การแสดงออกของยีน vitellogenin และยีน fatty acid binding protein ของกุ้งขาวเพศเมีย (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) ที่เลี้ยงด้วยอาหารชนิดต่าง ๆ

Expression of vitellogenin gene and fatty acid binding protein gene of female Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) fed different diets

ธนากรณ์ เมฆกลิ่น[1] นพวรรณ ฉิ้มสังข์[1,*] สถาพร ดิเรกบุษราคม[1] และสุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวี[1]

Thanakorn Mekklin[1] Noppawan Chimsung[1,*] Sataporn Direkbusarakom[1]

and Suwit Wuthisuthimethavee[1]

[1]ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านกุ้ง สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161

[1] Research Center of Excellence for Shrimp, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat 80161, Thailand

*Corresponding author: noppawan@wu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบผลของอาหารต่อการพัฒนารังไข่และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไม โดยขุนแม่กุ้งขาวที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 28-41 กรัม ด้วยอาหารทดลอง 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วยอาหารสูตรที่ 1(อาหารสด ได้แก่ หมึกและหอยแครงในอัตราส่วน 2:1) อาหารสูตรที่ 2 (อาหารเม็ดสำเร็จรูปพัฒนาระบบสืบพันธุ์แม่กุ้ง ผลิตโดยศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์) อาหารสูตรที่ 3 (อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่นที่จำหน่ายตามท้องตลาด) และอาหารสูตรที่ 4 (อาหารสูตรที่ 3 เสริมสารสกัดหัวกุ้ง 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร) จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่า อาหารสูตรที่ 2 มีค่าโปรตีน 52.37 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 12.17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งอยู่ในระดับสูงกว่าอาหารสูตรอื่น และในอาหารสูตรที่ 3 อาหารกุ้งระยะรุ่นมีค่าต่ำสุด โดยมีโปรตีน 43.68 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 6.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง จากการใช้อาหารทดลองเลี้ยงแม่กุ้งเป็นระยะเวลา 50 วัน พบว่าค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index, GSI) ของแม่กุ้งขาวไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน vitellogenin พบว่ามีการแสดงออกสูงสุดในแม่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ในขณะที่ยีน fatty acid binding protein (FABP) มีการแสดงออกสูงสุดในแม่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแม่กุ้งที่ได้รับอาหารสูตรอื่น ($p<0.05$) เมื่อวิเคราะห์หาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของค่าไขมันและโปรตีนในอาหารทดลองพบว่า มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน FABP มากที่สุด การศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่า การแสดงออกของยีนของแม่กุ้งขาวมีความสัมพันธ์กับคุณค่าทางโภชนาการของอาหาร ซึ่งการแสดงออกของยีน FABP มีความสัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนและไขมันในอาหารมากกว่ายีน vitellogenin

คำสำคัญ : แม่กุ้งขาว อาหารแม่พันธุ์ *Litopenaeus vannamei,* fatty acid binding protein gene, vitellogenin gene

Abstract

The study on effect of diet on the reproductive development and gene expression of female pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) were performed. Female shrimps initial weight 28-41 g were fed with four different diets, consist of diet 1 (fresh feed; squid and mussels in a ratio of 2:1); Diet 2 (reproductive compound diet produced by Research Center of Excellence for Shrimp, Walailak University); Diet 3 (commercial compound diet for juvenile shrimp) and Diet 4 (Diet 3 supplemented with shrimp head extracted at 55%, w/w). The nutritional composition of diets indicated that diet 2 contained 52.37% protein and 12.17% lipid which was higher than other diets, while diet 3 contained lowest protein and lipid (43.68% and 6.72%, respectively). After 50 days of feeding trial, we found that Gonadosomatic index (GSI) was not significantly different among shrimp fed different diets. The expression of vitellogenin gene and fatty acid binding protein (FABP) gene were determined from ovary tissue using qRT-PCR. The gene expression results showed that vitellogenin gene was highest expressed in shrimp fed diet 1 whereas fatty acid binding protein (FABP) gene was highest expressed in shrimp which was fed with diet 2 ($p<0.05$). The correlation coefficient between gene expression and diet nutritional content indicated that the expression level of FABP gene was highly correlated to dietary lipid and protein level. In conclusion, molecular response in female reproductive system, either vitellogenin gene or FABP gene showed expression level related to nutrition of diet. However, expression of FABP gene was higher related to dietary protein and lipid level than that of vitellogenin gene.

