมน 17β-estradiol ต่อการพัฒนารังไข่ของกุ้งกุลาดำในระบบเพาะเลี้ยงยังไม่มีรายงานการศึกษา

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมอาหารเม็ด

เตรียมอาหารเม็ดสำหรับเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (HUFA) มีปริมาณโปรตีนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ (Leelahanon, 2006) มีน้ำมันปลาและแอสต้าแซนทิน (astaxanthin) (Paibulkichakul *et al*., 2008) เป็นส่วนประกอบด้วย โดยบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรง แล้วนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันโดยการคลุกประมาณ 20 นาที จากนั้นละลายฮอร์โมน 17β-estradiol ด้วยเอทานอลและเจือจางด้วยน้ำที่ใช้ในการผสมอาหาร โดยเติมฮอร์โมน 17β-estradiol ในสัดส่วน 1 mg/kg และ 10 mg/kg ของอาหาร และมีอาหารที่ไม่เติมฮอร์โมน 17β-estradiol เป็นชุดควบคุม

นำวัตถุดิบที่ผสมทั้งหมดแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดปรับขนาดเม็ดอาหารผ่านเครื่องให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร และยาว 4 มิลลิเมตร จากนั้นนำอาหารที่อัดเม็ดเสร็จแล้วเข้าตู้อบไอน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วเข้าตู้อบแห้ง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วคัด

ขนาดอาหารอัดเม็ดที่ต้องการผ่านตะแกรงคัดขนาด บรรจุอาหารแต่ละขนาดใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณเถ้า ปริมาณเยื่อใย และปริมาณความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990)

2. การตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ในอาหารเม็ด

ตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ในอาหารเม็ดทั้ง 3 สูตร ที่ห้องปฏิบัติการเพื่อวิเคราะห์ฮอร์โมนในสัตว์ป่า สวนสัตว์เชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ โดยเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ด้วยวิธีการวิเคราะห์แบบ Competitive ELISA ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดี้ที่จำเพาะต่อฮอร์โมน 17β-Estradiol

3. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้กุ้งกุลาดำขนาดแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในศูนย์เพิ่มจำนวนกุ้งกลาดำ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี มีอายุ 14 เดือนและน้ำหนักตัวมากกว่า 60 กรัม เลี้ยงในถังไฟเบอร์ ความจุ 1,000 ลิตร โดยใช้กุ้งกุลาดำ 10 ตัวต่อชุดการทดลอง เลี้ยงในน้ำทะเลที่อุณหภูมิประมาณ 28±1 องศาเซลเซียส ความเค็ม 30 ppt มีการควบคุมแสงในระบบโดยจัดเวลาให้แสงเป็น 14:10 ของความมืด: แสงสว่าง โดยจะเปิดให้บ่อได้รับแสงช่วงเวลา 08.00-18.00 เปลี่ยนน้ำในบ่อทดลองประมาณ 50% ทุกสัปดาห์ เลี้ยงกุ้งในสภาวะดังกล่าวและให้อาหารทดลองชุดควบคุม เป็นเวลา 7 วันก่อนเริ่มการทดลอง ระยะเวลาในการทดลอง 35 วัน โดยให้อาหาร 3-5% ของน้ำหนักตัว วันละ 3 ครั้ง แบ่งการทดลองออกเป็น 4 การทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 คือ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 คือ กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน

ชุดการทดลองที่ 3 คือ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมนในสัดส่วน 1 mg/kg

ชุดการทดลองที่ 4 คือ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมนในสัดส่วน 10 mg/kg

4. การบันทึกผลการทดลอง

การทดลองที่ 1: การตรวจสอบการพัฒนาของรังไข่ของกุ้งกุลาดำ

ตรวจสอบการพัฒนาของรังไข่และแต่ละกลุ่มการทดลองทุกๆ 7 วัน โดยสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำซ้ำละ 2 ตัวในแต่ละชุดการทดลองมาผ่าเอารังไข่เพื่อบันทึกดัชนีรังไข่ (GSI, น้ำหนักรังไข่/น้ำหนักตัว x 100)

