



ผลของการปรับสภาพด้วยความเค็มสูงต่อการปรับระบบความดันออสโมติก และ
การเจริญพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

นางสาว อีรณัฐ ทรัพย์สาร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-357-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017565 117393022

EFFECTS OF HYPERSALINE ACCLIMATION ON OSMOREGULATION AND MATURATION
OF GIANT TIGER PRAWN (*Penaeus monodon* Fabricius)



Miss Theeranuj Sapayasant

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 974-579-357-4

Thesis Title Effects of Hypersaline Acclimation on Osmoregulation
and Maturation of Giant Tiger Prawn (*Penaeus monodon*
Fabricius)

By Miss Theeranuj Sapayasant

Department Marine Science

Thesis Advisors 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.)

.....*Somkiat Piyatiratitivorakul*..... Thesis Advisor
(Assistant Professor Somkai Piyatiratitivorakul, Ph.D.)

.....*Piamsak Menasveta*..... Thesis Co-advisor
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

.....*Wilaiwan Utoomprurkporn*..... Member
(Assistant Professor Wilaiwan Utoomprurkporn, Ph.D)

ธีรบุษย์ ทวีชัยสาร : ผลของการปรับสภาพด้วยความเค็มสูงต่อการปรับระบบความดันออสโมติกและการเจริญพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) (EFFECTS OF HYPERSALINE ACCLIMATION ON OSMOREGULATION AND MATURATION OF GIANT TIGER PRAWN (*Penaeus monodon* Fabricius)) อ.ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิดาวรกุล และ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์
เมนะเศวต 126 หน้า. ISBN 974-579-357-4

ศึกษาผลของความเค็มสูงและการตัดก้านตาต่อการปรับระบบความดันออสโมติกและการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาดำระยะเริ่มเจริญพันธุ์ (subadult) และระยะโตเต็มวัย (adult) ในระบบน้ำหมุนเวียนแบบปิด พบว่าในช่วงความเค็ม 20 ถึง 45‰ กุ้งกุลาดำระยะเริ่มเจริญพันธุ์จัดเป็น hypo-hyperosmoregulator โดยมีค่า isosmotic point ที่ประมาณ 28‰ การตัดก้านตามีผลต่อการปรับระบบออสโมติกอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่าความเข้มข้นของเลือดกุ้งที่ถูกตัดก้านตาจะต่ำกว่ากุ้งปกติซึ่งไม่ถูกตัดก้านตา จากการปรับสภาพด้วยความเค็มสูงที่ 30‰ และ 40‰ ด้วยระยะเวลา 1, 2, 7, 15, 30 และ 45 วัน พบว่าความเข้มข้นเลือดของกุ้งที่ไม่ได้ตัดก้านตาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทั้งสองความเค็ม

การปรับสภาพด้วยความเค็มสูงที่ 30‰ และ 40‰ ในกุ้งกุลาดำระยะโตเต็มวัย (adult) ที่ไม่ได้ตัดก้านตา สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญของรังไข่ได้ ค่าดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์กับเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพด้วยความเค็มสูงมีความสัมพันธ์กันแบบเส้นตรง

สำหรับกุ้งระยะเริ่มเจริญพันธุ์นั้นการตอบสนองต่อการตัดก้านตาขึ้นกับขนาดของกุ้ง โดยที่การตัดก้านตา สามารถกระตุ้นการเจริญของรังไข่ของกุ้งกุลาดำกลุ่มที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีค่าดัชนีความสมบูรณ์ทางสรีระสูงเท่าเทียม การปรับสภาพด้วยความเค็มสูงเพียงอย่างเดียวหรือมีการตัดก้านตาด้วยสามารถกระตุ้นการเจริญของรังไข่ของกุ้งระยะเริ่มการเจริญพันธุ์ได้ แต่ถ้ามมีการตัดก้านตาพร้อมกับความเค็มสูงแล้วไม่ควรจะปรับสภาพด้วยระยะเวลามากกว่า 30 วัน ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการกระตุ้นการเจริญพันธุ์ของกุ้งกุลาดำระยะเริ่มเจริญพันธุ์โดยการตัดก้านตาและปรับสภาพทันทีด้วยความเค็ม 40‰ เป็นระยะเวลา 30 วัน และปรับสภาพอีกครั้งด้วยความเค็ม 30‰ เป็นเวลา 15 วัน จะทำให้การเจริญของรังไข่ดีที่สุด ลักษณะการเจริญของรังไข่ศึกษาได้จากเนื้อเยื่อรังไข่ จำแนกได้เป็น 6 ระยะคือ undeveloped, developing, nearly gravid, mature หรือ gravid, inactive และ redeveloping ความเค็มสูงและการตัดก้านตาไม่มีผลต่อรูปร่างและขนาดของเซลล์ ระยะเวลาระหว่างการลอกคราบและดัชนีความสมบูรณ์ทางสรีระของพ่อแม่พันธุ์



ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต ธีรบุษย์ ทวีชัยสาร
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา อ.ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

THEERANUJ SAPAYASANT : EFFECTS OF HYPERSALINE ACCLIMATION ON OSMOREGULATION AND MATURATION OF GIANT TIGER PRAWN (Penaeus monodon Fabricius). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SOMKIAT PIYATIRATITIVORAKUL, Ph.D. AND PROF. PIAMSAK MENASVETA, Ph.D., 126 pp. ISBN 974-579-357-4

A study of hypersalinity and eyestalk ablation effects on osmoregulation and maturation of subadult and adult giant tiger prawn, Penaeus monodon Fabricius was performed in closed recirculating water system. The results indicated that subadult P. monodon is hypo-hyperosmoregulative in salinities range from 20 to 45‰. The isosmotic point for this range was about 28‰. Eyestalk ablation influenced osmoregulation significantly. Haemolymph concentration of the ablated prawn was lower than the unablated one. After hypersaline acclimation in separated groups at 30 and 40‰ for 1, 2, 7, 15, 30, and 45 days, haemolymph concentration of subadult prawns had no significant difference between the two groups.

Without eyestalk ablation, hypersaline acclimation could accelerate ovarian development in adult P. monodon. There was a linear correlation between ovarian index and acclimation time.

In the case of subadult P. monodon, responses on eyestalk ablation depended on their size groups. Eyestalk ablation could induce ovarian maturation only in the large-size group (48 - 60 g) which had high condition index. Hypersaline acclimation and/or eyestalk ablation resulted in ovarian development. Nevertheless, for a good result, eyestalk ablation in hypersaline condition should not exceed 30 days. Eyestalk ablation and immediately acclimated in 40‰ for 30 day and then transferred to 30‰ to acclimate again for another during 15 days was the best condition for ovarian development of subadult prawns. Ovarian developmental stages based on histological examination could be classified into six stages; undeveloped, developing, nearly gravid, mature or gravid, inactive, and redeveloping. In addition, hypersaline condition and eyestalk ablation had no effect on morphology and size of oocyte, molting interval and condition index of the broodstocks.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
สาขาวิชา ชีววิทยาทางทะเล
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต Theeranj Sapayasant
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Somkiat Piyatiratitivorakul
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Piamsak Menasveta



ACKNOWLEDGEMENTS

In the preparation of this thesis my indebtedness extends to many persons. First and foremost is the great debt owes to all my teachers in the Department of Marine Science, Chulalongkorn University.

I wish to express my gratitude to Asst. Prof. Dr. Somkiat Piyatiratitivorakul, for his advices and suggestion. My sincere thankfulness is expressed to Prof. Dr. Piamsak Menasveta for his supports and suggestion throughout this work. I also extend my appreciation and thanks to Prof. Dr. Twesukdi Piyakarnchana and Asst. Prof. Dr. Wilaiwan Utoomprurkporn, for their thoughtfulness and generous help.

Deserving of thanks and praise is Dr. Sirichai Dharmavanij and Dr. Jean Francois who give their time and experience generously in reviewing my manuscript. I also extend my respect and appreciation to Dr. Padermsak Jarayabhand who is always kind and patient in teaching me how to work with SYSTAT program, as well as giving me a useful suggestion. I acknowledge with sincerest appreciation the help of Mr. Nopporn Phangsook and Miss Montira Thavornyutikarn who always take care of me and stand by me all the time.

