
Abstract

Shrimp culture in Thailand has suffered as much as 25% loss from viral diseases. Effective prevention or treatment of viral infected shrimps is not yet achievable. This research aims to develop an effective means to prevent and/or protect *Peneaus monodon* shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) and hepatopancreatic parvovirus (HPV) infection. WSSV caused high mortality in *Peneaus monodon* whereas HPV caused loss in production yield.

RNA interference technology, using dsRNA was employed to prevent WSSV infection and shrimp mortality. Approximately 400bp double stranded RNA corresponding to 6 important WSSV genes (ie1, ie3, pol, rr2, vp26 and vp28) was designed and produced in bacteria *E.coli*. Injection of the dsRNA into shrimp haemolymph gave varying degree of preventing WSSV infection. Double-stranded RNA corresponding to rr2 gene gave the strongest, while that of pol the least (rr2>ie3>vp26=vp28>ie1>pol) protection. rr2-dsRNA could also protect shrimp from mortality if infected with WSSV. A combination of rr2-dsRNA and Rab7-dsRNA which knocked down shrimp gene could also prevent shrimp mortality from WSSV infection.

For prevention of HPV infection, dsRNA (409bp) corresponding to non-structural protein 1 (NS1) and dsRNA (422bp) structural protein (VP) were designed and synthesized in *E.coli*. The HPV infection was experimentally achieved by feeding infected hepatopancreas since experimental infection of HPV by injection was not achievable. Injection of NS1-dsRNA into the haemolymph protected HPV infection more effective than the VP-dsRNA. In addition, NS1-dsRNA could reduce severity of HPV in pond-infected shrimp. This should pave the way to cure HPV infection in shrimp culture.

This research has produced 8 international publications, 1 submitted manuscript and 2 M.Sc. graduates.

Key words : RNA interference, *P. monodon*, WSSV, HPV, PmDENV, double-stranded RNA.

บทคัดย่อ

อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย ประสบปัญหาการสูญเสียมูลค่าการส่งออกประมาณ 25% จากการติดเชื้อไวรัส ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการป้องกันหรือรักษาโรคติดเชื้อไวรัสในกุ้ง งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการป้องกันและลดการสูญเสียจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) และไวรัสตับ (HPV) ในกุ้งกุลาดำ WSSV เป็นไวรัสซึ่งทำให้กุ้งตายอย่างรวดเร็ว ส่วน HPV ทำให้กุ้งติดเชื้อโตช้า ส่งผลต่อการเสียหายในคุณค่า

เทคโนโลยี RNAi สามารถป้องกันและรักษาการติดเชื้อไวรัสหัวเหลืองได้ดี จึงได้นำมาใช้ในการศึกษานี้ โดยในการป้องกันการติดเชื้อ WSSV และการตายจากการติดเชื้อดังกล่าว ได้ออกแบบและสร้าง DNA เส้นคู่ (dsRNA) ขนาดประมาณ 400 เบส ซึ่งมีลำดับเบสตรงกับยีน 6 ชนิด (ie1, ie3, pol, rr2, vp26 และ vp28) ของ WSSV ซึ่งสำคัญในการเพิ่มปริมาณ โดย dsRNA ดังกล่าวได้มีการออกแบบให้สร้างในแบคทีเรีย *E.coli* เมื่อสกัดแยก dsRNA จาก *E.coli* นำมาฉีดเข้าสู่เลือดกุ้งพบว่า สามารถป้องกันการติดเชื้อ WSSV ได้ในระดับต่างๆ โดย dsRNA ต่อ rr2 ให้ผลยับยั้งการเพิ่มจำนวน WSSV ในกุ้งสูงสุด รองลงมาได้แก่ dsRNA ต่อ ie3, vp26, vp28, ie1 และ pol จาก WSSV ($rr2 > ie3 > vp26 = vp28 > ie1 > pol$) เมื่อทดสอบการป้องกันกุ้งตายจาก WSSV ก็พบว่า dsRNA ต่อ rr2 สามารถป้องกันการตายจากเชื้อ dsRNA ต่อ Rab7 (สามารถ knock-down ยีน Rab7 ของกุ้งได้) ก็สามารถป้องกันการตายของกุ้งจากเชื้อ WSSV ได้ดีเช่นกัน

สำหรับการใช้ dsRNA ป้องกันการติดเชื้อ HPV ได้ออกแบบและสร้าง dsRNA ขนาด 409bp ต่อ non-structural protein (NS1) และขนาด 422 bp ต่อ structural protein (VP) โดยทำการสร้างและผลิต dsRNA ดังกล่าว ในแบคทีเรีย *E.coli* เมื่อประสบความสำเร็จในการทำให้กุ้งกุลาดำติดเชื้อ HPV ได้โดยการให้กินต่บกุ้ง จึงได้ฉีด dsRNA เข้าสู่ระบบเลือดกุ้งเพื่อป้องกันการติดเชื้อ HPV พบว่า dsRNA ต่อ NS1 ให้ผลในการป้องกันดีกว่า dsRNA ต่อ VP นอกจากนี้เมื่อใช้ dsRNA ในการรักษากุ้งติดเชื้อ HPV ก็พบว่า dsRNA ต่อ NS1 สามารถลดปริมาณเชื้อ HPV ในกุ้งที่ติดมาแล้วจากบ่อเลี้ยงได้ ผลการทดลองนี้กำลังนำไปสู่วิธีการรักษากุ้งติดเชื้อ HPV ในบ่อเลี้ยงในอนาคต

งานวิจัยนี้ได้ผลิตผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 8 เรื่อง และกำลังอยู่ในระหว่างพิจารณาตีพิมพ์ 1 เรื่อง พร้อมผลิตนักวิจัยวุฒิปริญญาโท 2 คน