การทดลองที่ 2: การศึกษาการพัฒนาของเนื้อเยื่อรังไข่และตับและตับอ่อน

เก็บรังไข่ในส่วนของ lateral lobe ส่วนกลางบริเวณลำตัวตรงรอยต่อระหว่างปล้องที่ 1 และ 2 และเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เป็นชิ้นเล็กหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตรเพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยแช่ชิ้นส่วนของรังไข่และตับและตับอ่อนในน้ำยา (Modified Davison's Fixative) ประมาณ 16-24 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างด้วยแอลกอฮอล์ 50% จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 20 นาที จากนั้นนำไป Embedded ด้วยพาราฟิน จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปตัดเป็นชิ้นบางๆ หนาประมาณ 6 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome)

และย้อมสีด้วย Hematoxylin และ Eosin (Humason, 1979) ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงวัดขนาดเซลล์ไข่โดยใช้เส้นรอบวงของเซลล์ไข่กุ้งกุลาดำแต่ละชุดการทดลอง โดยสุ่มวัดขนาดเซลล์ไข่จำนวน 20 เซลล์ต่อซ้ำของการทดลอง (n = 60)

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการบันทึกค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ น้ำหนักรังไข่ ขนาดเซลล์ไข่ เส้นผ่านศูนย์กลางและเส้นรอบวงของเซลล์ มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองโดย One-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Post Hoc Test ตามวิธีของ Duncan's new multiple range test ที่ระดับค่าความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชั่น 17.0

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของการวิเคราะห์อาหารด้วยวิธี proximate analysis ในอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol

จากผลของการวิเคราะห์อาหารด้วยวิธี proximate analysis จากอาหารทั้งหมด 3 ชุดการทดลอง คือ อาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน 17β-estradiol, อาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol ความเข้มข้น 1 mg/kg และ 10 mg/kg ได้ผลดัง Table 1 โดยมีปริมาณโปรตีน 45.91-47.01% ปริมาณไขมัน 14.11-18.21% ปริมาณความชื้น 6.86-12.60% ปริมาณเถ้า 11.83-13.03% ปริมาณเยื่อใย 0.88-1.30% ปริมาณอินทรีย์วัตถุ 75.54-84.24% และปริมาณวัตถุแห้ง 87.38-93.13%

Bunyaratphalin (2004) รายงานว่าในอาหารแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำนั้นต้องการโปรตีนในอาหารที่ระดับ 50-55% ไขมันในอาหารกุ้งกุลาดำควรอยู่ระหว่าง 5-10% และในจำนวนไขมันดังกล่าวควรมีกรดไขมัน Omega-3 HUFA 0.5-1.0% phospholipids 1.2-1.5% lecitin 2% และคอเรสเตอรอล 0.2-0.5%

Table 1 Nutrition composition of diets of each experiment using proximate analysis

Treatment	Nutrient (%)						
	Crude protein	Crude fat	Moisture	Ash	Crude fiber	Organic matter	Dry matter
Control diet	45.91	17.54	12.60	11.83	0.88	75.54	87.38
1 mg E2/kg diet	45.99	14.11	6.86	13.03	0.94	80.09	93.13
10 mg E2/kg diet	47.01	18.21	7.63	12.18	1.30	84.24	92.36

2. การวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ในอาหารเม็ด

จากการตรวจปริมาณฮอร์โมน17β-Estradiol ผลการวิเคราะห์ไม่พบฮอร์โมนในตัวอย่างอาหารชุดควบคุม ส่วนอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 mg/kg ของอาหาร พบว่ามีฮอร์โมน 17β-Estradiol

ในอาหาร 0.299 mg/kg ของอาหาร และอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 10 mg/kg ของอาหาร พบว่ามีฮอร์โมน 17β-Estradiol ในอาหาร 4.090 mg/kg ของอาหาร (Table 2)

Table 2 Concentration of 17β-Estradiol hormone in diets of each experiment

Treatment	Added concentration (mg/kg diet)	Actual concentration (mg/kg diet)
Control diet	0.000	0.000
1 mg E2/kg diet	1.000	0.299
10 mg E2/kg diet	10.000	4.090

