



## รายงานการวิจัย

การติดตามตำแหน่งการติดเชื้อไวรัสเอ็มบีวีภายในเซลล์ของรังไข่ ไข่หลังการวางไข่และนอเพเลียสของกุ้งกุลาดำด้วยเทคนิค *in situ* hybridization  
Following the site of Monodon baculovirus (MBV) infection in cell of ovaries, eggs and nauplius of *Penaeus monodon* by *in situ* hybridization

ผศ. ดร. ดวงแขติตา กาญจนโสภา

ผศ. ดร. ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที

ผศ. ดร. รพีพรรณ วานิชวิริยกิจ

ศ. ดร. บุญเสริม วิทย์ชำนาญกุล

ได้รับงบประมาณจาก

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ประเภททั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555

## บทคัดย่อ

เชื้อโมโนตอนบาคุโลไวรัสหรือเชื้อเอ็มบีวีเป็นสาเหตุทำให้กุ้งโตช้า เนื่องจากเชื้อเข้าทำลายตับอ่อนกุ้ง ซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญเกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารและเป็นแหล่งสะสมสารอาหาร เชื้อไวรัสจะถ่ายทอดจากพ่อแม่พันธุ์ที่เป็นโรคไปยังลูกกุ้งโดยผ่านทางไข่แม่กุ้งซึ่งปนเปื้อนเซลล์ตับที่มีเชื้อไวรัส ในทางปฏิบัติเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะใช้สารเคมีในการล้างไข่และนอเปลือยกุ้งในการกำจัดเชื้อไวรัสบริเวณผิว เพื่อป้องกันการติดเชื้อไวรัสเข้าลูกกุ้งในระยะต่างๆ อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการล้างไข่กุ้งและนอเปลือยด้วยโพวิดีนแล้วก็ตาม ยังพบการติดเชื้อไวรัสในลูกกุ้งกุลาดำระยะโพลล์ลาวาและจูวีเน ดังนั้น งานวิจัยครั้งนี้ จึงติดตามการติดเชื้อไวรัสของแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำบริเวณตับ รังไข่ ลูกกุ้งระยะนอเปลือย และระยะโพสลา์ร่ว ด้วยเทคนิค Histology Staining, Polymerase Chain Reaction (PCR) *In situ* Hybridization (ISH) และ Immunohistochemistry (IHC) โดยใช้ polyhedrin ซึ่งเป็นโปรตีนจำเพาะต่อเชื้อเอ็มบีวีไวรัสเป็นตัวตรวจจับ พบว่า รังไข่ที่รวบรวมจากแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อให้ผลการตรวจด้วย PCR เป็นบวก เมื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่อรังไข่มาตรวจการติดเชื้อด้วย ISH สามารถตรวจพบเชื้อบริเวณเซลล์เมมเบรนไซโตพลาสซึม และนิวเคลียสเมมเบรนของโอโอไซต์เซลล์ ไข่และนอเปลือยที่ได้จากแม่พันธุ์ที่ติดเชื้อผ่านและไม่ผ่านการล้างด้วยโพวิดีนมาตรวจด้วย PCR พบการติดเชื้อในตัวอย่างที่ผ่านการล้างและไม่ล้างโพวิดีน นำตัวอย่างไปตรวจด้วยวิธี ISH พบเชื้อบริเวณ ooplasm และ subcuticular และในตัวขนอเปลือย และเมื่อตรวจนอเปลือยด้วยวิธี IHC พบเชื้อในตัวและระยางค์ของนอเปลือย จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การติดเชื้อเอ็มบีวีเป็นแบบ vertically transmit ผ่านทางรังไข่ของแม่พันธุ์กุ้ง ดังนั้นการล้างไข่และนอเปลือยด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อไม่สามารถกำจัดเชื้อเอ็มบีวีที่ส่งผ่านจากแม่พันธุ์สู่ลูกกุ้งได้

## ABSTRACT

*Monodon baculovirus* (MBV) causes slow growth of the shrimp being due to its infection in the hepatopancreas, the organ producing digestive enzymes and for nutrient storage. It has long been documented that the virus is transmitted from broodstock to offspring via contamination in rearing water by feces of the infected broodstock that contained sloughing-off damaged hepatopancreatic cells containing MBV. As a management practice, the washing of eggs and nauplii with disinfectant has been recommended to eliminate MBV that are attached to their surface and thus prevent the infection at the later development stage of the shrimp. However, we detected the MBV infection in postlarvae and juveniles of the black tiger shrimp *Penaeus monodon*, even after our repeated attempts to eliminate the virus by washing the eggs and nauplii with povidone iodine as disinfectant. Therefore we used MBV-infected broodstock to identify the cause of this problem by tracing the presence of MBV in hepatopancreas and ovary of the broodstock, eggs, nauplii and postlarvae, using histology with hematoxylin–eosin staining, polymerase chain reaction (PCR), *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC) specific for polyhedrin, a protein produced by MBV. We found all the ovaries collected from the broodstock, which were detected MBV-positive in the hepatopancreas by histology, PCR and ISH, were also PCR-positive. By ISH, positive signals were detected in the cell membrane, cytoplasm and nuclear membrane of the oocytes. The eggs and nauplii from the MBV-positive broodstock were also positive by PCR, in both “wash” and “no-wash” specimens. By ISH, positive signals were detected in ooplasm and subcuticular region of nauplii, as well as inside its body. Using IHC, positive signals were detected inside the body and appendage of the nauplius. Taken all these together, it is most likely that MBV could be vertically transmitted through trans-ovarian route. Hence, simply washing the eggs and nauplii with disinfectant may not be an adequate procedure to eliminate the MBV infection in offspring from MBV-infected broodstock.