บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กุ้งทะเลเป็นสินค้าอาหารทะเลที่ตลาดโลกมีความต้องการบริโภคสูงและเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเป็นกุ้งทะเลที่ได้จากธรรมชาติซึ่งนับวันจะลดปริมาณลงตามลำดับ ดังนั้นปริมาณของกุ้งทะเลที่ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในอนาคตคือกุ้งทะเลที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ซึ่งประเทศไทยนับเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูงสามารถทำรายได้ให้แก่ประเทศปีละไม่น้อยกว่าหกหมื่นล้านบาท (สิริ ทุกข์วินาศ, 2542) ในปี พ.ศ. 2541 มีรายงานว่าประเทศไทยมีการผลิตกุ้งได้ประมาณ 210,000 เมตริกตันโดย 80% เป็นเกษตรกรรายย่อย (ฟาร์มขนาดเล็ก) ชนิดกุ้งที่เลี้ยง 90% เป็นกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*), 5% เป็นกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus merguiensis*) และ อีก 5 % เป็นกุ้งขาว (*Penaeus indicus*) (ข่าวกุ้ง, 2542)

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกุ้งที่มีคุณภาพและใหญ่ที่สุดประเทศหนึ่งของโลกด้วยปัจจัยที่เอื้ออำนวยหลายประการ ได้แก่ สภาพดินฟ้าอากาศที่อบอุ่นสามารถเพาะเลี้ยงกุ้งได้ตลอดทั้งปี มีแหล่งพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี และมีแหล่งวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารกุ้งจำนวนมาก เป็นต้น โดยจากตัวเลขการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็วโดยตลอด สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรและกรมศุลกากรรายงานว่ามีปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งกุลาดำสดแช่เย็นแช่แข็งของไทยในครึ่งปีแรกของปี พ.ศ. 2545 (มกราคมถึงมิถุนายน) มีปริมาณถึง 77,252 ตันและคิดเป็น มูลค่า 26,359 ล้านบาท (www.oae.go.th/statistic/export) ถึงแม้ว่าเกษตรกรมีการผลิตกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างมาก แต่การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของเกษตรกรยังมีปัญหาอีกมากที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยง เช่น การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ ทำให้เกิดการตกค้าง

ของยาในเนื้อกุ้ง ซึ่งทำให้กุ้งมีความสามารถในการต้านทานต่อยาเพิ่มขึ้น ปัญหาสิ่งแวดล้อม ปัญหาพื้นที่ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสม และปัญหาที่สำคัญอีกอย่างคือ ปัญหาโรคกุ้ง (วรวิทย์ ชีวาพร, 2534)

การเกิดโรคระบาดส่วนหนึ่งมาจากเชื้อไวรัสซึ่งมีมากกว่า 15 ชนิด (Bower *et al.*, 1994 อ้างโดย Sritunyalucksana, 2001) และไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคในกุ้งกุลาดำมีหลายชนิด ไวรัสที่สร้างความเสียหายให้กับวงการกุ้งไทยอย่างมหาศาลคือเชื้อตัวแดงดวงขาว White Spot Syndrome Virus (WSSV) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) ซึ่งไวรัสชนิดนี้ได้แพร่ระบาดและส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำทั่วทั้งภูมิภาคเอเชีย ได้แก่ ประเทศมาเลเซีย จีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน อินเดีย ไทย และยังลุกลามไปในบางพื้นที่ในแถบประเทศสหรัฐอเมริกาอีกด้วย (Chou *et al.*, 1998; Flegel, 1997; Hulten *et al.*, 2000; Peng *et al.*, 1998; Tang *et al.*, 2000) โดยโรคตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำได้พบมีการระบาดในประเทศจีนและญี่ปุ่นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2536-2537 ส่วนในประเทศไทยเริ่มมีการระบาดปลายปี พ.ศ. 2537 ทางด้านภาคตะวันออกและภาคใต้ ตั้งแต่จังหวัดชุมพร สุราษฎร์ธานี สงขลา นครศรีธรรมราช และปัตตานี ในปัจจุบันนี้โรคตัวแดงดวงขาวพบในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำทุกพื้นที่ แต่ความรุนแรงขึ้นอยู่กับฤดูกาลและพื้นที่การเลี้ยง (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2538) โดยลักษณะอาการของโรคที่พบคือ กุ้งที่ป่วยจะลอยขึ้นขอบบ่อ กินอาหารลดลง ตัวกุ้งจะมีสีแดง หรือสีแดงอมส้ม และมีดวงขาวที่เปลือกทั้งในหัวและลำตัว กุ้งจะทยอยตายไปเรื่อยๆ และจะตายหมดบ่อประมาณ 7- 15 วัน (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2543)

ในขณะนี้ได้มีการนำเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค และหาพาหะของโรคเพื่อกำจัดพาหะต่างๆออกไปจากบ่อกุ้ง และใช้ในการคัดเลือกลูกกุ้งหรือพ่อแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไปเพาะเลี้ยงต่อไป แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบวิธีรักษาโรคตัวแดงดวงขาวและการป้องกันที่แน่ชัด ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการที่ไวรัสจะเข้าติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้านนั้นต้องมีการทำปฏิกิริยากับสารภายในเซลล์โดยเฉพาะบริเวณผนังเซลล์ซึ่งเป็นตัวกำหนดการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ เช่น สารที่