Keywords: female pacific white shrimp broodstock, *Litopenaeus vannamei* diet, fatty acid binding protein gene, vitellogenin gene

คำนำ

กระบวนการพัฒนารังไข่ของกุ้ง เรียกว่ากระบวนการไวเทลโลจีนีซีส (vitellogenesis) เป็นการนำสารอาหารกลุ่มโปรตีนจากแฮพพาโตเพนเครียส (hepatopancrease) ซึ่งเป็นอวัยวะสะสมสารอาหารในกุ้ง มาสะสมไว้ในเซลล์ไข่ รวมทั้งแคโรทีนอยด์ (carotenoids) แซคคาไรด์ (saccharide) และไขมัน โดยมีโปรตีน ไวเทลโลจีนินเป็นตัวพาสารอาหารผ่านทางเลือด (hemolymph) (Quackenbush, 2001) และมีโปรตีนที่ทำหน้าที่รับไวเทลโลจีนิน (vitellogenin receptor) จากเลือดเข้าสู่เซลล์ไข่ (Tiu *et al*., 2008) กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนจากต่อมไร้ท่อ โดยปกติกุ้งจะมี vitellogenesis-inhibiting hormone (VIH/GIH) ที่หลั่งมาจากเซลล์ประสาทบริเวณก้านตากุ้ง ซึ่งมีทำหน้าที่ยับยั้งการผลิตไวเทลโลจีนินจากแฮพพาโตเพนเครียสเพื่อไม่ให้เกิดการพัฒนาของรังไข่ แต่หากกุ้งมีความสมบูรณ์ทั้งภายในตัวและสิ่งแวดล้อมจะมี vitellogenesis-stimulating hormone (VSH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนจากระบบประสาทส่วนกลาง มีหน้าที่กระตุ้นการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และการผลิตไวเทลโลเจนินจากแฮพพาโตเพนเครียส กระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยยีนไวเทลโลจีนิน

ทั้งนี้การแสดงของยีนนี้ในระยะต่างๆ ของการพัฒนาของรังไข่ จะมีความแตกต่างกัน (Hiransuchalert, 2013) มีรายงานว่าในกุ้งคุรุม่า (*Marsupeneaus japonicas*) ไข่ระยะพรีไวเทลโลจีนิก (previtellogenic stage) ไม่พบการแสดงออกแต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการพัฒนารังไข่ระยะไวเทลโลเจนิน (vitellogenin stage) (Tsutsui *et al*., 2000) ซึ่งสารอาหารที่กุ้งได้รับส่งผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง (Woulters *et al*., 2001) ตัวอย่างเช่น ระดับและคุณภาพของไขมันในอาหาร มีผลต่อการพัฒนารังไข่และคุณภาพของไข่ เนื่องจากไขมันเป็นสารตั้งต้นของการสร้างฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน ซึ่งมีหน้าที่ในการสะสมไข่แดง (Meunpol *et al*., 2005) โดยมียีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน คือ fatty acid synthase gene, fatty acid elongase gene และ fatty acid binding protein (FABP) gene (Soderhall *et al*., 2006) ทั้งนี้มีรายงานว่า การแสดงออกของยีน FABP มีระดับที่แตกต่างกันในระยะต่างๆ ของการพัฒนาของรังไข่ โดยลักษณะจำเพาะของ FABP เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กประมาณ 14-15 kDa อยู่ในไซโตพลาสซึม และโมเลกุลจะจับกับกรดไขมัน ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณ ทำให้ยีน FABP ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน (Cheng *et al*., 2013) จากข้อมูลบ่งชี้ว่า สารอาหารมีความสำคัญต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ การทดลองประเมินคุณภาพอาหารจากการนับแม่กุ้งที่สร้างไข่หรือจำนวนไข่ อาจต้องใช้เวลานาน ในขณะที่การศึกษาการแสดงออกของยีนจะเป็นอีกวิธีการที่ให้ผลเร็วกว่า ซึ่งเหล่านี้จะนำมาสู่การเลือกใช้อาหารให้ตรงกับความต้องการของแม่กุ้งขาวต่อไป

การวิจัยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาถึงโภชนาการของอาหารที่แม่กุ้งขาวได้รับ ต่อการแสดงออกของยีน vitellogenin และยีน fatty acid binding protein รวมทั้งค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศของแม่กุ้งขาวที่ได้รับอาหารสูตรต่างๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design, CRD) ให้แม่กุ้งขาวกินอาหารทดลอง 4 สูตร สูตรละ 3 ซ้ำ และใช้แม่กุ้งขาวจำนวน 3 ตัวต่อซ้ำ ดังนี้

อาหารสูตรที่ 1 อาหารสด ได้แก่ หมึกกล้วย และ หอยแครง ในอัตราส่วน 2:1

อาหารสูตรที่ 2 อาหารเม็ดสำเร็จรูปพัฒนาระบบสืบพันธุ์ ผลิตโดยศูนย์วิจัยความเป็นเลิศด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

อาหารสูตรที่ 3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่นที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด

อาหารสูตรที่ 4 อาหารสูตรที่ 3 เสริมสารสกัดหัวกุ้ง 55 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารสดเตรียมโดยนำหมึกกล้วยสดมาหั่นให้มีขนาดประมาณ 2x2 เซนติเมตร ส่วนหอยแครงแยกเอาเนื้อ จากนั้นเก็บในถุงพลาสติกแบบซิปล็อค คำนวณปริมาณตามความต้องการของแม่กุ้งในแต่ละมื้อ และเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

อาหารสูตรที่ 3 เตรียมโดยนำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น เบอร์ 3 ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด มาอัดเม็ดใหม่เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะสมกับการจับกินของแม่กุ้ง เนื่องจากอาหารกุ้งระยะนี้มีขนาดเล็ก โดยนำอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่นเบอร์ 3 มาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดแฮมเมอร์มิลล์ จากนั้นนำไปผสมกับวิตามินพรีมิกซ์ ในปริมาณครึ่งหนึ่งของคำแนะนำข้างฉลาก อัดเม็ดผ่านเครื่องอัดเม็ดอาหารที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของหน้าแว่น 4 มิลลิเมตร อบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง

อาหารสูตรที่ 4 เตรียมสารสกัดจากหัวกุ้งตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Binson (2007) เสริมสารสกัดหัวกุ้งให้กับอาหารสูตรที่ 3 โดยนำเม็ดอาหาร 100 กรัม กับสารสกัดหัวกุ้ง 55 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากันและนำไปอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทั้งนี้ระดับการเสริมสารสกัดหัวกุ้ง ได้คำนวณให้มีค่าของโปรตีน และไขมัน ในระดับที่ใกล้เคียงกับอาหารสูตรที่ 2 ทั้งนี้ต้นทุนค่าอาหารแต่ละสูตรมีความแตกต่างกัน โดยอาหารสูตรที่ 2 มีราคาสูงสุด การเสริมสารสกัดจากหัวกุ้งจะเพิ่มต้นทุนค่าอาหารให้สูงขึ้น จาก 44.08 บาท/กิโลกรัม เป็น 52.25 บาท/กิโลกรัม (Table 1)

Table 1 Cost of experimental diet per kilogram (kg)

Type of diet	Cost (baht)/kg
Diet 1	125.00
Diet 2	750.00
Diet 3	44.08
Diet 4	52.25
Shrimp head extracted	15.00

การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

อาหารทดลองทุกสูตรวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ ความชื้นและเถ้า ตามวิธี AOAC (1990) โปรตีน โดยเครื่อง C/N combustion รุ่น TRU SPEC®Combution, USA ไขมัน ดัดแปลงจากวิธีการของ Bligh and Dyer (1959) แคโรทีนอยด์ ตามวิธีการของ Sachindra *et al*. (2006)