งานวิจัยนี้ ตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ด้วยวิธี competitive ELISA ซึ่งเป็นทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Enzyme immunoassay แบบ Competitive ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ตามกระบวนการของ Brown and Steinman (2004) ซึ่งเทคนิคการตรวจแบบ ELISA มีหลักการโดยสรุปคือ การเคลือบพื้นผิวของแผ่นเพลท (polystyrene microtiter plate) ด้วยแอนติบอดี้ (antibody) ที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen) ที่ต้องการตรวจหาในสารตัวอย่าง ซึ่งจะถูกเติมลงไปพร้อมกับแอนติเจนที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์คอนจูเกต (enzyme conjugate) โดยทั้งคู่จะแย่งกันลงไปจับกับแอนติบอดี้ที่เคลือบผิวเอาไว้ ซึ่งจะขึ้นอยู่กับจำนวนฮอร์โมน เช่น ถ้าตัวอย่างมีฮอร์โมนมากกว่าก็จะจับกับแอนติบอดีได้มากกว่า และเมื่อเติมสารตั้งต้น (substrate) ก็จะได้สีที่เข้มต่างกันตามจำนวนของแอนติเจนและคอนจูเกต ซึ่งสามารถทำการตรวจวัดได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงหาตัวฮอร์โมนหรือแอนติเจนภายในตัวอย่างอาหาร โดยผลของการวิเคราะห์จะออกมาอย่างแม่นยำและชัดเจน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณฮอร์โมน 17β-Estradiol ที่มีอยู่ในอาหารที่ทำการทดลอง มีการสูญเสียไปในกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา โดยอาจสูญเสียปริมาณฮอร์โมนในระหว่างขั้นตอนการทำแห้งของเม็ดอาหารด้วยการอบผ่านความร้อน ซึ่งจะทำให้ฮอร์โมนสลายเนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการอบอาหาร และในขั้นตอนการเก็บรักษาอาหารอาจมีผลต่อการเสื่อมสลายของฮอร์โมน เนื่องจากฮอร์โมน 17β-Estradiol เป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ซึ่งมีความไวต่อแสงและความร้อน การเก็บอาหารในภาชนะที่ไม่ทึบแสงเพียงพอ อาจมีผลต่อการเสื่อมสลายของฮอร์โมนได้ (Budavari, 1996)

3. ผลของอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol ต่อการพัฒนาของระยะรังไข่ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาน้ำหนักรังไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง คือ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน (ชุดควบคุม), กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน, กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 mg/kg และ กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 10 mg/kg พบว่า รังไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในชุดทดลองเป็นเวลา 7 วัน มีน้ำหนัก 0.47±0.07 กรัม, 0.50±0.18 กรัม,

0.46±0.19 กรัม และ 0.52±0.10 กรัม ตามลำดับ (Fig. 1a) รังไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในชุดทดลองเป็นเวลา 14 วัน มีน้ำหนัก 0.39±0.17 กรัม, 0.44±0.05 กรัม, 0.55±0.08 กรัม และ 0.54±0.13 กรัม ตามลำดับ (Fig. 1b) รังไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในชุดทดลองเป็นเวลา 28 วัน มีน้ำหนัก 0.41±0.10 กรัม, 0.52±0.21 กรัม, 0.39±0.12 กรัม และ 0.55±0.09 กรัม ตามลำดับ (Fig. 1c) รังไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง ที่เลี้ยงในชุดทดลองเป็นเวลา 35 วัน มีน้ำหนัก 0.36±0.08 กรัม, 0.61±0.23 กรัม, 0.51±0.17 กรัม และ 0.58±0.22 กรัมตามลำดับ (Fig. 1d)

เมื่อนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ พบว่าในแต่ละชุดการทดลองในวันที่ 7 มีค่า 0.76±0.14 %, 0.70±0.17 %, 0.70±0.28 % และ 0.73±0.14 % ตามลำดับ (Fig. 2a) ในวันที่ 14 มีค่า 0.57±0.20 %, 0.67±0.06 %, 0.79±0.16 % และ0.76±0.15 % ตามลำดับ (Fig. 2b) ในวันที่ 28 มีค่าระหว่าง 0.61±0.13 % , 0.76±0.20 % , 0.58±0.13 % และ 0.78±0.14 % ตามลำดับ (Fig. 2c) ในวันที่ 35 มีค่าระหว่าง 0.57±0.10 % , 0.89±0.18 % , 0.72±0.20 % และ 0.89±0.36 % ตามลำดับ (Fig. 2d)

