การใช้ double-stranded RNA ในการพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง

บุญเสริม วิทยชำนาญกุล
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ และ หน่วยวิจัยแห่งความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร 10400
Email: wboonsirm@yahoo.com

บทนำ

ปัจจุบัน อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งได้ใช้ลูกกุ้งที่ผ่านการพัฒนาสายพันธุ์มากขึ้น (Withyachumanrnkul *et al.*, 1998) เพราะลูกกุ้งเหล่านี้โตเร็วกว่าลูกกุ้งที่ไม่ได้รับการพัฒนาสายพันธุ์ ผู้เพาะเลี้ยงกุ้งต้องการกุ้งที่โตเร็วและไม่เป็นโรคในระหว่างการเพาะเลี้ยงและโรงเพาะฟักต้องการพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ผลิตลูกกุ้งได้จำนวนมาก นักพันธุศาสตร์มีส่วนช่วยวิจัยให้กุ้งเศรษฐกิจ เช่นกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* กุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* และกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* โตเร็วขึ้น และมีประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์สูงขึ้น แต่ดูเหมือนว่าอุตสาหกรรมยังต้องการงานวิจัยที่จะทำให้กุ้งแข็งแรง หรือไม่เป็นโรคระบาด อยู่อีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง งานวิจัยที่สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม

บทความนี้จะเน้นที่การทำให้กุ้งปลอดโรคและงานวิจัยที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้ง โดยการใช้ double-stranded RNA (dsRNA) ซึ่งเป็นหนึ่งในหลายวิธีที่นำไปสู่ผลผลิตที่ต้องการได้

กลไกการทำงานของ dsRNA

สาร dsRNA คือ RNA สายคู่ที่อาจจะมีอยู่แล้วในเซลล์ หรือเป็น RNA แปลกปลอมที่เข้าไปในเซลล์ และถูกตัดออกเป็น RNA สายคู่ขนาดสั้นๆ ประมาณ 20-25 nucleotides ด้วยโปรตีนภายใน cytoplasm ที่เรียกว่า Dicer ซึ่งเป็น ribonuclease protein ชนิดหนึ่ง RNA สายคู่สั้นๆ นี้เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) ซึ่งจะแยกออกเป็น RNA สายเดี่ยวที่เรียกว่า passenger strand และ guide strand ส่วนที่เป็น passenger strand จะสลายไป แต่ส่วนที่เป็น guide strand จะเข้าไปจับกับโปรตีนอีกชนิดหนึ่งใน cytoplasm ที่เรียกว่า RNA-induced silencing complex หรือ RISC ส่วนของ RNA สายดี่ยวที่เรียกว่า guide strand นี้จะไปจับกับ messenger RNA (mRNA) ที่มันจับได้ คือมี nucleotide sequences ที่ complementary กับมัน หลังจากนั้นโปรตีนที่เป็น endonuclease ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Argonaute ที่มีอยู่ใน RISC จะทำการย่อยสลาย mRNA ที่จับกับ guide strand นั้น

ดังนั้น หากมีการสร้าง dsRNA ให้มี sequence ที่สามารถจับได้กับ mRNA ชนิดหนึ่งชนิดใดได้ mRNA ชนิดนั้น ซึ่งเป็นสิ่งที่ถูก transcribed ออกมาจาก gene ก็จะถูกทำลายไป ทำให้ gene นั้น ไม่สามารถสร้างโปรตีน หรือทำงานได้ ดังนั้น dsRNA จึงสามารถหยุดการทำงานของ gene บางชนิดได้

โดยนัยเดียวกัน หากสามารถสร้าง dsRNA ที่จับกับ gene ของ virus ที่เข้ามาในตัวกุ้ง ก็สามารถหยุดการทำงานของ gene ของไวรัสนั้น และอาจทำให้ virus ชนิดนั้นไม่สามารถเพิ่มจำนวนภายในเซลล์กุ้งได้

