

บทคัดย่อ

งานวิจัยอันเกี่ยวเนื่องกับไวรัสก่อโรคในกุ้งพบว่ากุ้งสามารถกระตุ้นให้เกิดการทนทานต่อโรคได้และมีการตอบสนองแบบจำเพาะมากและกลไกการตอบสนองยังไม่เป็นที่เข้าใจ ปรากฏการณ์ดังกล่าวไม่สะดวกในการศึกษาในรายละเอียดหากใช้กุ้งในการศึกษาวิจัยเนื่องมาจากสาเหตุหลักสองประการคือกุ้งมีวงจรชีวิตที่ยาว (1-2 ปี) และขณะนี้ยังไม่มีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อเนื่อง (Continuous Cell Line) ไว้สำหรับการทดลอง คณะผู้วิจัยได้ใช้แบบจำลองยุงและเดนโซไวรัส (Mosquito-densovirus) ซึ่งเป็นไวรัสกลุ่มพาร์โว (Parvoviruses) ในการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลังและไวรัสก่อโรคเพื่อตรวจว่าปรากฏการณ์ที่คล้ายคลึงกันนี้สามารถเกิดขึ้นได้หรือไม่ในแมลงเพื่อสนับสนุนแบบจำลองที่ประดิษฐ์ขึ้น กลุ่มผู้วิจัยได้รายงานการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกลุ่มพาร์โวที่ก่อโรคในกุ้งและแมลงโดยเปรียบเทียบลำดับสายดีเอ็นเอ และกรดอะมิโน สำหรับไวรัสทั้งในกุ้งและแมลงนั้นจัดอยู่ใน subfamily Densovirinae แบ่งเป็นไวรัสจากกุ้งคือ Hepatopancreatic parvovirus (HPV) ในกุ้ง *Penaeus monodon* (HPVmon), HPVchin ในกุ้ง *P. chinensis*, spawner-isolated mortality virus ในกุ้ง *P. monodon* (SMVmon), infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus ในกุ้ง *P. vannamei* และไวรัสจากแมลงคือ *Aedes aegypti* densovirus (AaeDNV), *Ae. albopictus* densovirus (AaDNV), *Junonia coenia* densovirus (JcDNV), *Galleria mellonella* densovirus (GmDNV), *Diatraea saccharalis* densovirus (DsDNV) และ *Periplaneta fuliginosa* densovirus (PFDNV) จากการศึกษาพบว่าความยาวสายดีเอ็นเอของไวรัสอยู่ระหว่าง 4 ถึง 6 กิโลเบส และเมื่อเปรียบเทียบ ลำดับสายดีเอ็นเอพบว่าไม่มีความเหมือนอย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้โปรแกรม Clustal W ยกเว้นพบ 77% ของ ความเหมือนระหว่างไวรัส HPVmon และ HPVchin อย่างไรก็ตามจากการใช้ Phylogenetic tree analysis สามารถจัดกลุ่มของไวรัสที่ศึกษาได้เป็น 2 กลุ่ม (Clade) คือ Clade 1 ประกอบด้วย SMVmon, PFDNV, DsDNV, GmDNV, JcDNV และ BmDNV, Clade 2 ประกอบด้วย HPVmon, HPVchin, IHHNV, AaDNV และ AaeDNV จะเห็นได้ว่าไวรัสก่อโรคในกุ้งทั้งสี่ชนิดกระจายอยู่ทั้งสองกลุ่มโดยไม่แบ่งแยกไวรัสกุ้งและแมลงออกจากกันอย่างชัดเจน แสดงว่าจากผลการศึกษาทั้งโดยใช้ลำดับสายดีเอ็นเอและโปรตีนนั้นอาจเป็นไปได้ว่าไวรัสกลุ่มนี้มีความใกล้ชิดและสามารถถ่ายทอดไปมาระหว่างกันได้ คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อโดยใช้แบบจำลองยุงและ เดนโซไวรัส (Mosquito-Densovirus) ในการตรวจสอบปรากฏการณ์การทนต่อเชื้อไวรัสก่อโรคที่เกิดขึ้นโดยวิธี ทำให้ยุงติดเชื้อจากไวรัสก่อโรคชนิด Thai densovirus หรือ ATHDNV พบว่าภายใน 5 รุ่นของยุง ที่ทำให้ติดเชื้อต่อเนื่องนั้นมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น $15\% \pm 4.12$ SD เป็น $55\% \pm 6.36$ SD และคณะผู้วิจัยทดสอบการติดเชื้อใน ยุงที่รอดตายโดยใช้วิธี Polymerase Chain Reaction (PCR), Histology, In-Situ Hybridization และ Transmission Electron Microscope (TEM) พบมีการติดเชื้อในยุงกลุ่มดังกล่าวในปริมาณค่อนข้างสูง มีการติดเชื้อแบบถาวร และมีการเจริญเป็นปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มชุดควบคุม คณะผู้วิจัยยังได้เปรียบเทียบลำดับสายนิวคลีโอไทด์ของ ไวรัสในยุงรุ่นที่ 5 กับไวรัสเริ่มต้น พบปริมาณของไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ (Defective Interfering Particle, DIP) เพิ่มขึ้นมากในยุงรุ่นที่ 5 โดยพบ DIP $64\% \pm 5.0$ SD และพบ DIP ในไวรัสเริ่มต้นเพียง $33\% \pm 6.7$ SD จากการทดลองทำให้ทราบว่าปริมาณ DIP ที่สูงมีความสัมพันธ์กับอัตราการรอดที่เพิ่มขึ้นซึ่งสนับสนุนกับรายงานการวิจัย ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยุงชนิด C6/36 ที่มีการติดเชื้อเดนโซไวรัสแบบถาวร ดังนั้นจึงมีความน่าจะเป็นที่จะพบ อัตราการรอดที่เพิ่มขึ้นในโฮสต์ที่มีปริมาณ DIP ที่สูงและมีความเป็นไปได้ว่าในสิ่งมีชีวิตกลุ่มแมลงสามารถพบการติดเชื้อแบบถาวรได้และมีการตอบสนองแบบจำเพาะอันจะนำไปสู่การลดความรุนแรงของการเกิดโรคซึ่งเป็นอันตรายต่อโฮสต์และไวรัสก่อโรคได้