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยทดสอบทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% พบว่า ค่าเฉลี่ยดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลองในวันที่ 7, 14 และ 28 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนในวันที่ 35 พบว่าค่าดัชนีรังไข่กุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน และกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 10 mg/kg สูงกว่ากุ้งชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ค่าดัชนีรังไข่กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 mg/kg ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น (Fig. 1 และ 2)

Quinitio *et al*. (1994) ตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol และฮอร์โมนโพรเจสเทอโรนในฮีโมลิมฟ์ รังไข่ และตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำเพศเมียในโรงเรือน พบปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol ในฮีโมลิมฟ์ของกุ้งรังไข่ระยะคอร์ติคอลรอดเท่านั้น ส่วนในรังไข่มีปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol ใกล้เคียงกันตั้งแต่ระยะไวเทลโลเจนิกจนถึงระยะหลังวางไข่ ส่วนปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol ในตับและตับอ่อนพบมากที่สุดในกุ้งที่มีรังไข่ระยะคอร์ติคอลรอด จากความสัมพันธ์ระหว่างระดับฮอร์โมนและระยะการพัฒนารังไข่นี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า ฮอร์โมนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการไวเทลโลเจเนซีสและการผลิตไวเทลโลเจนินในกุ้ง (Quinitio *et al*., 1991; Ghosh and Ray, 1993a,b)

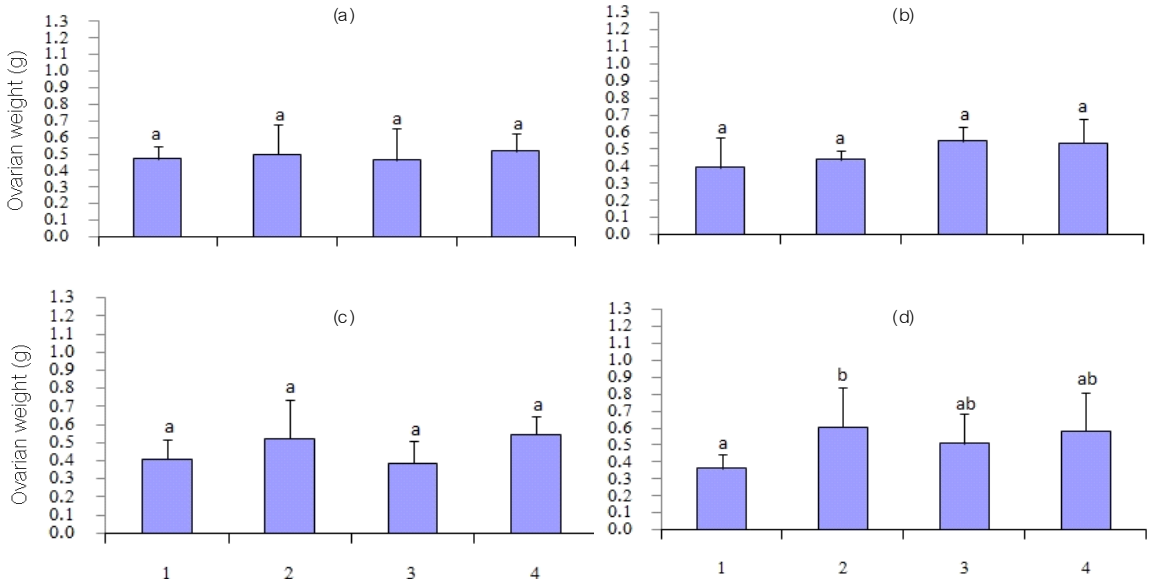

Fig. 1 Ovarian weight (Mean±standard deviation) of *P. monodon* broodstock in (a) day 7, (b) day 14, (c) day 28 and (d) day 35 of each treatment, respectively. 1 = control group, 2 = feeding eyestalk ablated shrimp with non-hormone diet, 3 = feeding shrimp with 1 mg E2/kg diet and 4 = feeding shrimp with 10 E2/kg diet.

