

Abstract

The purpose of this research is to gain understanding on mechanism of both *P. monodon* and *L. vannamei* to response to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection by studying apoptosis process, defective interfering particle (DIP) process, and variation of IHHN virus.

The first part of study is to find the location of apoptotic cells in IHHNV infected tissue in both shrimp and *in situ* hybridization to find the cell that have both positive to *in situ* hybridization and apoptotic cell in tissue. It was found positive apoptosis in connective tissue and hemocyte surround antennal gland, gill, hepatopancreas, neural tissue, subcuticular epithelium and also antennal cells in both *P. monodon* and *P. vannamei*. By *in situ* hybridization of the consequence section of apoptosis section found positive in connective tissue of subcuticular epithelium, connective tissue in gill, antennal gland, epineurium, epithelium cell, antennal cell in only *P. vannamei* which were not the same cells that positive for apoptosis. This result showed that the cells which have apoptosis process were not found the virus inside the apoptotic cells. The result also not found positive for *in situ* hybridization in IHHNV infected *P. monodon* tissue.

The second part is to find the location the DIP process by amplify the IHHNV DNA sequence as long as possible by PCR and run gel electrophoresis. The result of running gel got only one band by IHHNV ORF1-F and IHHNV ORF1-R primers which cover only ORF1 encoding for nonstructural protein, but could not amplify by IHHNV 53 F and IHHNV 982 R and IHHNV 3ORF-F and IHHNV 3ORF-R primers which cover almost the whole genome and all 3 ORFs sequence, respectively. Because of the result getting only one band and no any small band that meant no defective interfering particle process occur in IHHN virus.

KEY WORDS: IHHNV/ *P. monodon*/ *P. vannamei*/ Apoptosis/DIP

บทคัดย่อ

การวิจัยที่ศึกษาสาเหตุของผลความแตกต่างในการติดเชื้อ IHNV ในกึ่งกุลาดำและกึ่งขาว แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ การหาขบวนการการเกิด Apoptosis และการหาขบวนการการเกิด Infective interfering particle (DIP) ในกึ่งทั้งสองชนิด ซึ่งเชื่อว่าขบวนการ Apoptosis เป็นขบวนการในการควบคุมการกำจัด และจำกัดการขยายตัวของไวรัสของสิ่งมีชีวิตในกึ่งและในคน หนึ่งในสองของขบวนการนี้น่าจะเป็นสาเหตุของการตอบสนองต่อการติดเชื้อของกึ่งสองชนิดแตกต่างกัน ซึ่งเชื่อว่าขบวนการ Apoptosis เป็นขบวนการในการควบคุมการกำจัด และจำกัดการขยายตัวของไวรัสของสิ่งมีชีวิตในกึ่งและในคน ส่วนขบวนการ Defective interfering particle เป็นขบวนการการกำจัดความรุนแรงของเชื้อไวรัสโดยทำให้ไวรัสที่เพิ่มจำนวนนั้นเป็นไวรัสที่มีความยาวของสาย DNA สั้นลงไปเรื่อยๆจนไม่สามารถต่อความรุนแรงของโรคให้กับ cell เจ้าบ้านได้ (host)

การทดลองแรกจะเป็นการหาดำแหน่งการเกิด apoptosis และหาดำแหน่งของไวรัส IHNV โดยวิธี *in situ* hybridization ใน serial section slide ที่ต่อเนื่องกันเพื่อจะดูว่าเซลล์ที่เกิด apoptosis นั้นเกิดมีไวรัส IHNV อยู่ด้วยหรือไม่ ผลปรากฏว่าเซลล์ที่เกิด apoptosis จะพบที่บริเวณ connective tissue ที่ล้อมรอบเซลล์และอวัยวะต่างๆของเนื้อเยื่อกึ่งทั้งสองชนิด เช่น antennal gland, gill, hepatopancreas, epithelium, epineurium, pleopod, subcuticular tissue แต่จากการทำ *in situ* hybridization พบว่าเซลล์ที่พบ IHNV นั้นเป็นคนละเซลล์กับที่เกิด apoptosis แต่อย่างไรก็ตาม การเกิด apoptosis อาจจะเป็นขบวนการที่เกิดขึ้นปกติก็ได้ แต่อย่างน้อยก็สามารถพิสูจน์ได้ว่าเซลล์ที่เกิด apoptosis นั้นไม่พบไวรัสภายในเซลล์นั้นอาจหมายความว่าขบวนการเกิด apoptosis นั้นช่วยกำจัดไวรัสในเซลล์ที่ติดเชื้อด้วย

