

Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : MRG5180212

(รหัสโครงการ)

Project Title : การศึกษาปัจจัยภายในบางประการและกลไกการรอดชีวิตภายหลังการ
(ชื่อโครงการ) ติดเชื้อไวรัสโรคหัวเหลืองชนิดรุนแรงในกุ้งเศรษฐกิจที่มีความทนทาน
ต่อโรค

The Study of Internal Factor and Mechanism Involving Viral Tolerant
in Shrimp and Prawn Species after Infected with Yellow-head Virus
(YHV)

Investigator : **ชื่อนักวิจัย** ดร.กัญญา อนันตสมบุรณ์

(ชื่อนักวิจัย) **สถาบัน** ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยรังสิต

E-mail Address : ananta_gun@yahoo.com

Project Period : 3 ปี (15 พ.ค. 2551 ถึง 14 พ.ค. 2554)

(ระยะเวลาโครงการ)

เนื้อหางานวิจัย :

(ประกอบด้วย วัตถุประสงค์ วิธีทดลอง ผลการทดลอง สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับ
งานวิจัยในอนาคต)

กุ้งทะเลวงศ์ penaeid เป็นกุ้งเศรษฐกิจที่นิยมเพาะเลี้ยงเชิงเกษตรพาณิชย์ในประเทศไทย สร้างการจ้างงานและทำรายได้ส่งออกให้กับประเทศไทยปีละนับแสนล้านบาท โรคหัวเหลือง (Yellow-head disease, YHD) ในกุ้งทะเลมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสหัวเหลือง (Yellow-head virus, YHV) ซึ่งจัดเป็นโรคระบาดชนิดรุนแรง ทำให้เกิดการตายของกุ้งวงศ์ penaeid ในบ่อเลี้ยงอย่างมาก (ทั้งกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และกุ้งขาว *P. vannamei*) สร้างความสูญเสียแก่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลเป็นมูลค่ามหาศาลในปีที่มีการระบาดของโรคนี้รุนแรง ปัจจุบันมีรายงานความแปรผันของสายพันธุ์ไวรัส YHV-complex จากประเทศต่างๆ จำนวน 5 สายพันธุ์หลัก โดยสายพันธุ์ดั้งเดิม (original YHV, YHV-type1) ซึ่งพบการระบาดตั้งแต่ปี ค.ศ.

1990 เป็นสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงของโรคต่อกุ้งทะเลมากที่สุด จากการสังเกตกุ้งในบ่อเลี้ยง กุ้งและกุ้งทดลองที่ติดเชื้อ YHV พบว่ามักมีกุ้งบางส่วนรอดชีวิตภายหลังจากการระบาดของเชื้อไวรัส ชนิดนี้ เป็นที่ทราบกันดีว่าการติดเชื้อโรคและการแสดงอาการของโรคในสิ่งมีชีวิตขึ้นกับปัจจัยหลักสามประการคือชนิดของเชื้อก่อโรค สภาวะแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตที่รับเชื้อ คณะผู้วิจัยจึงได้สนใจศึกษาปัจจัยภายในตัวกุ้งทะเลวงศ์ penaeid ที่มีผลต่อการรอดชีวิตของกุ้งจากการติดเชื้อ YHV-type1 สำหรับงานศึกษาส่วนแรกได้ทำการทดลองเลียนแบบกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีน (RNA inhibition, RNAi) ซึ่งพบได้กับสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยได้ศึกษากลไกการป้องกันการตายจากโรค YHD ในกุ้งขาวปลอดเชื้อ (SPF *P. vannamei*) จากการสังเคราะห์และฉีด RNA สายคู่ (double stranded RNAs, dsRNA) ซึ่งมีความจำเพาะกับลำดับเบสบางส่วนที่เป็น non-coding sequences เปรียบเทียบระหว่างบริเวณ ORF1b และ ORF3 บนสายจีโนมของเชื้อ YHV เพียงครั้งเดียว ก่อนที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อด้วย 90% lethal dose (LD) จาก YHV stock ผลการทดลอง ณ วันที่ 14 ของโปรแกรมการทดลองพบว่ากุ้งที่ได้รับการฉีด dsRNAs ที่มีความจำเพาะ (sequence specific) ต่อจีโนมของไวรัสบริเวณ ORF3 มีอัตราการรอดตายเป็น 67% และกุ้งที่ได้รับ dsRNA จำเพาะกับจีโนมของไวรัสบริเวณ ORF1b มีอัตราการรอดตาย 48% ซึ่งสูงกว่ากุ้งที่ไม่ได้รับการฉีด dsRNA (positive control group) ซึ่งให้เห็นว่า RNAi เป็นกลไกภายในสิ่งมีชีวิตสำคัญที่กุ้งส่วนหนึ่งใช้ปกป้องตนเองไม่ให้ตายจากการติดเชื้อ YHV-type1 อย่างมีนัยสำคัญ และยังแสดงผลการยับยั้งและลดปริมาณของเชื้อ YHV ก่อโรคที่ถูกสร้างขึ้นในอวัยวะสำคัญ (เช่น lymphoid organ, gill) ของกุ้งทดลองซึ่งได้รับ RNAi ทั้งระดับ RNA และ protein expressions โดยวิธี immunohistochemical labeling และ qRT-PCR จึงสรุปได้ว่า sequence-specific dsRNAs สามารถใช้เป็น chemotherapeutic agent เพื่อปกป้องกุ้งขาวให้รอดตายหลังการติดเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงได้แต่ไม่สามารถใช้กำจัดเชื้อ YHV ออกจากตัวกุ้งทดลองได้ทั้งหมดภายในเวลา 14 วันด้วยการฉีด dsRNA เพียงครั้งเดียว ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของระยะเวลา ช่วงเวลา และปริมาณ (dose) ของการให้ dsRNA ที่เหมาะสมต่อความสามารถในการกำจัดเชื้อ YHV-type1 ออกจากตัวกุ้งได้อย่างถาวรหรือไม่