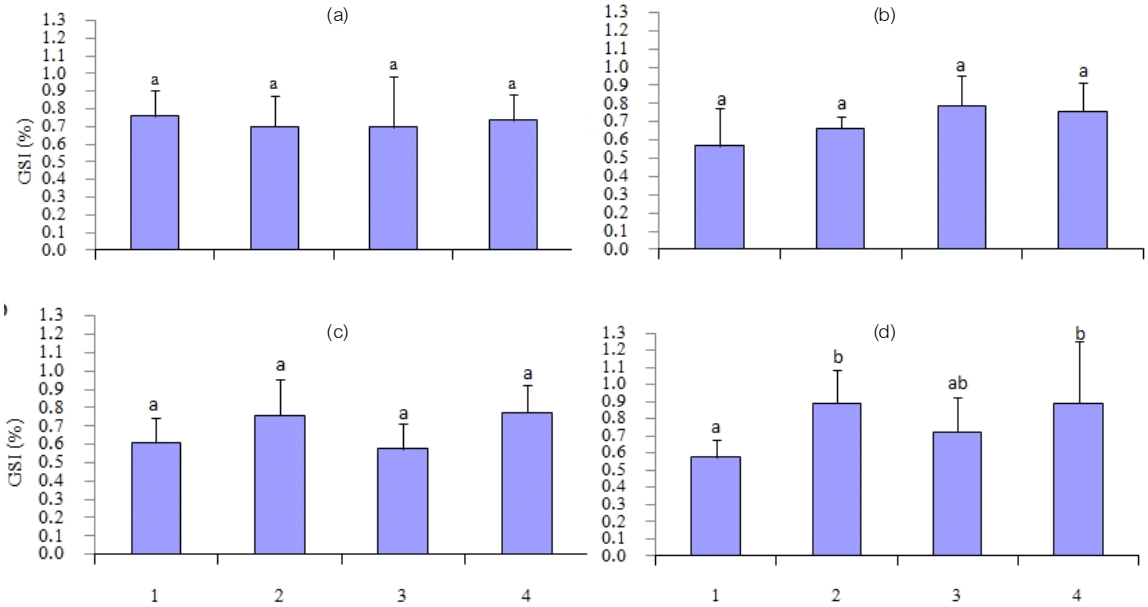

Fig. 2 Gonadosomatic index (GSI) (Mean±standard deviation) of *P. monodon* broodstock in (a) day 7, (b) day 14, (c) day 28 and (d) day 35 of each treatment, respectively. 1 = control group, 2 = feeding eyestalk ablated shrimp with non-hormone diet, 3 = feeding shrimp with 1 mg E2/kg diet and 4 = feeding shrimp with 10 E2/kg diet.

4. ขนาดเซลล์ไข่ของกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาขนาดของเซลล์ไข่ของกุ้งกุลาดำทั้ง 4 ชุดการทดลองโดยการวัดค่าเส้นรอบวงของเซลล์ไข่ที่เลี้ยงเป็นเวลา 35 วัน พบว่ามีค่าเฉลี่ยเป็น 5.97±1.39 μm, 7.84±3.01 μm, 8.72±3.13 μm และ 7.12±3.49 μm ตามลำดับ เมื่อนำมาทดสอบทางสถิติพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 mg/kg มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม และกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 10 mg/kg อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดย กุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 และ 10 mg/kg ($P>0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Fig. 3)

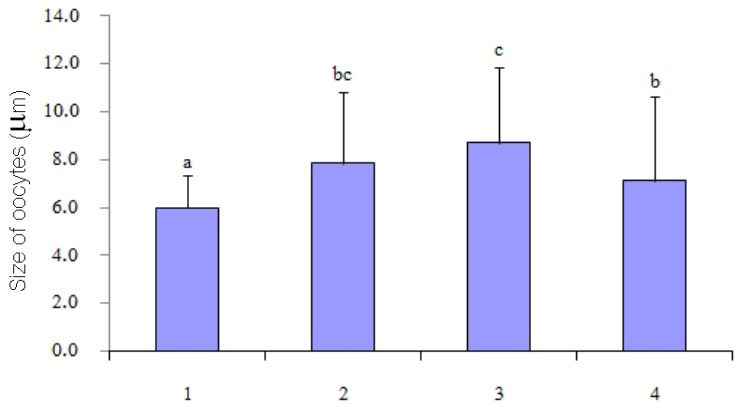

Fig. 3 Size of oocytes (Mean±standard deviation) of *P. monodon* broodstock in day 35 of the experiment. 1 = control group, 2 = feeding eyestalk ablated shrimp with non-hormone diet, 3 = feeding shrimp with 1 mg E2/kg diet and 4 = feeding shrimp with 10 E2/kg diet.