การทดลองเลี้ยงแม่กุ้งขาว

เตรียมแม่กุ้งขาว ที่มาจากครอบครัวเดียวกัน ซึ่งมีน้ำหนักเริ่มต้น 28-41 กรัม จำนวน 36 ตัว มาปรับสภาพในถังทดลองขนาด 500 ลิตร ที่ติดตั้งระบบกรองและระบบน้ำหมุนเวียน เป็นระยะเวลา 7 วัน ให้อาหารทดลองแก่แม่กุ้งจนอิ่ม วันละ 4 มื้อ ในเวลา 7.00, 13.00, 17.00 และ 22.00 น. ดำเนินการทดลองเป็นระยะเวลา 50 วัน ในระหว่างการทดลองนับจำนวนแม่กุ้งที่สร้างไข่ รวมทั้งกำจัดตะกอนและของเสียต่างๆ ทุกวัน พร้อมกับการควบคุมคุณภาพน้ำให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม รวมทั้งเก็บอาหารเหลือเพื่อหาค่าน้ำหนักอาหารที่แม่กุ้งกินจริง สิ้นสุดการทดลองนำแม่กุ้งมาหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Benfey and Sutterlin (1984) และเก็บเนื้อเยื่อรังไข่บริเวณส่วนท้าย (posterior lobe) ใน TriPure Isolation Reagent (Roche, USA) ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์จากนั้นเก็บไว้ที่ -80 °C เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

การศึกษาการแสดงออกของยีน

1. ขั้นตอนการสกัด RNA การสังเคราะห์ cDNA และการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ

เริ่มต้นด้วยการสกัด total RNA ตามวิธีการ TriPure Isolation Reagent protocol สิ้นสุดกระบวนการละลายตะกอน RNA ด้วย RNase-free water 40 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต และนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 55 °C ประมาณ 15 นาที ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop® ND-2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) นำ RNA ที่มีค่าของปริมาณและคุณภาพที่ยอมรับได้ (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรต่อค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร จะต้องมีค่าอยู่ในช่วง 1.7-2.0) มาสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยชุดสังเคราะห์ iScript™cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD, USA) โดยมีปฏิกิริยาและสภาวะของ PCR (Table 2) หลังจากนั้น นำ cDNA มาทดสอบคุณภาพ (Table 3)

Table 2 The component to synthesize the cDNA

Component	Volume (µl)
Nuclease-free water	x
5x iScript select reaction mix	4.00
Random primer	2.00
RNA sample (1 µg total RNA)	X
iScript reverse Transcriptase	1.00
Total volume	**20.00**

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต และนำเข้าเครื่อง PCR โดยกำหนดสภาวะ ดังนี้

Incubate	25	°C	นาน	5	นาที
Incubate	42	°C	นาน	30	นาที
Incubate	85	°C	นาน	5	นาที
Soak	4	°C			

หลังจากนั้น เก็บผลผลิต cDNA ที่ตู้อุณหภูมิ -20 °C ตรวจสอบคุณภาพโดยใช้ Elongation Factor 1 primers (EF) ในการทำ PCR โดยใช้ปริมาตรและสภาวะของปฏิกิริยาดังนี้

Table 3 The component of PCR Master Mix for 1 reaction to test cDNA quality

Solution	Volume (µl)
5x FIREPol® Master Mix	2.00
EF1-Forward primer (10 µM)	0.15
EF1-Reverse primer (10 µM)	0.15
cDNA Template (10 ng/µl)	1.00
Deionized H_2O	6.70
Total volume	**10.00**

นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยควบคุมสภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้

Initial denaturation	95	ºC	3 นาที	1 รอบ
Denaturation	95	ºC	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	60	ºC	30 วินาที	
Elongation	72	ºC	30 วินาที	
Final elongation	72	ºC	7 นาที	1 รอบ
Soak	4	ºC		α

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ด้วยวิธี Gel Electrophoresis ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการผสม Novel Juice Supplied in 6X Loading Buffer (Gene Direx, USA) กับ PCR product ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ปริมาตร 10 µl จากนั้นนำไปหยดลงบน Agarose gel และใช้ 100 bp DNA ladder marker เป็นแถบ DNA มาตรฐาน

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน vitellogenin และยีน fatty acid binding protein ของกุ้งขาว จาก GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (โดยตรงกับ accession number AY321153.2 และ CK570804.1 ตามลำดับ) มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3plus (www.bioinformatics.nl/primer3plus) ให้มีความยาวประมาณ 18-23 คู่เบส หลังจากนั้น ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้เครื่อง 7300 Real-time PCR system, USA และใช้ยีน Elongation Factor1 เป็นยีนอ้างอิง โดยใช้ปฏิกิริยาและสภาวะ PCR (Table 4)