งานศึกษาปัจจัยในตัวกุ้งทะเลอีกหัวข้อที่อาจมีผลต่อการรอดชีวิตจากโรค YHD โดยคณะผู้วิจัยได้ข้อมูลเบื้องต้นจากรายงานของเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งซึ่งมักคัดเลือกซื้อลูกกุ้งฟาร์มที่มีคุณภาพสูงจากโรงเพาะฟักมากกว่า 1 แหล่งนำมาเลี้ยงรวมในบ่อเดียวกันเพื่อลดความสูญเสียหากเกิดการระบาดของโรคกุ้งบางชนิดขึ้นในบ่อเลี้ยง ข้อมูลอีกประการคือการตรวจพบเชื้อ YHV-type1 โดยวิธี PCR กับพ่อแม่พันธุ์ที่จับได้จากแหล่งธรรมชาติและกุ้งทะเลที่จับได้ตามชายฝั่งโดยไม่แสดงอาการของโรค YHD นำไปสู่สมมติฐานเกี่ยวกับความพิเศษด้านสายพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์กุ้งที่มีคุณสมบัติพิเศษโดยธรรมชาติให้สามารถมีชีวิตรอดภายหลังจากติดเชื้อ YHV สำหรับสายพันธุ์กุ้งขาวเองได้มีการรายงานถึงสายพันธุ์ย่อยที่มีคุณสมบัติเฉพาะทั้งต้านทานโรค Taura syndrome virus (TSV resistant strain) และสายพันธุ์ไวต่อโรค (TSV susceptible strain) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาคูณสมบัติความทนทาน (tolerance) ต่อโรค YHD ซึ่งอาจมีปัจจัยเกี่ยวข้องเกี่ยวกับสายพันธุ์ย่อยหรือครอบครัว (strain หรือ family)

ของกุ้งด้วย จากการนำตัวอย่างกุ้งกุลาดำปลอดเชื้อ (SPF *P. monodon*) ซึ่งเป็นกุ้งสายพันธุ์ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขต indo-pacific จำนวน 5 ครอบครัวมาทำการเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อ YHV-type1 ต่อจากกุ้งที่เป็นโรคด้วยวิธีเลี้ยงรวมกันเลียนแบบธรรมชาติ (co-habituated challenge) พบว่าในระยะเวลา 30 วันของโปรแกรมทดลอง มีกุ้งกุลาดำ 16% รอดตาย จากผลการตรวจสอบด้วยวิธี PCR-microsatellites identification โดยใช้ microsatellites primers หลายคู่ พบว่าชุดไพรเมอร์ CUPmo11 สามารถใช้ตรวจแยกกลุ่มกุ้งกุลาดำที่รอดตายทุกตัวเป็นกุ้งจากครอบครัวเดียวกันด้วยขนาดของ microsatellite products เท่ากับ 142 และ 148 bps อย่างไรก็ตามกุ้งที่รอดชีวิตยังคงแสดงผลบวกต่อการติดเชื้อ YHV เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR และผลจาก TEM analyses ยังสามารถพบเชื้อ YHV เต็มวัย (complete virions) จำนวนมาก สรุปได้ว่ากุ้งที่รอดตายมีความทนทาน (tolerance) ต่อโรค YHD แต่ไม่สามารถต้านทาน (resistance) การติดเชื้อ YHV ผลการทดลองข้างต้นสามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันความสัมพันธ์ระหว่างครอบครัวกุ้งกุลาดำที่มีคุณสมบัติพิเศษด้านความทนทานต่อโรคไวรัสหัวเหลือง และชี้ให้เห็นว่าปัจจัยด้านความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic diversity) มีผลต่อความต้านทานโรคติดเชื้อในกุ้งทะเลวงศ์ penaeid ทั้งนี้ยืนยันที่เกี่ยวข้อง ผลผลิตจากการแสดงออกของยีน และกลไกซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติความทนทานโรค YHD ในกุ้งยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดและควรที่จะศึกษาค้นคว้าต่อไป

Keywords : penaeid shrimp, yellow-head virus, viral tolerance, RNA inhibition, genomic diversity

(คำหลัก จำนวน 3-5 คำ)