การทำให้กุ้งปลอดโรคด้วยการใช้ dsRNA

ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (ศวพก.) ซึ่งเป็นหน่วยงานภายใต้การกำกับของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ได้วิจัยและผลิตกุ้งกุลาดำปลอดโรคจำเพาะ (specific pathogen-free, SPF) มาเป็นเวลากว่าสิบปี (Withyachumanrnkul *et al.*, 1998, 2001; Tangprasittipap *et al.*, 2010) เนื่องจากโรคของกุ้งที่สำคัญส่วนใหญ่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ดังนั้น ศวพก จึงได้ตั้งเป้าหมายให้กุ้งกุลาดำที่ผลิตจากศูนย์ฯ ปลอดการติดเชื้อไวรัส 8 ชนิด (ตารางที่ 1) วิธีการทำให้ปลอดเชื้อคือการกำจัดกุ้งที่ติดเชื้อ

(จากการตรวจเชื้อด้วยวิธี polymerase chain reaction, PCR) ออกก่อนที่จะนำเข้ามาสู่ ศวพก และจากความพยายามนั้น ศวพก. ได้มีกุ้งที่ปลอดเชื้อไวรัสที่ก่ออันตรายสูง ได้แก่ WSSV และ YHV (Wongteerasupaya *et al*., 1995a, 1995b, 1997; Flegel *et al*., 1997; Withyachumnarnkul, 1999; Walker *et al*., 2001) และไวรัสอีกหลายชนิด แต่ยังมีไวรัสสองชนิดที่ยังคงอยู่ ได้แก่ IHHNV และ LSNV ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ไม่ทำอันตรายต่อกุ้งกุลาดำมากนัก อาจทำให้โตช้ากว่าปกติหากติดเชื้อรุนแรง อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ ศวพกจึงได้พยายามกำจัดเชื้อไวรัสทั้งสองนี้ออกจากระบบ งานวิจัยที่เสนอนี้เป็นการกำจัด LSNV ออกจากกุ้งกุลาดำของ ศวพก.

ตารางที่ 1 เชื้อไวรัสในกุ้งกุลาดำที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้งพยายามกำจัดออกจากระบบ และผลของความพยายาม

เชื้อไวรัส	**ผลของความพยายาม**
Gill-associated virus (GAV)	สามารถกำจัดออกได้หมด
Hepatopancreatic parvovirus (HPV)	สามารถกำจัดออกได้หมด
Infectious hypodermal and haematopietic necrosis virus (IHHNV)	ยังไม่สามารถกำจัดออกได้หมด
Laem-Singh Virus (LSNV)	ยังไม่สามารถกำจัดออกได้
Monodon baculovirus (MBV)	สามารถกำจัดออกได้หมด
Taura syndrome virus (TSV)	สามารถกำจัดออกได้หมด
White-spot syndrome virus (WSSV)	สามารถกำจัดออกได้หมด
Yellow-head virus (YHV)	สามารถกำจัดออกได้หมด

กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อ LSNV มีอาการโตช้า ซึ่งเกิดจากการทำลายระบบประสาทส่วนที่อยู่ในก้านตาของกุ้ง และทำให้ฮอร์โมน crustacean hyperglycemic hormone ที่ผลิตในประสาทส่วนนั้น ลดน้อยลง การลดลงของฮอร์โมนชนิดนี้ทำให้น้ำตาลในเลือดกุ้งลดน้อยลง ซึ่งก่อผลให้กุ้งไม่สามารถเจริญเติบโตได้เป็นปกติ กุ้งที่ติดเชื้อ LSNV แต่เชื้อไวรัสนี้ไม่ได้เข้าไปทำลายระบบประสาทส่วนนั้น จะยังคงเจริญเติบโตเป็นปกติ ดังนั้นในภาพรวมของการเพาะเลี้ยงในบ่อเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ กุ้งในบ่อจะมีขนาดต่างๆ กัน มีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ของน้ำหนักตัวสูงกว่ากุ้งปกติ ส่งผลให้ค่า coefficient of variation (CV) ซึ่งคำนวณจากสูตร (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน x 100)/ค่าเฉลี่ย มีค่าสูงกว่าบ่อกุ้งปกติ ค่า CV ที่สูงนี้เป็นหนึ่งในลักษณะของกุ้งในบ่อเพาะเลี้ยงที่ติดเชื้อ LSNV (Chayaburakul *et al*., 2004; Anantasomboon *et al*., 2006; Sritunyalucksana *et al*., 2006; Pratoomthai *et al*., 2008, 2012)