This work was partly supported by the Science and Technology Development Board (STDB) Grant No. DSN 87A-1-06-085, and research funds from Graduate School, Chulalongkorn University, which I acknowledge gratefully.

Lastly, I would like to give my special thanks to my nice family and friends for their understanding, love, care and support.



TABLE OF CONTENTS

	Page
Thai Abstract	iv
English Abstract.....	v
Acknowledgements.....	vii
List of Tables.....	ix
List of Figures.....	xiii
List of Appendices.....	xvii
Chapters	
I. Introduction.....	1
II. Materials and Methods.....	13
III. Results.....	29
IV. Discussions.....	62
V. Conclusions and Recommendations.....	80
References.....	84
Appendices.....	97
Biography.....	126

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Experimental conditions and manipulation treatments for size effects of subadult <i>Penaeus monodon</i> on maturation.....	25
2	Scheme of experiments of hypersaline acclimation series and eyestalk manipulation on subadult <i>Penaeus monodon</i>	27
3	Mean and standard deviation (SD) of osmotic concentration as osmotic pressure of subadult <i>Penaeus monodon</i> haemolymph at various salinities.....	30
4	Analysis of covariance for effect of eyestalk ablation and salinity on haemolymph osmotic pressure (BLOOD) of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>	33
5	Matrix of pairwise comparison (tukey HSD multiple comparisons) probabilities of haemolymph osmolality of sudadult intermolt <i>Penaeus monodon</i> in salinity between 20 and 45 o/oo.....	34
6	Mean values and standard deviation (SD) of osmotic concentration of haemolymph, seawater and osmotic gradient between seawater and blood of <i>Penaeus monodon</i> 30 and 40 °/oo.....	35

Table	Page
7	Analysis of covariance between acclimation time and haemolymph osmotic pressure (BLOOD) of intermolt subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>37
8	The analysis of covariance of the hypersalinity effect on relationship of ovarian index (GI) and acclimation duration (TIME) of adult female prawns, <i>Penaeus monodon</i>40
9	Ovarian index, condition index, mortality rate of two size groups subadult, <i>Penaeus monodon</i>42
10	Mean values (X) and standard deviation (SD) of body weight, carapace length, condition index and ovarian index of subadult <i>Penaeus monodon</i> that acclimated by various manipulation techniques (TRM).....44
11	Analysis of variance for effects of manipulation techniques (TRM) on ovarian index (GI) of subadult <i>Penaeus monodon</i>46
12	Computation output of tukey HSD-test for manipulation techniques (TRM) effect on ovarian index of subadult <i>Penaeus monodon</i>47
13	Molting interval of <i>Penaeus monodon</i> under laboratory condition, hypersaline acclimation and eyestalk ablation.....49

Table	Page
14	Calcium ions concentration in closed recirculating water system.....50
15	Linear regression analysis for relationship between ovarian index (GI) and hypersaline acclimation time (TIME) of adult prawn, <i>Penaeus monodon</i>110
16	Linear regression analysis on effects of hypersaline (SAL) on condition index (CI) of adult prawn, <i>Penaeus monodon</i>111
17	Analysis of covariance of hypersaline effect (SAL) on relationship of condition index (CI) and acclimation time (TIME) of adult prawn, <i>Penaeus monodon</i>112
18	Analysis of covariance of the hypersalinity effect (SAL) on relationship of ovarian index (GI) and condition index (CI).....113
19	Analysis of variance on effect of salinity (30 ‰ and 40 ‰) and eyestalk ablation on ovarian index of subadult <i>Penaeus monodon</i>115
20	Analysis of variance for effect of salinity (30 ‰ and 40 ‰) and acclimation on ovarian index of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>116

