Abstract

Shrimp culture in Thailand has been suffered loss in export value due to viral diseases and reproduction. This research aimed to prevent viruses (mainly yellow head virus, white spot syndrome virus, and Pm densovirus) infection and to improve shrimp reproduction by using dsRNA through RNA-interferene technology. Molecular mechanisms involved in virus infection and shrimp reproduction was extensively studied.

Various double-stranded RNAs about 400 bp were designed and synthesized in bacteria. Double stranded RNA Form A was obtained by extraction and purification from *E.coli* whereas Form B was from 0.5% formaldehyde treatment of the *E.coli*. Both forms gave highly effective RNA silencing in shrimp. Form B was much cheaper and suitable for giving the shrimp by feeding.

YHV was found to employ Clathrin protein for entry after binding to the receptor PmYPR65. Silencing of Clathrin mRNA by dsRNA inhibited YHV infection. After the entry YHV utilized Rab5 and Rab7 proteins for movement through endosome, and Rab11 protein for cell exit.

In shrimp reproduction, Gonad inhibiting hormone (GIH) inhibited ovarian maturation. Silencing of the GIH induced the maturation and spawning. A bursicon protein was found to stimulate vitellogenin expression.

The above findings may be exploited to inhibit viruses that cause damage to shrimp farming. This research is the first to demonstrate the inhibition of major shrimp viruses and paves the way to the prevention of economic loss in shrimp industry in Thailand.

This research yielded 13 international Q1 publications and 1 manuscript-in-preparation. Five M.Sc. and 3 Ph.D. have been produced. Four Ph.D. students are conducting their research on RNA interference in shrimp.

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย ประสบปัญหาการสูญเสียจากการติดเชื้อไวรัสและการผลิตลูกกุ้ง งานวิจัยนี้มีเป้าประสงค์ในการป้องกันการติดเชื้อไวรัส (โดยเฉพาะไวรัสหัวเหลือง ไวรัสตัวแดงดวงขาว และไวรัสเดนโซ) และปรับปรุงขบวนการผลิตลูกกุ้งโดยใช้เทคโนโลยี RNA Interference นอกจากนี้ยังศึกษากลไกระดับโมเลกุลในการติดเชื้อไวรัสและการผลิตไข่

เราได้ออกแบบดับเบิลสแตรนด์อาร์เอนเอ (dsRNA) ขนาดประมาณ 400 คู่เบสที่หลากหลายและสังเคราะห์โดยใช้แบคทีเรีย ประกอบด้วย dsRNA ฟอร์มA และฟอร์มB โดยฟอร์มA ผลิตโดยสกัดและทำให้บริสุทธิ์จากอีโคไล ส่วนฟอร์มB ได้จากอีโคไล ซึ่งแช่ใน 0.5% ฟอร์มาลดีไฮด์ ทั้ง 2 ฟอร์มมีประสิทธิภาพดีแต่ฟอร์มB ผลิตได้ในราคาที่ถูกและปริมาณมาก เหมาะกับการให้กุ้งกิน เพื่อยับยั้งไวรัส

เราได้พบว่าไวรัสหัวเหลืองติดเซลกุ้งโดยจับกับโปรตีน PmYPR65 แล้วเข้าสู่เซลโดยใช้โปรตีน Clathrin หากใช้ dsRNA เข้าไปทำลาย Clathrin อย่างจำเพาะเจาะจงจะทำให้ไวรัสหัวเหลืองไม่สามารถติดกุ้งได้ หลังจากไวรัสหัวเหลืองเข้าสู่เซลกุ้งแล้วก็จะใช้โปรตีน Rab5 และ Rab7 ในการเคลื่อนตัวผ่านเอ็นโดโซม และใช้โปรตีน Rab11 ในการเคลื่อนตัวออกจากเซล

เราได้พบ GIH (gonad inhibiting hormone) ทำงานหยุดยั้งการเจริญของไข่กุ้ง หากกำจัด GIH โดยใช้ dsRNA จะทำให้กุ้งพัฒนาไข่และวางไข่ นอกจากนี้เราพบโปรตีน bursicon สามารถกระตุ้นการสร้างวิเทลโลเจนินได้

การค้นพบดังกล่าวข้างต้นอาจนำไปใช้หยุดยั้งไวรัสต่าง ๆ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมกุ้งได้ งานวิจัยนี้นับเป็นชิ้นแรกที่สามารถหยุดยั้งไวรัสในกุ้งได้

งานวิจัยนี้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ Q1 จำนวน 13 ฉบับ และกำลังเตรียมตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติอีก 1 ฉบับ

ได้ผลิตนักวิจัยปริญญาโท 5 คน ปริญญาเอก 3 คน และมีนักศึกษาปริญญาเอกกำลังดำเนินงานวิจัยอีก 4 คน