จากการทดลองพบว่าเซลล์ไข่ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับฮอร์โมนมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ไข่ของกุ้งกุลาดำที่ไม่ได้รับฮอร์โมน และมีขนาดใหญ่ไม่แตกต่างกับกุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตา ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าฮอร์โมน 17β-estradiol มีผลต่อการพัฒนาขนาดเซลล์ไข่ของกุ้งกุลาดำ Kongklai (2010) ได้ศึกษารูปแบบของการพัฒนารังไข่กุ้งกุลาดำ โดยเปรียบเทียบลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาระหว่างเซลล์ไข่ของกุ้งปกติและกุ้งที่ถูกตัดตา พบว่าขนาดเซลล์ไข่ของกุ้งปกติมีขนาดใกล้เคียงกับกุ้งที่ถูกตัดตาในระยะที่ 1 แต่ในระยะที่ 2-4 มีขนาดเล็กกว่ากุ้งที่ถูกตัดตา แสดงให้เห็นว่าการตัดตามีผลต่อการกระตุ้นการพัฒนารังไข่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองนี้ที่ขนาดเซลล์ไข่ของกุ้งที่ถูกตัดตามีขนาดใหญ่กว่ากุ้งปกติ และมีขนาดใหญ่ไม่แตกต่างกับกุ้งที่ได้รับฮอร์โมน

5. ลักษณะเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำ

เมื่อศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลอง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำในชุดควบคุมมีขนาดช่องว่างท่อตับและตับอ่อนเป็นปกติ และไม่พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุทั้ง 3 ชนิดคือ เซลล์เยื่อบุชนิด B-cell, R-cell และ F-cell (Fig. 4a) ส่วนกุ้งที่ถูกตัดตา 1 ข้าง และได้รับอาหารเม็ดไม่ผสมฮอร์โมนมีขนาดช่องว่างท่อตับและตับอ่อนเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น ไม่พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุทั้ง 3 ชนิด R-cell มีขนาดเล็กลง และ B-cell มีขนาดเล็กลงและมีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 50% (Fig. 4b) กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-Estradiol 1 และ 10 mg/kg มีขนาดช่องว่างท่อตับและตับอ่อนเปลี่ยนแปลงไป และมีขนาดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ไม่พบการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุทั้ง 3 ชนิด และ B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นประมาณ 10% (Fig. 4c และ 4d)