Table	Page
21	Analysis of variance for effect of salinity (30 ‰ and 40 ‰) and acclimation time on condition index of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>117
22	Analysis of variance for salinity and eyestalk ablation effects on ovarian index (GI) of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>119
23	Matrix of pairwise comparisons (tukey HSD multiple comparisons among probabilities for eyestalk ablation and salinity effects on ovarian index (GI) of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>121
24	Analysis of variance for effects of condition index (CI) of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>121
25	Analysis of variance of body weight, salinity and eyestalk ablation effects on molting interval of subadult prawn, <i>Penaeus monodon</i>122
26	Analysis of variance of sex and salinity effects on molting interval adult prawn, <i>Penaeus monodon</i>123
27	Analysis of variance of age and salinity effects on molting interval of <i>Penaeus monodon</i>124
28	Computation output of tukey HSD multiple comparisons among probabilities of molting interval of subadult and adult prawn, <i>Penaeus monodon</i>125

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Method of carapace tagging.....	17
2	Method of eyestalk tagging.....	17
3	Closed recirculating water system, double filter bed. A: side view, B: top view.....	18
4	Schematic illustration of the closed recirculating system, single filter bed. A: side view, B: top view.....	19
5	Relationship between blood osmotic pressure and osmotic pressure of seawater for subadult female <i>Penaeus monodon</i> with and without eyestalk ablation	31
6	Prawn haemolymph osmotic pressure (H) (○, ●), seawater osmotic pressure (SW) (△, ▲), and the difference between the H and SW (□, ■) during acclimation in hypersalinity.....	36
7	Relationship between gonad (ovarian) index of adult female prawn, <i>Penaeus monodon</i> and acclimation time under hypersaline condition.....	39

Figure

Page

- 8 Overall view of an immature ovaries. Primary oocyte or previtellogenesis cells are produced from germinal layer of oogonia, or zone of periferation (Zop). Oocytes are very small and located in cysts. The cytes are separated by hemal sinuses and connected with the central ovarian cavity (Cov).....53
- 9 Enlarged view of oocytes (Ooc) in late perinucleolar stage and oogonia cells (Oog). Most of the oocytes begin to contain yolk granules in the cytoplasm. Follicle cells (Flc) are visibly surrounded the cyst.....55
- 10 Enlarged view of nearly ripe ovaries. Young oocytes are still developing. Follicle cells (Flc) surround each cyst, and maturing ova (Ov1) make up the cysts wall. Significant increases occur in ova nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyt) size; and the nuclei or aggregation of chromatin from distinct marginated bodies.....56

ศูนย์วิทยุโทรทัศน
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Figure	Page
11	Overall view of mature ovaries (stage 4) from adult, The ovaries consist primary of mature ova (Ov2), with a few oocytes. The mature ova consist of rod-like peripheral bodies (Rpb), yolk globules and nucleoli in nucleus (Nuc). Follicle cells (Flc) appear surrounding the ova and in the central ovaries cavity (Coc). The ovarian index for this specimen was 6.17%.....58
12	Enlarged view of mature ova undergoing breakdown, to be followed by reabsorption. Some of the cellular component are still recognizable, including rod-like periphery bodies (Rpb), yolk globules (Ygb), and follicle cells (Flc).....60
13	Overall view of ovaries from subadult 70 grams which had released only a portion of her mature ova without mating. Mature ova are reabsorped. Oocytes (Ooc) were enlarged and located in each cyst. Follicle cells (Flc) surround each cyst. The ovary wall (Ovw) is thick. Raz is a defined reabsorption zone. Bar length = 100 microns.....61
14	Procedural step of routine staining of ovarian tissue.....106

LIST OF APPENDICES

	Page
Appendix A Paraffin method for ovarian tissues for <i>Penaeus monodon</i>	97
Appendix B Data available for ovarian maturation experiments of <i>Penaeus monodon</i> : Adult prawn maturation in hypersalinity	107
Appendix C Data available for ovarian maturation experiments of <i>Penaeus monodon</i> : Prawn size, hypersaline acclimation and eyestalk ablation effects on maturation of subadult <i>Penaeus monodon</i>	114
Appendix D Data available for ovarian maturation experiments of <i>Penaeus monodon</i> : Manipulation techniques to induce ovarian maturation of subadult <i>Penaeus monodon</i>	118
Appendix E Data available for molting of broodstock <i>Penaeus monodon</i> in closed recirculating water system.....	121

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย