

ผลของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการเจริญของรังไข่และการลอกคราบ  
ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)



นางสาว ขวัญเรือน ศรีภิรมย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-335-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017412 117261406

EFFECTS OF STEROID HORMONES ON OVARIAN DEVELOPMENT  
AND MOULTING IN GIANT TIGER PRAWN  
(*Penaeus monodon* Fabricius)

Miss Kwanrearn Sripirom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science  
Department of Marine Science  
Graduate School  
Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-335-3

Thesis Title Effects of Steroid Hormones on Ovarian Development  
and Moulting in Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*  
Fabricius)

By Miss Kwanrearn Sripirom

Department Marine science

Thesis Advisor Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.

Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul,

Ph.D.



---

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in  
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

*Thavorn Vajrabhaya*

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

*Twesukdi Piyakarnchana*.....Chairman

(Professor Twesukdi Piyakarnchana, Ph.D.)

*Piamsak Menasveta*.....Thesis Advisor

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

*Somkiat Piyatiratitivorakul*.....Thesis Co-advisor

(Assistant Professor Somkiat Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

*Sanha Panichjayakul*.....Member

(Associate Professor Sanha Panichjayakul, Ph.D.)

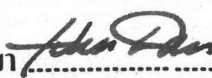
ขวัญเรือน ศิริภิรมย์ : ผลของสเตอรอยด์ฮอร์โมนต่อการเจริญของรังไข่และการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ (Penaeus monodon Fabricius) (EFFECTS OF STEROID HORMONES ON OVARIAN DEVELOPMENT AND MOULTING IN GIANT TIGER PRAWN (Penaeus monodon Fabricius) อ.ที่ปรึกษา : คำสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมฆะแก้ว และผู้ช่วยคำสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิตาวุธกุล, 86 หน้า. ISBN 974-578-335-3

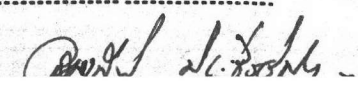
การศึกษาผลของการฉีดฮอร์โมน progesterone และ  $\beta$ -estradiol17 ในกุ้งกุลาดำ เพศเมียวัยเจริญพันธุ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ฉีดฮอร์โมน) และกลุ่ม sham (ฉีดด้วยตัวทำละลายของฮอร์โมน) พบว่า หลังจากฉีด 7 - 14 วัน กุ้งจะมีการพัฒนารังไข่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่ม sham ในทุกความเข้มข้นคือ 0.01, 0.1, 0.2 และ 0.4 ไมโครกรัมฮอร์โมนต่อกรัมน้ำหนักตัว แต่หลังจาก 21 วัน พบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพในบ่อทดลองได้ และมีการพัฒนาของรังไข่จนเข้าสู่ stage 3 ส่วนในกลุ่ม sham และกลุ่มทดลองทุกความเข้มข้น จะมีค่า gonad index ใกล้เคียงกับในช่วง 7 - 14 วัน อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ทางสถิติ ไม่พบความแตกต่างของค่า gonad index ระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่ม sham และกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตามการทดลองในกุ้งจากกลุ่มทรงคราม ล่มทรล่าคร และชลบุรี พบว่าแหล่งของรังไข่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญต่อการพัฒนารังไข่

การศึกษาวงจรในการลอกคราบของกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 35 กรัม พบว่าใช้เวลาในการลอกคราบเฉลี่ย 18 วัน โดยจะเข้าสู่ระยะหลังการลอกคราบ ในวันที่ 3 ของวัฏจักรการลอกคราบ เข้าสู่ระยะพักการลอกคราบในวันที่ 6 และเข้าสู่ระยะก่อนการลอกคราบในวันที่ 10 ทำการทดลองฉีดฮอร์โมน 2-deoxyecdysone (SIGMA) และ  $\beta$ -ecdysone บริสุทธิ์ที่สกัดจากเปลือกต้นขี้เฒ่า (Vitex glabrata) ในความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.2 และ 0.4 ไมโครกรัมฮอร์โมนต่อน้ำหนักตัว (กรัม) พบว่าในระยะหลังการลอกคราบ กุ้งจะลอกคราบเร็วขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมประมาณ 5.5 วัน ระยะพักการลอกคราบ เร็วขึ้นประมาณ 4.9 วัน และระยะก่อนการลอกคราบเร็วขึ้นประมาณ 4.2 วัน ส่วนในกลุ่ม sham ซึ่งเป็นกลุ่มทดลองที่ฉีดตัวทำละลายฮอร์โมน พบว่ามีการลอกคราบเร็วขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม หลังจากการฉีดในระยะหลังการลอกคราบ 1 วัน ระยะพักการลอกคราบ 2 วัน และระยะก่อนการลอกคราบ 2 วัน ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างช่วงระยะเวลาการลอกคราบของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันในชนิดฮอร์โมน



ภาควิชา ..... วิชาคำสตราทางทะเล .....  
สาขาวิชา ..... ชีววิทยาทางทะเล .....  
ปีการศึกษา ..... 2533 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... ขวัญเรือน ศิริภิรมย์ .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  .....

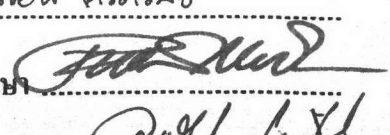


KWANREARN SRIPROM : EFFECTS OF STEROID HORMONES ON OVARIAN DEVELOPMENT AND MOULTING IN GIANT TIGER PRAWN (Penaeus monodon Fabricius). THESIS ADVISOR : PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D. AND ASST. PROF. SOMKIAT PIYATRITITIVORAKUL, Ph.D., 86 PP. ISBN 974-579-335-3

The study on the effects of progesterone and  $\beta$ -estradiol<sub>17</sub> on ovarian development of Penaeus monodon was carried out by injection technique. A comparative study of 7, 14 and 21 days durations was undertaken by injecting progesterone of  $\beta$ -estradiol<sub>17</sub> at the doses of 0.01, 0.1, 0.2 and 0.4  $\mu$ g-hormone/g body weight. Solvent without hormone injection (sham) dose of 0.1  $\mu$ l-solvent/g body weight and non treated prawn (control) were used for controls. The result showed that all treatments with hormone injection had a positive response on ovarian development. Gonad index of the groups injected by the double dose hormones seemed to be higher than the controls and the shams. However, there was no statistical significance among those hormonal treatments, sham and control, and between sources of hormones on ovarian development.

Moulting duration cycle of Penaeus monodon averaged body weight 35 g was approximately 18 days. Moulting stage B (3 days after moulting), stage C (6 days after moulting) and stage D<sub>1</sub>" (10 days after moulting) were designed for hormones, 2-deoxyecdysone (SIGMA) and pure  $\beta$ -ecdysone (extracted from Vitex glabrata) treatment. Concentration of 0.01, 0.1, 0.2 and 0.4  $\mu$ g-hormone/g body weight were singly injected into abdominal muscular tissues. Molt duration of stage B, stage C and stage D<sub>1</sub>" in the hormone treated group decreased approximately 5.5 days, 4.9 days and 4.2 days comparing the control. While molt duration of sham group on stage B, stage C and stage D<sub>1</sub>" were decreased 1 day, 2 days and 2 days comparing to the control. There was no statistical significance between sources of moulting hormones on moulting duration cycle.

ภาควิชา ..... วิทยาศาสตร์ทางทะเล .....  
สาขาวิชา ..... ชีววิทยาทางทะเล .....  
ปีการศึกษา ..... 2533 .....

ลายมือชื่อนิสิต ..... ขวัญเหือน ศรีธรรมชัย .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  .....



**ACKNOWLEDGEMENT**

I wish to express my sincere gratitude to Professor Dr. Piamsak Menasveta; my teacher and advisor, for his invaluable criticisms and suggestions in the preparation of work and manuscript.

My sincere thankfulness is also expressed to Assistant Professor Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul for his support and suggestion throughout my time.

This work was supported by STDB and party supported by the Graduated School, Chulalongkorn University, which I also acknowledge gratefully.

And lastly, but not least, to my parents who always serve as my inspiration.