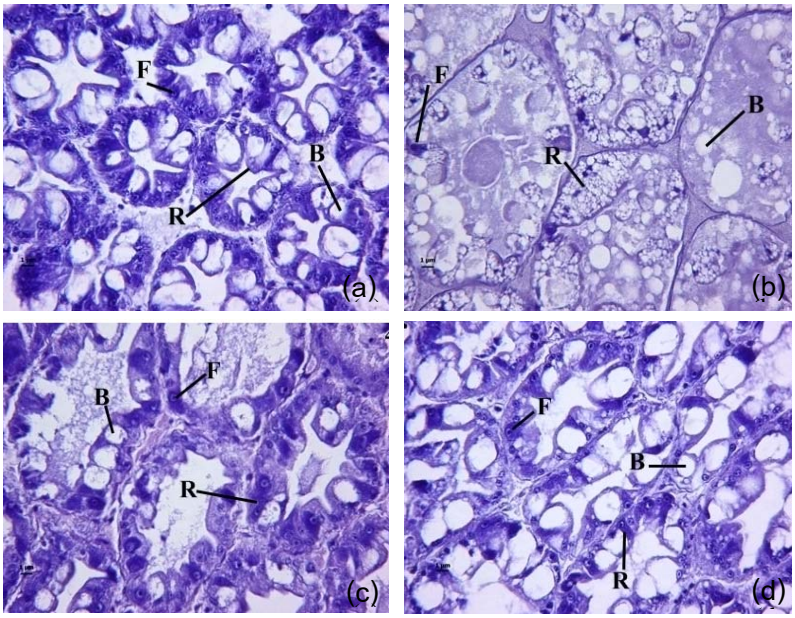

Fig. 4 Histological patterns classified by a conventional hematoxylin/eosin staining of hepatopancreas of *P. monodon* broodstock. (a) = control group, (b) = feeding eyestalk ablated shrimp with non-hormone diet, (c) = feeding shrimp with 1 mg E2/kg diet and (d) = feeding shrimp with 10 E2/kg diet.

ตับและตับอ่อน มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมระบบการเผาผลาญอาหารภายในร่างกาย นอกจากทำหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งเอ็นไซม์เพื่อช่วยในการย่อยและการดูดซึมแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บและกำจัดสารพิษอีกด้วย บริเวณตับและตับอ่อนพบเซลล์บุผนังท่อ 4 ชนิด คือ E-cell, B-cell, R-cell และ F-cell ซึ่งลักษณะโครงสร้าง จำนวน และตำแหน่งของเซลล์ตับและตับอ่อนมีความแตกต่างกัน กุ้งที่แข็งแรงพบ R-cell มากที่สุด เนื่องจากเป็นเซลล์ขนาดใหญ่และมีไขมันในไซโตพลาสซึมมาก B-cell พบค่อนข้างน้อย

ส่วน F-cell พบกระจายเกือบตลอดความยาวของท่อ กุ้งที่ไม่สมบูรณ์ R-cell มีขนาดเล็กลง B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย และพบที่จุดเริ่มต้นของท่อด้วย ส่วน F-cell ไม่เปลี่ยนแปลง ถ้ากุ้งอดอาหารนานๆ มักไม่พบไขมันใน R-cell และ F-cell มีขนาดเล็กลง ขณะที่ B-cell พบมากที่สุด (Dhebtharanont, 1997)

จากการศึกษาเซลล์ตับและตับอ่อนของกุ้งกุลาดำในชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลอง พบว่ากุ้งที่ได้รับฮอร์โมนและกุ้งที่ถูกตัดตาพบ B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และในกุ้งที่ถูกตัดตายังพบ R-cell มีขนาดเล็กลงเมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งปกติที่ไม่ได้ฮอร์โมน แสดงให้เห็นว่าเมื่อกุ้งได้รับฮอร์โมน 17β-estradiol จะทำให้มีการสร้าง B-cell มากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการทำงานที่ผิดปกติของร่างกายทำให้กุ้งมีการสังเคราะห์ และหลั่งเอ็นไซม์มากผิดปกติ ส่วนกุ้งที่ถูกตัดตานั้นทำให้เกิดสภาวะเครียด จึงไม่กินอาหารและเกิดความไม่สมดุลของกลไกการผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนารังไข่ และรอบการลอกคราบในร่างกาย ส่งผลให้ B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นและ R-cell มีขนาดเล็กลง ซึ่งจากผลการทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าฮอร์โมน 17β-estradiol มีผลต่อการสะสมไขมันในตับและตับอ่อนในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตับและตับอ่อนของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติ แต่การที่กุ้งมีการสังเคราะห์ และหลั่งเอ็นไซม์มากผิดปกติทำให้ B-cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นด้วย และส่งผลให้การสะสมไขมันใน R-cell มีปริมาณลดลง