กุ้งสามารถติดเชื้อ LSNV ได้จากพ่อแม่พันธุ์ (vertical transmission) และติดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ที่อยู่ในแหล่งน้ำ เช่นจากกุ้งอีกตัวหนึ่งที่อยู่ใกล้ชิดกันได้ (horizontal transmission) (Anantasomboon *et al*., 2006)

ได้ทดลองสร้าง dsRNA ที่ทำลายจำเพาะต่อ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัส LSNV โดยเตรียมได้จากแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่ได้รับชิ้นส่วน nucleotide ที่สามารถสร้าง dsRNA ชนิดนี้ขึ้นมาได้ (Saksmerprome *et al*., 2009, 2013)

หลังจากนั้นได้ทดลองฉีด dsRNA ที่สกัดจาก *E. coli* นั้นเข้าไปในตัวพ่อแม่พันธุ์ก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์หรือวางไข่ ได้ผลคือพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ได้รับ dsRNA นั้นมีปริมาณเชื้อ LSNV น้อยลง แต่ไม่หมด ลูกกุ้งที่เกิดจากแม่กุ้งเหล่านั้นติดเชื้อ LSNV น้อยลง แต่หลังจากที่เพาะเลี้ยงไป 1-2 เดือน ก็พบการติดเชื้อมากขึ้นเหมือนกับลูกกุ้งที่เกิดจากแม่กุ้งที่ไม่ได้รับ dsRNA

การฉีดเข้าไปในพ่อแม่พันธุ์กุ้งนั้นต้องใช้เวลาและกำลังคน ต้องทดลองหาปริมาณที่เหมาะสมของ dsRNA และที่สำคัญกว่านั้นคือ ความเครียดของพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่เกิดจากการฉีด dsRNA หรือ dsRNA นั้นเอง อาจทำให้การสร้างอสุจิและไข่ ไม่สมบูรณ์ หรืออาจทำให้แม่กุ้งไม่วางไข่ (spawning)

ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่ายังไม่สามารถใช้ dsRNA ฉีดเข้าไปในพ่อแม่พันธุ์กุ้ง เพื่อให้ลดการติดเชื้อ LSNV ได้ จนกว่าจะต้องมีกรรมวิธีที่เหมาะสมและปริมาณที่เหมาะสม ที่ไม่มีผลกระทบต่อการสืบพันธุ์และการวางไข่

ต่อมาได้ผสม dsRNA เข้าไปในอาหารกุ้ง เพื่อให้กุ้งกิน และตรวจปริมาณของ LSNV ในตัวกุ้ง การเจริญเติบโต และค่า CV ของกุ้ง การให้ dsRNA โดยผ่านการกินนี้อาจจะประสบปัญหาเรื่องการทำลายของ dsRNA ในกระเพาะและลำไส้ของกุ้ง หรือปัญหาด้านการดูดซึม dsRNA ที่เป็น macromolecule ผ่านผนังลำไส้ได้ แต่อาจเป็นไปได้ว่าระบบการย่อยและดูดซึมสารอาหารของกุ้งนั้น ไม่เหมือนกับสัตว์อื่นๆ

ได้ทดลองผสม dsRNA เข้าไปในอาหารกุ้งและเพาะเลี้ยงกุ้งจากระยะ postlarva 15 ไปเป็นเวลา 4 เดือน พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของ dsRNA ปริมาณ 6 มก. ต่อ 1 กก. อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโตที่สูงกว่ากุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่า CV ที่ต่ำลง จากการวัดการติดเชื้อ LSNV ด้วย reverse transcriptase PCR พบว่ากุ้งติดเชื้อ LSNV น้อยลงด้วย (Saksmerprome *et al*., 2013)

ได้ทดลองให้ dsRNA แบบให้กุ้งกิน (feeding) ในกุ้งที่อยู่ในระยะอนุบาล คือระยะ postlarva ด้วย กุ้งในระยะนี้จะกินอาหารที่มีชีวิต ซึ่งคือ *Artemia* sp. ได้ทดลองเลี้ยง *Artemia* ด้วย *E. coli* ที่สร้าง dsRNA นี้ และนำ *Artemia* นี้ไปให้ลูกกุ้งระยะ postlarva กิน หลังจากนั้น 15 วัน ได้ตรวจหาปริมาณของ LSNV ในลูกกุ้งเหล่านั้น พบว่า ลูกกุ้งที่กิน *Artemia* ที่มี dsRNA นี้มีการติดเชื้อ LSNV น้อยลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับลูกกุ้งที่กิน *Artemia* ปกติ (Saksmerprome *et al*., in press)

