โครงการ การพัฒนาการกระตุ้นให้แม่พันธุ์กุ้งวางไข่ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลเพื่อทดแทนการตัดตา

รหัสโครงการ CRP5705012010

บทคัดย่อ

กุ้งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ การกระตุ้นให้แม่พันธุ์กุ้งวางไข่ในการเพาะเลี้ยงกุ้งโดยทั่วไปนั้นต้องใช้วิธีการตัดตาซึ่งจะทำให้แม่กุ้งมีการพัฒนารังไข่และสามารถวางไข่ได้ ในระยะเวลาที่ต้องการและให้ผลผลิตสูง เนื่องจากการตัดตาเป็นการทำลายแหล่งผลิตฮอร์โมนที่ยับยั้งการพัฒนารังไข่ หรือฮอร์โมน GIH แต่การตัดตาเป็นการรบกวนระบบฮอร์โมนจากก้านตาของกุ้งทั้งหมด จึงส่งผลให้แม่กุ้งที่ถูกตัดตาจะอ่อนแอ และให้ผลผลิตที่มีปริมาณและคุณภาพด้อยลงในการวางไข่รอบหลัง ๆ และการตัดตายังเป็นวิธีที่ทารุณและมีแนวโน้มจะถูกนำมาเป็นประเด็นกีดกันทางค้าในอนาคตอันใกล้ ดังนั้นวิธีการทดแทนการตัดตาที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องได้รับการพัฒนาอย่างเร่งด่วน วิธีที่จะยับยั้งการทำงานของฮอร์โมน GIH อย่างจำเพาะโดยไม่ส่งผลต่อฮอร์โมนชนิดอื่น จึงนำมาสู่การศึกษาเบื้องต้นถึงการใช้อาร์เอ็นสายคู่ (dsRNA) ที่จำเพาะต่อยีนที่สร้าง GIH (GIH-dsRNA) ของกุ้ง ซึ่งการวิจัยที่ผ่านมาในกุ้งลาดำของคณะผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่า การฉีดกุ้งด้วย GIH-dsRNA สามารถทำให้กุ้งมีการพัฒนารังไข่และวางไข่ได้ใกล้เคียงกับการตัดตา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการใช้ GIH-dsRNA เพื่อกระตุ้นการพัฒนารังไข่ในกุ้งขาวซึ่งเป็นกุ้งชนิดหลักที่มีการเพาะเลี้ยงกันในปัจจุบัน จากการผลิต dsRNA ที่จำเพาะต่อ GIH ของกุ้งขาว (LvGIH-dsRNA) พบว่าการใช้ GIH-dsRNA ที่จำเพาะต่อ GIH ของกุ้งกุลาดำ (PmGIH-dsRNA) และ LvGIH-dsRNA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน GIH ในกุ้งขาวไม่แตกต่างกัน และการพัฒนา dsRNA ให้อยู่ในรูปแบบที่ถูกจับด้วย liposome (liposome-entrapped dsRNA) สามารถลดปริมาณของ dsRNA ลงได้และให้ประสิทธิภาพในการยับยั้ง GIH ได้ดีและนานกว่าการใช้ dsGIH (naked dsRNA) เพียงอย่างเดียว จากการทดลองทั้ง 4 ครั้ง พบว่า GIH-dsRNA ทั้งในรูปที่เป็น naked dsRNA และ liposome entrapped dsRNA สามารถกระตุ้นการพัฒนารังไข่ได้ใกล้เคียงกับกุ้งกลุ่มควบคุมหรือดีกว่าเล็กน้อยแบบไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่น้อยกว่าวิธีการตัดตา รวมทั้งกุ้งที่มีไข่แก่ในกลุ่มที่ฉีดด้วย GIH-dsRNA ก็มีอัตราการผสมที่น้อยกว่ากุ้งตัดตาด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามกุ้งที่ได้รับ GIH-dsRNA ในทุกการทดลองมีจำนวนไข่ต่อการวางไข่ของแม่กุ้งในแต่ละครั้งและอัตราการฟักมากกว่ากุ้งที่ตัดตา แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการวางไข่โดยไม่ตัดตาทำให้แม่กุ้งมีความแข็งแรงกว่าการตัดตา ซึ่งอาจทำให้การกระตุ้นการพัฒนารังไข่ได้ด้วย GIH-dsRNA สามารถทำซ้ำได้ ในขณะที่กุ้งตัดตาจะมีอัตราการตายมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปและไม่สามารถตัดตาเพื่อกระตุ้นการวางไข่ได้อีก อย่างไรก็ตามการใช้ GIH-dsRNA ยังไม่สามารถกระตุ้นให้กุ้งมีการพัฒนารังไข่ได้เท่ากับการตัดตา ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างเช่นสภาวะในการเลี้ยง ความสมบูรณ์ของแม่กุ้งเมื่อเริ่มการกระตุ้น วิธีการนำ dsRNA เข้าสู่กุ้ง เป็นต้น ดังนั้นประสิทธิภาพของการใช้ GIH-dsRNA ในการกระตุ้นการพัฒนารังไข่และการวางไข่ในก้งยังต้องได้รับการพัฒนาประสิทธิภาพต่อไปในอนาคต

Development of a molecular method to induce spawning in marine shrimp as an alternative to eye ablation

Abstract

Shrimp is an economically important aquatic animal of Thailand. In order to achieve high rate and predictable spawning of the broodstock, eyestalk ablation is commonly employed by the hatcheries. This technique removes the synthesis source of gonad-inhibiting hormone (GIH) located in the eyestalk. However, not only GIH but also other important eyestalk hormones are also affected by eyestalk ablation making the eye-ablated broodstock weaker and the production in later rounds of spawning will finally drop in terms of both yield and quality. In addition, eyestalk ablation is considered unethical and tends to be brought up as trade barrier in the near future. Therefore, it is very important and urgent to replace eyestalk ablation with other methods. The specific inhibition of GIH by dsRNA suppression at post-transcriptional level has been shown to be effective to induce spawning in the black tiger shrimp at the successful spawning rate closed to eyestalk ablation. Thus, in this study the GIH-dsRNA was used to induce spawning in the pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei), the main cultured species worldwide at present. A dsRNA that is specific to GIH of L. vannamei (LvGIH-dsRNA) was produced and it showed the same efficiency of GIH suppression in the white shrimp as the dsRNA that is specific to P. monodon's GIH. In addition, the GIH-dsRNA in the form of liposome-entrapped dsRNA could suppress GIH with higher efficiency and longer duration of suppression than the naked GIH-dsRNA. From the four experiments in this study, both forms of GIH-dsRNA could induce spawning at similar levels to the control shrimp, but less than eyestalk ablation. The shrimp with mature ovaries of the GIH-dsRNA treated shrimp was also mate at lower rate than eyestalk-ablated shrimp. However, GIH-dsRNA injection gave higher amount of egg per spawning and hatching rate than eyestalk ablation in all experiments. This suggest that the GIH-dsRNA injected broodstock are healthier and remain in better physiological condition that would enable the repeated spawning induction by the second injection of GIH-dsRNA whereas eyestalk ablation had higher mortality and could not be further induced. However, the use of GIH-dsRNA still gives lower ovarian maturation than eyestalk ablation, which may be caused by many factors such as the culture condition, the wellness of the broodstock the method of dsRNA delivery. Therefore, the effective use of GIH-dsRNA to induce spawning still needs further improvement.