Table 4 The component in real-time PCR for 1 reaction

Component	Volume (µl)
5x HOT FIREPol® EvaGreen®qPCR Mix Plus	2.00
Primer Forward (10 pmol/µl)	0.25
Primer Reverse (10 pmol/µl)	0.25
cDNA Template (10 ng/µl)	1.00
H_2O PCR grade	6.50
Total volume	**10.00**

นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยควบคุมสภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้

Initial activation	95	ºC	15 นาที	1 รอบ
Denaturation	95	ºC	30 วินาที	40 รอบ
Annealing	60	ºC	30 วินาที	
Elongation	72	ºC	30 วินาที	
Soak	4	ºC		α

วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีนด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001) โดยคำนวณสัดส่วนระดับการแสดงออกของยีนจากสมการ ดังนี้

$\Delta\Delta CT$ =(*C*T, target – *C*T, control)time X – (*C*T, target – *C*T, control)time 0

สัดส่วนการแสดงออกของยีน = $2^{-\Delta\Delta C}$

เมื่อ; *C*T, target = ค่า *C*T ของยีนเป้าหมาย

*C*T, control = ค่า *C*T ของยีนอ้างอิง

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

นำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการอาหารทดลอง ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศและระดับการแสดงออกของยีน มาวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยแบบ (One way analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย (Duncan' s New Multiple Rang Test : DMRT) รวมทั้งวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างคุณค่าทางโภชนาการของอาหารและค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) กับการแสดงออกของยีนโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS

ผลการวิจัย

คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (Table 5) แสดงให้เห็นว่า อาหารแต่ละชนิดมีคุณค่าทางโภชนาการที่แตกต่างกัน อาหารสูตรพัฒนาระบบสืบพันธุ์ มีค่าโปรตีนและไขมันสูงสุด โดยมีค่า 52.37 และ 12.17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ส่วนอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น (Diet 3) มีค่าโปรตีน และไขมัน 43.68 และ 6.72 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร การเสริมสารสกัดหัวกุ้งในอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น (Diet 4) ส่งผลให้ค่าโปรตีนและไขมันสูงขึ้น โดยมีค่า 46.48 และ 8.73 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร ตามลำดับ รวมทั้งมีระดับของแคโรทีนอยด์สูงกว่าอาหารสูตรอื่นๆ โดยมีค่า 48.78 ไมโครกรัมแอสต้าแซนทีน/กรัม ในขณะที่อาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น และอาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรพัฒนาระบบสืบพันธุ์ มีค่าแคโรทีนอยด์ 11.72 และ 31.94 ไมโครกรัมแอสต้าแซนทีน/กรัม ตามลำดับ ส่วนอาหารสด (Diet 1) มีระดับโปรตีนและไขมันใกล้เคียงอาหารสูตรพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Diet 2)

Table 5 Proximate composition of experimental diets (dry weight)

Experimental diet	protein[1] (%)	Lipid[1] (%)	Ash[1] (%)	Carotenoids[1] (μg Ax[2]/g)
Diet 1	50.07 ± 0.19[b]	10.88 ± 0.26[b]	8.12 ± 0.35[c]	29.18 ± 1.33[c]
Diet 2	52.37 ± 0.14[a]	12.17 ± 0.44[a]	11.35 ± 0.68[b]	31.94 ± 7.52[b]
Diet 3	43.68 ± 0.09[d]	6.72 ± 0.14[d]	15.45 ± 0.48[a]	11.72 ± 2.34[d]
Diet 4	46.48 ± 1.08[c]	8.73 ± 0.42[c]	15.83 ± 0.16[a]	48.78 ±16.79[a]

[1]Values are means ± SD (n=3) with different superscript (a-d) differ significantly ($p< 0.05$) between treatment

[2] Ax แอสต้าแซนทีน (Astaxanthin)

Diet 1 Fresh feed, Diet 2 Reproductive compound diet, Diet 3 Commercial compound diet for juvenile shrimp, Diet 4 diet 3 supplemented with shrimp head extracted at 55 % (w/w)

ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonadosomatic index)

ผลการหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศของแม่กุ้งขาว (Table 6) พบว่า มีค่าสูงสุดในแม่กุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น (Diet 3) และน้อยสุดในชุดทดลองอาหารเม็ดสำเร็จรูปสูตรพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Diet 2) แต่ทั้งนี้ ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศของแม่กุ้ง อยู่ในช่วง 0.60-1.21 ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ในระหว่างการทดลอง พบแม่กุ้งวางไข่ในชุดการทดลองอาหารสด (Diet 1) และอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น (Diet 3)

Table 6 The number of spawners and Gonadosomatic index (GSI) of shrimp fed different diet for 50 days

Treatment	Number of spawner	GSI (%)[1]
Diet 1	1	1.10 ± 0.36
Diet 2	0	0.60 ± 0.29
Diet 3	1	1.21 ± 0.63
Diet 4	0	1.03 ± 0.26

[1]Values are means ± SD (n=3)

Diet 1 Fresh feed, Diet 2 Reproductive compound diet, Diet 3 Commercial compound diet for juvenile shrimp, Diet 4 diet 3 supplemented with shrimp head extracted at 55 % (w/w)

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน Vitellogenin (Vite) และยีน Fatty acid binding protein (FABP) ในแม่พันธุ์กุ้งขาว

จากการค้นหายีน Vite และยีน FABP ของกุ้งขาวในฐานข้อมูล Genbank ผลของการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน (Table 7) ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน Vite และยีน FABP พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนทั้งสอง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (Table 8)

Table 7 Selective primers for vitellogene (Vite) gene and Fatty acid binding protein (FABP) gene

Primer	Base sequence 5´-3´	% G+C	Tm (°C)	Position of primer binding	Product size (bp)
Vite- F	CTGGAATTGGAGATCCCTGA	50	57.3	2,747-3,055	308
Vite- R	TTCTTGATGGCAGCAGTCAC	50	57.3	(started codon (AGT))	
FABP- F	AGGAATTTGAAGAGACCACAG	50	57.3	273-433	160
FABP-R	CACTCCATTAGCATCTTGTC	50	57.3	(started codon (GCC))	

Table 8 Gene expression (fold changes) of Vite gene and FABP gene from ovary tissue of female pacific white shrimp fed different diet for 50 day

Treatment	Vite gene[1]	FABP gene[1]
Diet 1	12.22 ± 0.66[d]	20.80 ± 14.05[b]
Diet 2	1.71 ± 1.33[c]	27.91 ± 11.35[a]
Diet 3	1.00 ± 1.22[b]	1.00 ± 3.01[d]
Diet 4	0.71 ± 0.14[a]	6.83 ± 7.10[c]

[1]Values are means ± SD from the number of surviving shrimp in each trial: values with different superscript (a-d) differ significantly ($p<0.05$) between treatment

Diet 1 Fresh feed, Diet 2 Reproductive compound diet, Diet 3 Commercial compound diet for juvenile shrimp, Diet 4 diet 3 supplemented with shrimp head extracted at 55 % (w/w)

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของข้อมูลแบบเพียร์สัน (Pearson Correlation Coefficient, r) ระหว่างคุณค่าทางโภชนาการของอาหารกับการแสดงออกของยีน และค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Table 9) พบว่า ค่าโปรตีนและไขมันในอาหารมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน FABP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เท่ากับ 0.99 และ 0.99 ตามลำดับ

Table 9 Pearson product-moment correlation coefficient between proximate composition of experimental diet and gonadosomatic index (GSI) with gene expression

Parameter	Expression of genes/GSI	r	siq.
Protein	Vite gene	0.39	0.61
Protein	FABP gene	0.99	0.01*
Protein	GSI	-0.81	0.19
Lipid	Vite gene	0.40	0.60
Lipid	FABP gene	0.99	0.01*
Lipid	GSI	-0.80	0.20
GSI	Vite gene	0.23	0.78
GSI	FABP gene	-0.79	0.21

* significant correlation at the 0.01 level (2-tailed)