สรุปผลการทดลอง

ฮอร์โมน 17β-estradiol มีผลต่อการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในระบบเพาะเลี้ยง และมีผลไม่แตกต่างกับการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตา โดยมีเปอร์เซ็นต์ดัชนีรังไข่ และขนาดเซลล์ไข่สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งกุลาดำที่ถูกตัดตา นอกจากนี้ ฮอร์โมน 17β-estradiol มีผลต่อการสะสมไขมันในตับและตับอ่อน ในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตับและตับอ่อน ของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่กินอาหารปกติ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ในการใช้อาหารเม็ดผสมฮอร์โมน 17β-estradiol เพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ของกุ้งทดแทนการตัดตาได้ ช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำและผลิตลูกกุ้งได้ตามความต้องการ อย่างไรก็ตาม ควรมีการทดลองเพิ่มเติมโดยมีระยะเวลาในการทดลองที่มากขึ้น แล้วผสมพันธุ์กุ้งกุลาดำจากการทดลองในชุดต่างๆ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการผลิตลูกพันธุ์กุ้งกุลาดำ และควรวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน 17β-estradiol ในเลือดของกุ้งกุลาดำแต่ละชุดการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนการผลิตผลงานวิจัย คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา ปีงบประมาณ 2555

เอกสารอ้างอิง

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA, 770-771.

Benzie, J. A. H. 1997. A review of the effect of genetics and environment on the maturation and larval quality of the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. Aquaculture. 155 : 69-85.

Brown, J. L. and Steinman, K. 2004. Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species. 2nd edition. Smithsonian institution, USA.

Budavari, S. 1996. The Merck Index - Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals. 12th edition. Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, USA. 1175 pp.

Bunyaratphalin, M. 2004. Research in shrimp feeds for product safety, less contaminants and friendly environment. National Research Council of Thailand, Bangkok. 334 pp. [in Thai]

Clifford, H. C. and Preston, N. P. 2006. Genetic improvement; in Operating Procedures for Shrimp Farming: Global Shrimp OP Survey Results and Recommendations. Global Aquaculture Alliance, St. Louis, USA. 73-77.

Ghosh, D. and Ray, A. K. 1993a. Subcellular action of estradiol-17β in a freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Gen.Comp. Endocrinol. 90: 274-281.

Ghosh, D. and Ray, A. K. 1993b. 17β-hydroxysteroid dehydrogenase activity of ovary and hepatopancreas of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: relation to ovarian condition and estrogen treatment. Gen. Comp. Endocrinol. 89: 248–254.

Humason, G' L. 1979. Animal Tissue Techniques. 4th Edtion. W. H. Freeman, and Co., San Francisco.

Ibarra, A. M., Racotta, I. S., Arcos, F. G. and Palacios E. 2007. Progression the genetics of reproductive performance in Penaeid shrimp. Aquaculture. 268: 23-43.

Kongklai, R. 2010. Ovarian development profiles of giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. Bachelor of Science thesis, Faculty of Marine Technology, Burapha University, Chanthaburi, 63 pp. [in Thai]

Leelahanon, P. 2006. High polyunsaturated fatty acids feed development for maturation of female black tiger shimp *Penaeus monodon.* Master of Science thesis, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok. 92 pp. [in Thai]

Paibulkichakul, C., Piyatiratitivorakul, S., Sorgeloos, P. and Menasveta, P. 2008. Improved maturation of pond-reared, black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) using fish oil and astaxanthin feed supplements. Aquaculture. 282: 83-89.

Quackenbush, L. S. 1992. Yolk synthesis in the marine shrimp, *Penaeus vannamei*. Comp. Biochem. Physiol. 103: 711-714.

Quinitio, E. T., Yamauchi, K., Hara, A. and Fuji, A. 1991. Profiles of progesterone and estradiol-like substances in the hemolymph of female *Pandalus kessleri* during an annual reproductive cycle. *Gen. Comp.* Endocrinol. 81: 343–348.

Quinitio, E. T., Hara, A., Yamauchi, K. and Nakao, S. 1994. Changes in the steroid hormone and vitellogenin levels during the gametogenic cycle of the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comp.* Biochem. Physiol. *C*. 109: 21–26.

Yano, I. 1987. Effect of 17-beta-hydroxyprogesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Aquaculture. 61: 49-57.

Yano, I. and Hoshino, R. 2006. Effects of 17β-estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*). *Comp.* Biochem. Physiol. *A*. 144: 18-23.

Dhebtharanont, Y. 1997. Vaccines for tiger prawn and other shrimps in the Genus Penaeus: Concepts, details of vaccine with the connection of immune system, and the results of applications on tiger prawn (*Penaeus monodon*, Fabricius), Department of Fisheries, Samutsakorn. 570 pp. [in Thai]