สรุปได้ว่า การใช้ dsRNA ต่อต้าน RdRp ของเชื้อไวรัส LSNV โดยให้กุ้งกินอาหารผสม dsRNA นี้ ทำให้ปริมาณการติดเชื้อ LSNV ในกุ้งน้อยลง ความสำเร็จนี้กำลังได้รับการขยายผลโดยการนำวิธีการนี้ไปใช้กับเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ของกุ้ง โดยเฉพาะชนิดที่ก่อโรครุนแรง เช่น WSSV และ YHV

การใช้ dsRNA เพื่อให้กุ้งวางไข่โดยไม่ต้องตัดตา

แม่พันธุ์กุ้งมี gonad-inhibiting hormone (GIH) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของรังไข่ ฮอร์โมนนี้สร้างขึ้นที่ระบบประสาทที่อยู่ในก้านตาของกุ้ง โดยธรรมชาติ เมื่อแม่กุ้งมีความพร้อม GIH จะถูกสร้างน้อยลง รังไข่จะเริ่มเจริญเจริญเติบโต จนกระทั่งมีจำนวนเซลล์ไข่มากเต็มที่ (ovarian maturation) ตามด้วยการวางไข่ ในอุตสาหกรรม การรอให้แม่กุ้งวางไข่เองโดยธรรมชาติ อาจจะช้าเกินไป ดังนั้นจึงมีกรรมวิธีตัดตาข้างหนึ่งของแม่กุ้งออก (eyestalk ablation) ซึ่งทำให้ฮอร์โมน GIH ลดลงประมาณครึ่งหนึ่งทันที แม่กุ้งส่วนใหญ่ก็จะเกิด ovarian maturation และวางไข่หลังจากนั้นในเวลาไม่กี่วัน

การตัดตากุ้งเพื่อให้แม่กุ้งวางไข่นี้ เป็นการทารุณสัตว์ แม่กุ้งที่ถูกตัดตามักจะต้องเสียชีวิตหลังจากที่วางไข่แล้ว ดังนั้น จึงได้เกิดงานวิจัยเพื่อลดปริมาณของ GIH ลง เพื่อให้แม่กุ้งวางไข่ โดยการฉีด dsRNA ที่ทำลาย mRNA ที่สร้าง GIH หลังจากฉีดสาร dsRNA ที่จำเพาะนี้ พบว่าแม่กุ้งส่วนหนึ่งเกิด ovarian maturation และเริ่มวางไข่ จำนวนแม่กุ้งที่วางไข่จากกรรมวิธีนี้ สูงกว่าจำนวนแม่กุ้งที่วางไข่เองตามธรรมชาติ แต่ยังต่ำกว่าจำนวนแม่กุ้งที่ถูกตัดตา (Treerattrakool *et al*., 2008, 2011)

งานวิจัยนี้ยังคงต้องได้รับการพัฒนาต่อ เช่นการให้แม่กุ้งกิน dsRNA แทนการฉีด เนื่องจากการฉีดอาจทำให้เกิดความเครียดต่อแม่กุ้งและมีผลทำให้ ovarian maturation และการวางไข่เกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

บทสรุป

การยับยั้งการสร้างโปรตีน หรือเอ็นไซม์ ของเชื้อไวรัสและของเซลล์กุ้งด้วยการให้กุ้งกินสาร dsRNA ที่จำเพาะอาจเป็นสิ่งหนึ่งที่ช่วยพัฒนาสายพันธุ์กุ้งที่ปลอดโรค และเพิ่มความสามารถในการสืบพันธุ์ของกุ้งที่ได้รับการคัดเลือกสายพันธุ์แล้ว

เอกสารอ้างอิง

Anantasomboon G, Sriurairatana S, Flegel TW and Withyachumnarnkul B (2006) Unique lesions and virus-like particles found in growth retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* from East Africa. Aquaculture 253, 197-203.

