

**ASPECTS OF SPERM CAPACITATION AND DETERMINATION
OF MALE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF THE
WHITE PACIFIC SHRIMP *Litopenaeus vannamei***

SIRINDA AUNGSUCHAWAN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2007

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การเปลี่ยนแปลงของอสุจิในการผสมกับไข่และการหาวิธีเปรียบเทียบสมรรถภาพของพ่อพันธุ์กุ้ง
 ขาวลิโธพีเนียสแวนนาไม (ASPECTS OF SPERM CAPACITATION AND
 DETERMINATION OF MALE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF THE
 WHITE PACIFIC SHRIMP *Litopenaeus vannamei*)

สิรินดา อังศุชวาล 4537315 SCAN/D

ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, M.D, Ph.D, ประเสริฐ โสภณ,
 Ph.D, ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph.D, จิตติพันธุ์ ชวเดช, Ph.D

บทคัดย่อ

กุ้งขาวแวนนาไมเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญในอุตสาหกรรมกุ้ง อวัยวะที่เก็บอสุจิของตัวเมีย (thelycum) เป็นชนิดเปิด การผสมสำเร็จโดยอสุจิของตัวผู้จะปะติดกับผิวของอวัยวะรับอสุจิในตัวเมีย การปล่อยไข่จะเกิดขึ้นหลังการผสมประมาณ 4-6 ชั่วโมง ในช่วงเวลานี้ ตัวอสุจิอาจมีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านรูปร่างลักษณะและหรือการเปลี่ยนแปลงด้านชีวเคมีซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้มีความจำเป็นที่ทำให้อสุจิมีความสามารถในการผสมกับไข่ (capacitation) เช่นที่ปรากฏในสัตว์ชนิดอื่น อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในกุ้งชนิดนี้ วัตถุประสงค์ของการวิจัยในวิทยานิพนธ์นี้เพื่อค้นหาการเกิดขึ้นของกระบวนการ capacitation อย่างละเอียดในอสุจิของกุ้งแวนนาไม ในระหว่างการศึกษานี้ยังมีการตรวจพบว่าตัวอสุจิที่มาจากกุ้งแต่ละตัวมีคุณภาพที่ความแตกต่างกันซึ่งนำไปสู่การสร้างวิธีการเพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพระหว่างกุ้งพ่อพันธุ์สองตัวโดยไม่มีผลลำเอียง

อสุจิของกุ้งแวนนาไมแบ่งออกโดยการเตรียมสัดจากอสุจิที่เก็บตัวอสุจิซึ่งถูกบีบมาจากรูเปิดส่วนปลายของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ของกุ้งตัวผู้ (S-sperm) ส่วนตัวอสุจิอีกกลุ่มหนึ่งมาจากอสุจิที่เก็บตัวอสุจิที่อยู่ใน thelycum ของกุ้งตัวเมีย (T-sperm) การศึกษาความแตกต่างของโครงสร้างอย่างละเอียดระหว่าง S-sperm และ T-sperm ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านและส่องกราด ความแตกต่างชัดเจนที่พบคือสารในนิวเคลียส โดยที่พบใน S-sperm มีลักษณะหนาแน่นมากกว่า ในการใช้ SDS-PAGE รูปแบบของแถบต่างๆของโปรตีนของโปรตีนที่มาจาก S-sperm และ T-sperm พบว่ามีความแตกต่างกัน กล่าวคือมีการเพิ่มขึ้นและหายไป ของแถบโปรตีนใน S-sperm มีโปรตีนชนิดหนึ่งที่ลดลงจาก S-sperm ไปยัง T-sperm คือ โปรตีน actin โดย วิธี Western blotting และ immuno fluorescent ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal พบว่ามีความแตกต่างของ โปรตีน tyrosine phosphorylation พบว่าการเพิ่มขึ้นของ โปรตีน tyrosine phosphorylation ใน T-sperm ทำให้ตัวอสุจิ มี capacitation. การกระตุ้นกระบวนการ acrosome reaction ของ S-sperm และ T-sperm โดยการแช่น้ำไข่ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สูงเพิ่มขึ้นใน T-sperm แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของ capacitation ใน T-sperm สุดท้าย การทำผสมเทียมโดยใช้ อสุจิจากตัวผู้สองตัวที่แตกต่างกันผสมกับตัวเมียตัวเดียวกันแล้วศึกษา จีโนมไทป์ ของลูกโดยวิธี microsatellite เพื่อติดตามพ่อ ผลการทดลองวิธีการนี้มีประสิทธิภาพในการเปรียบเทียบคุณภาพของอสุจิจากตัวผู้สองตัวได้

ASPECTS OF SPERM CAPACITATION AND DETERMINATION OF MALE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF THE WHITE PACIFIC SHRIMP
Litopenaeus vannamei

SIRINDA AUNGSUCHAWAN 4537315 SCAN/D

Ph.D.(ANATOMY)

THESIS ADVISORS: BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, M.D., Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., PRAPEE SRETARAGSA, Ph.D., JITTIPAN CHAVADEJ, Ph.D.

ABSTRACT

The Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is one of the most important species of the shrimp farming industry. The females have an “open” thelycum. Mating is accomplished by attaching male spermatophore onto the surface of the thelycum and spawning occurs at 4-6 h after mating. During this period, sperm may have to undergo morphological and/or biochemical changes as a capacitation process is required in other species. However, this has not been investigated. The objective of this thesis research was therefore to find out of the capacitation process that occurs in *L. vannamei* sperm. During the study, differences in the quality of sperm from individual shrimp were detected; this led to development of method for comparison of sperm performance between two males under controlled conditions.

The sperm of *L. vannamei* were divided into those freshly prepared from the spermatophore (S-sperm), extracted from the male gonopores, and those taken from the spermatophore, extracted from the female thelycum (T-sperm). Under transmission and scanning electron microscopy, ultrastructural differences were detected between the S- and T-sperm. The most distinctive difference was found in the nuclear material, in which a more decondensed feature of the chromatin fibers was found in the T-sperm. Using SDS-PAGE, the protein profiles of the S- and T-sperm were found to be different; certain proteins were added on while other proteins were left out from S-sperm. One protein that was decreased from S- to T-sperm was actin. By Western blotting and immuno-cyto-histo-fluorescence under confocal microscopy of tyrosine phosphorylation proteins, different activities between S- and T-sperm were revealed. Increased tyrosine phosphorylation was detected in T-sperm, suggesting increased capacitation process as the sperm became mature from S- to T-sperm. By incubating S- and T-sperm with egg water, the induced acrosome reaction was detected and higher percentage was found in T-sperm, suggesting increased capacity of T-sperm. Finally, two sperm sets of two different males were artificially inseminated into a single female and genotypic identification of offspring was carried out by microsatellite marking to determine paternity. The result revealed that the method could be used effectively to compare the quality of sperm from two individual males without bias.

KEY WORDS: *LITOPENAEUS VANNAMEI*/ CAPACITATION/ ARTIFICIAL INSEMINATION/ TYROSINE PHOSPHORYLATION PROTEIN /MICROSATELLITE/ ALLELES

104 pp.