[1]r Pearson Correlation Coefficient

[2]Siq differ significantly ($p<0.01$) between treatment

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษา พบว่าการแสดงออกของยีน vitellogenin สูงสุด ในกุ้งที่ได้รับอาหารสด (สูตรที่ 1) และต่ำสุดในกุ้งที่ได้รับอาหารเสริมสารสกัดหัวกุ้ง (สูตรที่ 4) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ทั้งนี้ ในระหว่างการทดลอง พบการพัฒนารังไข่ของแม่พันธุ์กุ้งที่ได้รับอาหารสดในช่วง 20 วันแรกของการทดลอง และกุ้งที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปสำหรับกุ้งระยะรุ่น (สูตรที่ 3) ในช่วง 35 วันของการทดลอง ซึ่งจากการศึกษา บ่งชี้ว่าการแสดงออกของยีน vitellogenin มีค่าสูงสุดในชุดการทดลองอาหารสด ในขณะที่ GSI ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของแต่ละชุดการทดลอง โดยมีค่าระหว่าง 1.21- 0.60 แม้ว่ามีค่า 0.60 ก็พบการแสดงออกของยีน vitellogenin ซึ่งมีความแตกต่างกับการศึกษาของ Avarre *et al*., 2003 ที่รายงานว่าระยะการพัฒนารังไข่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับการแสดงออกของยีน vitellogenin โดยยีน vitellin ในกุ้งกุลาลาย (*Penaeus semisulcatus*) นั้นจะเริ่มพบการแสดงออกเมื่อ GSI มีค่า 1.00 ขึ้นไป ซึ่งจัดอยู่ในระยะไวเทลโลจีนิกตอนต้น (early vitellogenic stage) การพัฒนาของรังไข่จะเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง GSI มีค่า 5.6 ซึ่งเป็นระยะไข่สุก (mature stage) โดยจะพบโปรตีนไวเทลโลจีนินตั้งแต่ 0.25-2.65 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Okumura *et al*., 2004) ดังนั้นการศึกษาในระดับโมเลกุลหรือในระดับยีนเป็นอีกแนวทางเพื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ การศึกษาครั้งนี้ แม่กุ้งได้รับอาหารทดลองที่มีคุณค่าทาง

โภชนาการแตกต่างกันแต่พบว่า ระดับการแสดงออกของยีน vitellogenin ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าของโปรตีนและไขมันในอาหาร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจมีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง จากการรายงานของ Wouters *et al*. (2001) พบว่า แม่กุ้งที่ได้รับสารอาหารอย่างครบถ้วนจะนำมาสู่การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ที่เร็วขึ้น นอกจากนี้คอเลสเตอรอลและกรดไขมัน ได้แก่ arachidonic (ARA), eicosapentaenoic (EPA) และ docosahexaenoic (DHA) จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารสเตอรอยด์ต่างๆ และฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันและการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง (Wimuttisuk *et al*., 2013) จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ของสารอาหารกับการแสดงออกของยีน พบว่าสารอาหารบางกลุ่มส่งผลโดยตรงกับระดับการแสดงออกของยีนนั่นคือ การแสดงออกของยีน Fatty acid binding protein มีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกันกับค่าไขมันในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cheng *et al*. (2013) พบว่า ยีน Fatty acid binding protein มีความเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมัน กรดไขมันและการพาโมเลกุลของสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่น เรตินอล เกลือน้ำดี สารสี เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ตลอดจนการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ กุ้งในแต่ละวัยจะมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน Boonyaratpalin (1996) รายงานว่า กุ้งที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะมีความต้องการสารอาหารสูงกว่ากุ้งระยะอื่น เนื่องจากกุ้งวัยนี้ต้องใช้พลังงานที่เหลือจากการดำรงชีวิตและการเคลื่อนไหว เพื่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ Chamberlain *et al*. (1988) รายงานว่าแม่กุ้งขาวต้องการโปรตีน 42 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกับการรายงานของ Galgani *et al*. (1989) พบว่าแม่กุ้งขาวต้องการโปรตีน 49 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้อาหารสำหรับการขุนแม่พันธุ์กุ้งขาว โดยในระยะแรกสามารถขุนแม่กุ้งด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปกุ้งระยะรุ่นก่อนเพื่อให้แม่กุ้งมีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์ แล้วกระตุ้นให้แม่กุ้งพัฒนารังไข่ที่สมบูรณ์ด้วยการใช้อาหารสด ทั้งนี้ จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงระยะเวลาของการใช้อาหารแต่ละชนิด

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากเครือข่ายการวิจัยและนวัตกรรมเพื่อถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ชุมชนฐานรากภาคใต้ตอนบน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

เอกสารอ้างอิง

Avarre, J.C., Michelis, R., Tietz, A. and Lubzens, E. 2003. Relationship between Vitellogenin and Vitellin in a Marine Shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and Molecular Characterization of Vitellogenin Complementary DNAs. Biology of reproduction. 69: 355–364.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists Washington, DC.