Chayaburakul K, Nash G, Pratanpipat P, Sriurairatana S, Withyachumnarnkul B (2004) Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon* cultivated in Thailand. Dis Aquat Org 60, 89-96.

Flegel TW, Boonyaratpalin S and Withyachumnarnkul B (1997) Progress in research on yellow-head virus and white-spot virus in Thailand. In *T.W. Flegel and I.H. MacRae (eds.), Diseases in Asian Aquaculture III.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp 285-295.

Pratoomthai B, Sakaew W, Sriurairattana S, Wongprasert K, Withyachumnarnkul B (2008) Retinopathy in stunted black tiger shrimp *Penaeus monodon* and possible association with Laem-Singh Virus (LSNV). Aquaculture 284, 53-58.

Pratoomthai B, Sakaew W, Udomkit A, Wongprasert K, Chang ES, Withyachumnarnkul B (2012) Decreased level of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) in black tiger shrimp *Penaeus monodon* suffering from Monodon Slow-Growth Syndrome (MSGS). Aquaculture 350-353, 19-25.

Saksmerprome V, Charoonnart P, Gangnonngiw W, Withyachumnarnkul B (2009) A novel and inexpensive application of RNAi technology to protect shrimp from viral disease. J Virol Methods 162, 213-217.

Saksmerprome V, Thammasorn T, Jitrakorn S, Wongtripop S, Borwornpinyo S, Withyachumnarnkul B (2013) Using double-stranded RNA for the control of Laem-Singh Virus (LSNV) in Thai *P. monodon*. J Biotechnology 164, 449-453.

Sritunyalucksana K, Apisawetakan S, Boon-nat A, Withyachumanrnkul B, Flegel T (2006) A new RNA virus found in black tiger shrimp *Penaeus monodon* from Thailand. Virus Res 118, 31-38.

Tangprasittipap A, Tiensuwan M, Withyachumnarnkul B (2010) Characterization of candidate genes involved in growth of black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 307, 150-156.

Treerattrakool S, Panyim, S, Chan SM, Withyachumnarnkul B, Udomkit A (2008) Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. FEBS Journal 275, 970-980.

Treerattrakool S, Panyim S, Udomkit A (2011) Induction of ovarian maturation and spawning in Penaeus monodon broodstock by double-stranded RNA. Mar Biotechnol 13, 163-169.

Walker PJ, Cowley JA, Spann KM, Hodgson RAJ, Hall MR and Withyachumnarnkul B (2001) Yellow Head Complex Viruses: Transmission cycles and topographical distribution in the Asia-Pacific region. In the New Wave: Proceeding of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aqauculture 2001. CL Browdy and DE Jory (eds). Pp 227-237. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Withyachumanrnkul B, Boonsaeng V, Flegel T, Panyim S and Wongteerasupaya C (1998) Domestication and selective breeding of *Penaeus monodon* in Thailand. In Special Session on Advances in Shrimp Biotechnology, Fifth Asian Fisheries Forum, Chiengmai, Thailand, November 11-14, pp 73-77.

Withyachumnarnkul B (1999) Results from black tiger shrimp *Penaeus monodon* culture ponds stocked with postlarvae PCR-positive or -negative for white-spot syndrome virus (WSSV). Dis Aquat Org 39: 21-27.

Withyachumnarnkul B, Plodphai P, Nash G and Fegan D (2001) Growth rate and reproductive performance of F4 domesticated *Penaeus monodon* broodstock In The 3rd National Symposium of Marine Shrimp, November 8-9, 2001 Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 33-40.

Wongteerasupaya C, Vickers JE, Sriurairatana S, Nash GL, Akrajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B and Flegel TW (1995a) A non-occluded, systemic baculovirus that occurs in cells of ectodermal and mesodermal origin and causes high mortality in the black tiger prawn, *Penaeus monodon*. Dis Aquat Org 21: 69-77.

Wongteerasupaya C, Sriurairatana S, Vickers JE, Akrajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B and Flegel TW (1995b) Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Dis Aquat Org 22: 45-50.

Wongteerasupaya C, Tongchuea W, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B and Flegel TW (1997) Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Dis Aquat Org 31: 181-186.