Project Code :
(รหัสโครงการ)

Project Title : STUDY ON INVERTEBRATE HOST-VIRAL INTERACTION USING A
MOSQUITO-PARVOVIRUS MODEL

ชื่อโครงการ : การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) และ
ไวรัส (Virus) โดยใช้แบบจำลอง Mosquito-Parvovirus

Investigator : SONGSAK ROEKRING

Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400
Thailand

ชื่อนักวิจัย : ทรงศักดิ์ ฤกษ์หรั่ง

หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง, คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10400, ประเทศไทย

E-mail Address : reigrings@yahoo.com

Project Period : 1 year

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี

ABSTRACT

Research on cultivated shrimp suggests that they have the capability to tolerate viral pathogens in a highly specific manner by mechanisms currently unknown. The phenomenon is difficult to study in detail because they have a generation time of 1-2 years and lack continuous cell lines. Therefore, we developed a mosquito-densovirus model to examine whether similar phenomena occur in insects. To support the invertebrate host-viral interaction model, we reported on the relationship between shrimp parvoviruses and known insect parvoviruses. Included in the computer analysis were the DNA and putative amino acid sequences of representative insect and shrimp parvoviruses (subfamily Densovirinae). These were the hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon* (HPVmon) and *P. chinensis* (HPVchin), the spawner-isolated mortality virus from *P. monodon* (SMVmon) and the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) from *P. vannamei*. Insect viruses included were *Aedes aegypti* densovirus (AaeDNV), *Ae. albopictus* densovirus (AaDNV), *Junonia coenia* densovirus (JcDNV), *Galleria mellonella* densovirus (GmDNV), *Bombyx mori* densovirus 5 (BmDNV), *Diatraea saccharalis* densovirus (DsDNV) and *Periplaneta fuliginosa* densovirus (PfdNV). Virion size for all these viruses ranged between 18 and 30 nm in diameter and ssDNA genome length was between 4 and 6 kb. Using a Clustal W program with the sequence fragments available, no significant DNA homology was found except for 77% DNA identity between HPVmon and HPVchin. However, phylogenetic trees constructed by comparing DNA genome sequences for putative viral polypeptides, capsid proteins and nonstructural proteins placed the parvoviruses into two Clades: Clade 1 with SMVmon, PfdNV, DsDNV, GmDNV, JcDNV, and BmDNV; and Clade 2 with HPVmon, HPVchin, IHHNV, AaDNV and AaeDNV. The four shrimp parvoviruses fell into two different clades that grouped with different insect parvoviruses. Results based on DNA and proteins sequences suggested that viral transfers may occur between two distantly related arthropod groups. Using the mosquito-densovirus challenge model with a stock densovirus (AThDNV) and 5 generations of mosquitoes, we found a progressive survival increase from 15% $\pm$ 4.12 SD to 55% $\pm$ 6.36 SD. Prevalence of AThDNV infection in surviving mosquito larvae (confirmed by PCR, histology, in situ hybridization and transmission electron microscopy) was relatively high (e.g., 35% in F2) but they grew normally to establish each succeeding generation. After 5 generations, comparison of putative amino acid sequences from genome fragments revealed a significantly higher ($p = 0.003$) maximum estimated prevalence of defective targets in the survivor virus population (64% $\pm$ 5.0 SD) than in the stored viral population (33% $\pm$ 6.7SD). The results paralleled those reported for serially passaged C6/36 mosquito cell cultures infected with densoviruses. There, reduced infection rates are ascribed to the production of defective interfering particles (DIP). Thus, it is possible that the presence of prior AThDNV infections with a high level of DIP contributed to improved survival in our challenged F4 mosquito population. If so, it suggests that persistent viral infections in arthropods may serve in a specific, adaptive manner to reduce the incidence and severity of disease.

Keywords: MOSQUITO, SHRIMP, DENSONUCLEOSIS VIRUS, PARVOVIRUSES, TOLERANCE, ADAPTATION

Project Code :
(รหัสโครงการ)

Project Title : STUDY ON INVERTEBRATE HOST-VIRAL INTERACTION USING A
MOSQUITO-PARVOVIRUS MODEL

ชื่อโครงการ : การศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) และ
ไวรัส (Virus) โดยใช้แบบจำลอง Mosquito-Parvovirus

Investigator : SONGSAK ROEKRING
Centex Shrimp, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400
Thailand

ชื่อนักวิจัย : ทรงศักดิ์ ฤกษ์หรั่ง
หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศ เทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง, คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ 10400, ประเทศไทย

E-mail Address : reigrings@yahoo.com

Project Period : 1 year

ระยะเวลาโครงการ : 1 ปี