ส่วนการทดลองที่สองจะเป็นการหาการเกิดขบวนการ defective interfering particle (DIP) โดยการ design primers ที่ยาวให้มากที่สุด เพื่อนำมา amplify extracted DNA ของทั้งกึ่งกุลาดำและกึ่งขาว ได้ design primer มา 3 คู่ 2 คู่แรกจะยาวมากที่ครอบคลุมทั้ง 3 ORFs ของ IHNV genome แต่ไม่สามารถ amplify DNA ออกมาได้จึงต้อง amplify คู่ที่สามออกมาซึ่งสั้นลงโดย primer คู่ใหม่นี้จะครอบคลุมเฉพาะช่วงที่เป็น ORF1 ซึ่งเป็นช่วงที่เป็น non-structural protein ที่เกี่ยวกับ enzyme ที่ใช้ในการ replicate DNA ของ IHNV แต่ผลปรากฏว่า primer คู่ที่ 3 นี้สามารถ amplify extracted DNA ได้แต่ได้แค่ band เดียวซึ่งก็หมายความว่าไม่มีส่วนที่เป็น small fragment ที่เกิดจากการเกิดขบวนการ defective interfering particle จากผลการทดลองสรุปได้ว่าไวรัส IHNV ไม่ได้ใช้ขบวนการ DIP ในการ

ปรับตัวให้เข้ากับกุ้ง จากการที่ primer 2 คู่แรก amplify extracted DNA ไม่ได้ อาจเกิดจากการที่มี variation ของ DNA sequence ของ IHNV ในตำแหน่ง primers ของทั้งคู่

จึงทำการทดลองส่วนที่สามขึ้นเพื่อหา variation of IHNV จากจังหวัดต่างของประเทศไทยดังนี้ จันทบุรี ฉะเชิงเทรา ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างเชื้อไวรัสจากฝั่งตะวันออกของไทย สมุทรสงคราม ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างจาก อ่าวไทยตอนบนของไทย ระนอง พังงา ภูเก็ต ซึ่งเป็นตัวแทนของตัวอย่างจากภาคใต้ฝั่งทะเลอันดามันของไทย ชุมพร นครศรีธรรมราช เป็นตัวแทนของตัวอย่างจากภาคใต้ฝั่งอ่าวไทยของไทย ปรากฏพบว่าเป็นในประเทศไทยเรานั้น มี IHNV อยู่สองสายพันธุ์ โดยการใช้ primers 9 คู่ที่ต่อเนื่องกันจนครอบคลุม 94.5% ของสาย IHNV genome ซึ่งทั้ง 9 คู่นี้สามารถ amplify ตัวอย่างเฉพาะกุ้งกุลาดำจาก จังหวัดจันทบุรี และกุ้งขาวจาก จังหวัดจันทบุรี ส่วนจากจังหวัด ฉะเชิงเทรา ภูเก็ต นครศรีธรรมราช amplify ได้เฉพาะ ส่วนที่เป็น ORF3 ซึ่งเป็นส่วนที่จะไปเป็น nucleocapsid ของไวรัสที่เท่านั้นซึ่งเชื่อกันว่าเป็นส่วนที่น่าจะเกิดมี variation มากกว่าส่วนอื่นๆของไวรัส ส่วนตัวอย่างจาก ชุมพร ระนอง พังงา ไม่สามารถ amplify ได้ต่อเนื่องจนได้ครบ ORF ได้จึงไม่ปรากฏอยู่ใน phylogenetic tree ส่วนที่ไม่สามารถ amplify ได้นั้นอาจจะต้องมีการพิสูจน์ต่อไปว่ามี DNA ไวรัสตัวนี้ insert เข้าไปใน DNA ของกุ้งหรือไม่