Benfey, T.J. and Sutterlin, A.M. 1984. Growth and gonad development in Triploid Landlocked Atlantic Salmon (Salmo salar). Canada Journal fish. Aquaculture science. 41:1387 – 1392.

Bligh, E.G. and Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemical and Physiology. 37(8): 911-917.

Binson, W. 2007. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cephalothorax. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology. Prince of Songkla University. 113.

Boonyaratpalin, M. 1996. Nutritional requirements of commercially important shrimps in the tropics. Fish nutrition and feeds'94 proceeding. SEAFDEC Aquaculture Department. Tigbauan. Iloilo. Philippines. 10-28.

Chamberlain, G.W. 1988. Stepwise investigation of environmental and nutritional requirementsfor Reproduction of penaeid shrimp. Ph.D. dissertation, Department of Wildlife and Fisheries Science, Texas A&M University, TX, USA. 6-11.

Cheng, L., Jin, X.K., Li, W.W., Li, S., Guo, X.N., Wang, J., Gong, Y.N., He, L. and Wang, Q. 2013. fatty acid binding proteins FABP 9 and FABP 10 participate in antibacterial responses in chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Journal pone. 8(1): 1-11.

Galgani, M.L., Cuzon, G., Galgani, F. and Goguenheim, J. 1989. Influence du re´gime alimentaire sur la reproduction en captivite´ de *Penaeus indicus*. Aquaculture 81, 337–350.

Genbank [Online] Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

Hiransuchalert, R. 2013. Vitellogenesis: Yolk synthesis process in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). KKU Science journal. 41(2): 281-297. [in thai]

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C}$T method. elsevier science (USA) method. 25: 402-408.

Meunpol, O., Meejing, P. and Piyatiratitivorakul, S. 2005. Maturation diet based on fatty acid content for male *Penaeus monodon* (Fabricius) broodstock. Aquaculture Research. 36: 1216-1225.

Okumura, T., Yoshida, K. and Nikaido, H. 2004. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric Shrimp, *Pandalushy psinotus* measurement by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). Zoological Science. 21(10):1037-1047.

Primer3plus program [Online] Available from http://www.bioinformatics.nl/primer3plus

Quackenbush, L.S. 2001. Yolk Synthesis in the Marine Shrimp, *Penaeus vannamei*. American Zoologist. 41:458-464.

Sachindra, N.M. Bhaskar, N. and Mahendrakar, S.N. 2 0 0 4 . Carotenoids in different body components of Indian shrimp. Journal of Science of Food and Agriculture. 26: 167-172.

Soderhall, I., Tangprasittipap, A., Liu, H., Sritunyalucksana, K., Prasertsan, P., Jiravanichpaisal, P. and Soderhall, K. 2006. Characterization of a haemocyte intracellular fatty acid binding protein from crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) and shrimp (*Penaeus monodon*). FEBS Journal. 273. (13): 2902–2912.

Tiu, S.H.K., Hui, J.H., Mak, A.S., He, J.G. and Chan, S.M. 2008. From hepatopancreas to ovary: molecular characterization of a shrimp vitellogenin receptor involved in the processing of vitellogenin. Biology Reproduction. 79(1):66-74.

Tsutsui, N., Kawazoe, I., Ohira, T., Jasmani, S., Yang, W. J., Wilder, M. N. and Aida, K. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the Kuruma Prawn, *Penaenus japonicus*. Zoology Science 17: 651–660.

Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P. 2001. Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture 202:1-21.

Wimuttisuk, W., Tobwor, P., Deenarn, P., Danwisetkanjana, K., Pinkaew, D., Kirtikara, K. and Vichai, V. 2013. Insights into the Prostanoid Pathway in the Ovary Development of the Penaeid Shrimp *Penaeus monodon*. Journal pone 8(10): 1-15.