## TABLE OF CONTENTS

	page
Thai Abstract.....	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vi
List of Tables.....	viii
List of Figures.....	x
Chapters	
1. Introduction.....	1
2. Materials and Methods.....	22
3. Results.....	36
4. Discussion.....	56
5. Conclusion and Recommendation.....	68
References.....	70
Appendix.....	79
Biodata.....	86

## LIST OF TABLES

	page
Table 1. Showing the experimental design on study of effect of progesterone (P) and $\beta$ -estradiol17 (ES) on ovarian development.....	30
Table 2. Showing the experimental design on study of effect of 2-deoxyecdysone (Ec) and $\beta$ -ecdysone ( $\beta$ Ec) on moulting.....	34
Table 3. Effect of sources of broodstocks on ovarian development in <i>P. monodon</i> .....	38
Table 4. Effect of Progesterone on gonad index of <i>P. monodon</i> from Khlong Cone.....	39
Table 5. Effect of Progesterone on gonad index of <i>P. monodon</i> from Samut Sakorn.....	39
Table 6. Effect of Progesterone on gonad index of <i>P. monodon</i> from Chon Buri.....	40
Table 7. Effect of $\beta$ -Estradiol17 on gonad index of <i>P. monodon</i> from Khlong Cone.....	46



Table 8.	Effect of $\beta$ -Estradiol17 on gonad index of <i>P. monodon</i> from Samut Sakorn.....	46
Table 9.	Effect of $\beta$ -Estradiol17 on gonad index of <i>P. monodon</i> from Chon Buri.....	47
Table 10.	Effects of 2-deoxyecdysone and $\beta$ -ecdysone on moulting duration of <i>Penaeus monodon</i> .....	55
Table 11.	Effects of progesterone and $\beta$ -estradiol on induction ovarian development of giant tiger prawn, <i>Penaeus monodon</i> Fabricius, from Khlong Cone.....	58

## LIST OF FIGURES

	page
Figure 1. Adult female of the giant tiger prawn , <i>Penaeus monodon</i> Fabricius (Source: Motoh, 1981).....	3
Figure 2. Diagramatic representation of oocyte development in <i>P. monodon</i> . 1, Undeveloped or spent stage; 2, developing stage; 3, nearly ripe stage and 4, ripe stage. Scale represent 20 mm (Source: Motoh, 1981; Khoo, 1988).....	5
Figure 3. Diagram of hormonal control of vitellogenesis in Decapod Crustacean;	
-----> demonstrated evidence	
+ stimulatory	
- inhibitory	
GIH Gonad inhibiting hormone	
GSH Gonad stimulating hormone	
VSOH Vitellogen stimulating ovarian hormone...	8
Figure 4. Diagram of neurosecretory system of decapod crustaceans (Source: Highnam and Hill, 1978).....	9

Figure 5. a) The formula for cholesterol. The carbon atoms are numbered in the standard manner (Source: Highnam and Hill, 1978). b) The formular of estradiol-17 $\beta$  and c) The formular of progesterone. 11

Figure 6. Semi-diagrammatic representations of sections of abdominal cuticle and epidermis. A<sub>1</sub>, B, C, D<sub>1</sub>" , D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> moult stages. Ec, epicuticle; Ex, exocuticle; End, endocuticle; Epi, epidermis; CT, connective tissue; SC, storage cells (Source: Smith and Dall, 1985)..... 14

Figure 7. The line drawing of the uropod edge are tracings of the photographs. B, C, D<sub>0</sub>, D<sub>1</sub>" ,D<sub>3</sub> moult stage. S, setal shafts; SL, setal lumen; SB, setal base; SC, setal cone; CE, clear cuticular edge of uropod; EL, epidermal line; OC, old cuticle; NC, new cuticle; SI, setal invagination which everts to form seta ecdysis; PP, area visible as pinpoints of light in this stage (Source: Smith and Dall, 1985).. 16

Figure 8. The formula for 20-hydroxyecdysone. Note the additional -OH group on carbon atom 20 (Source: Highnam and Hill, 1978)..... 18

Figure 9. Moulting hormones from crustaceans, additional to crustecdysone. (a) 2-deoxycrustecdysone from *Jasus lalandei*, possibly a deactivation product of crustecdysone. (b) callinecdysone A, and (c) callinecdysone B, both from *Callinectes sapidus*. (Source: Highnam and Hill, 1978)..... 18

Figure 10. Moulting in Crustacea is under a second-order neuroendocrine mechanism with a neurosecretory moult inhibiting hormone (MIH) and moulting hormones (MH) (Source: Tombes, 1970)..... 20

Figure 11. Lateral view of adult giant tiger prawn, *Penaeus monodon* showing site of injection..... 27

Figure 12. Uropods showing a sample area (SA) used for moulting stage observation and fringing setae (FS) (Source: Smith and Dall, 1985)..... 33

Figure 13. Comparison between 3 sources of *P. monodon* on gonad index by injected progesterone 0.1 ug/g body weight. 37

Figure 14. Comparison between 3 sources of *P. monodon* on gonad index by injected  $\beta$ -estradiol17 0.1 ug/g body weight 37

- Figure 15. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Khlong Cone in each dose of progesterone injection compare with control (non injected) and sham (injected with solvent of hormone).
- (A) Progesterone 0.01  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (B) Progesterone 0.1  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (C) Progesterone 0.2  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (D) Progesterone 0.4  $\mu\text{g/g}$  body weight..... 42
- Figure 16. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Khlong Cone between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> progesterone injection (0.1  $\mu\text{g/g}$  body weight) with control and and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> injection sham..... 43
- Figure 17. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Samut Sakorn between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> progesterone injection (0.1  $\mu\text{g/g}$  body weight) with control and sham..... 44
- Figure 18. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Khlong Cone in each dose of  $\beta$ -estradiol17 injection compare with control (non injected) and sham (injected with solvent of hormone).
- (A)  $\beta$ -estradiol17 0.01  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (B)  $\beta$ -estradiol17 0.1  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (C)  $\beta$ -estradiol17 0.2  $\mu\text{g/g}$  body weight.
- (D)  $\beta$ -estradiol17 0.4  $\mu\text{g/g}$  body weight..... 48

- Figure 19. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Khlong Cone between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>  $\beta$ -estradiol<sub>17</sub> injection (0.1  $\mu$ g/g body weight) with control and 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> injection sham..... 49
- Figure 20. Comparison of gonad index (%) of *P. monodon* from Samut Sakorn between 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup>  $\beta$ -estradiol<sub>17</sub> injection (0.1  $\mu$ g/g body weight) with control and sham..... 51
- Figure 21. The duration of moult cycle of *P. monodon* 20-40 g. are 18 days. The duration from stage B, C and D<sub>1</sub>" to ecdysis are 15, 12, and 8 days respectively..... 52
- Figure 22. Comparative result of 2-Deoxyecdysone and  $\beta$ -Ecdysone on moulting duration of *P. monodon* with control (non injected) and sham (injected with non hormonal solvent); (A) Stage B (postmoult), (B) Stage C (intermoult), (C) Stage D<sub>1</sub>" (pre-moult).. 54
- Figure 23. Concentrations of unconjugated (X) and conjugated (.), estrone (—), 17 $\beta$ -estradiol (— —) and progesterone (- - -) in the ovary of *P. monodon* during ovarian development (source: Fairs, Quinlan and Goad, 1990)..... 61



- Figure 24. Whole ecdysteroid levels during the moult cycle in the Kuruma prawn. The number of animals assayed is given in parentheses. Ecdysteroid was calculated as 20-hydroxyecdysone equivalents. The data for the postmoult stage ecdysteroid levels are shown twice (Source: Okumura *et al.*, 1989)..... 64
- Figure 25. Changes in total ecdysteroid levels, and in the levels of five HPLC-separated ecdysteroid groups from the hemolymph of the kuruma prawn during the moult cycle. The number of animals assayed is given in parentheses. Ecdysteroid was calculated as 20-hydroxyecdysone equivalents. The data for the postmoult stage ecdysteroid levels are shown twice. 20E, 20-hydroxyecdysone; E, ecdysone; PA, ponasterone A; HPP, high polarity products; LPP, low polarity products (Source: Okumura *et al.*, 1989).... 65
- Figure 26. Immunoreactive ecdysteroids detected by RIA in fractions of kuruma prawn hemolymph separated by HPLC on methanol-water solvent system. Results are expressed as both the percent of the total ecdysteroid present in the hemolymph, and concentration (ng/ml) (Source: Okumura *et al.*, 1989) 66