เป็นตัวต้อนรับ (receptor) ต่อเชื้อไวรัสบนผิวของเซลล์เจ้าบ้าน นอกจากนั้นยังมีการศึกษาบทบาทของสารเหล่านี้ที่มีผลต่อการชักนำและการยับยั้งการเข้าจับของเชื้อไวรัสต่อเซลล์เจ้าบ้าน (Gilbert *et al.*, 1995) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการเข้าติดเชื้อในกุ้ง ซึ่งพบว่า เชื้อ WSSV ไม่ได้ติดเชื้อในกุ้งทุกชนิด นั่นก็แสดงให้เห็นว่าในกุ้งแต่ละชนิดจะมีสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อหรือไม่ติดเชื้อของไวรัสแตกต่างกัน ดังนั้นในระดับโมเลกุลจึงมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการศึกษาถึงคุณสมบัติและลักษณะของสารเหล่านั้น และพบว่าหากสามารถค้นหาสารที่มีปฏิกิริยากับไวรัสได้ ทำให้สามารถนำสารเหล่านั้นมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อของไวรัสต่อไป

ในการวิจัยครั้งนี้จึงทำการค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ โดยเลือกค้นหายีนในเลือดของกุ้งกุลาดำ ซึ่งพบว่าเป็นอวัยวะเป้าหมายของไวรัส WSSV และศึกษารายละเอียดลำดับยีนที่ได้เพื่อนำไปเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาสารต่างๆที่สามารถนำไปใช้ในการป้องกันและรักษาโรคตัวแดงดวงขาวต่อไป

1.2 บทตรวจเอกสาร

กุ้งกุลาดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Penaeus monodon* Fabricius และมีชื่อสามัญว่า Black tiger prawn

1.2.1 ทางอนุกรมวิธาน จัดกุ้งอยู่ในอันดับต่อไปนี้ (ประจวบ หลำอุบล, 2531)

Phylum Arthropoda,

Class Crustacea,

Subclass Malacostraca,

Superorder Eucarida,

Order Decapoda,

Suborder Natantia,

Family Penaeidea,

Genus *Penaeus*

1.2.2 ชีววิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำ เป็นกุ้งทะเลที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในเอเชีย มีเปลือกหัวเกลี้ยง ไม่มีขน ผิวเป็นมัน หนวดมีสีเทาปนเขียวหรือน้ำตาล ส่วนระยางมีสีน้ำตาลอ่อน และขนอ่อนมีสีแดงโดยรอบ ลำตัวกุ้งมี 19 ข้อปล้อง แต่ละปล้องมีระยางค์ 1 คู่ โดยส่วนหัวรวมกับส่วนอกอยู่ภายใต้เปลือกคลุมหัว (carapace) บนเปลือกคลุมหัวมีกรี (rostrum) ลักษณะเรียวแหลมโค้งเล็กน้อย ยื่นออกไปข้างหน้ายาวกว่าลูกตาเล็กน้อย ฟันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ด้านข้างกรีมีรอยสันนูน (abrostral carina) ทั้งสองด้านแคบและยาวไม่ถึงฟันกรีสุดท้าย ลูกตาติดอยู่กับก้านตาที่ยื่นออกมาจากเบ้าตา สามารถโยกคลอนได้ ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีเอกโซโพไดท์ (exopodite) สีของตัวกุ้งมีสีน้ำตาลเข้มและแถบสีเข้มกับจางพาดขวางลำตัว ขนาดโตเต็มที่มีความยาว 270 มิลลิเมตร และมีน้ำหนัก 260 กรัม (Motoh, 1981 อ้างโดย วรวิทย์ ชีวาพร และคณะ, 2534) ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำได้แก่ น่านน้ำแถบใต้ของฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และที่พบมาก

ได้แก่ ประเทศไทย สามารถทนอยู่ได้ในน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิและความเค็มสูง ชอบอาศัยอยู่ในพื้นที่ที่เป็นดินโคลน กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์

1.2.3 วงจรชีวิตของกุ้งกุลาดำ

มีลักษณะเช่นเดียวกับกุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ในสกุล *Penaeus* โดยกุ้งที่โตเต็มวัยจะอาศัยอยู่ในทะเลที่มีความลึกในช่วง 20-70 เมตร โดยมีการผสมพันธุ์และวางไข่ในทะเล หลังจากนั้นลูกกุ้งจะอพยพสู่บริเวณชายฝั่งเพื่อเจริญเติบโต ลูกกุ้งจะหากินและหลบภัยในบริเวณป่าชายเลนจนถึงวัยเจริญพันธุ์ จึงจะอพยพออกสู่ทะเลลึกต่อไปและเมื่อถึงช่วงสืบพันธุ์จะมีการสืบพันธุ์และปล่อยตัวอ่อนออกมา ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาผ่านระยะต่าง ๆ คือ

Nauplius รูปร่างคล้ายแมงมุม ประกอบด้วยระยางค์ 3 คู่ ผ่านการลอกคราบ 6 ครั้ง โดยใช้เวลา 36-40 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ระยะต่อไป โดยระยะนี้ไม่ต้องการอาหารเนื่องจากมีถุงอาหาร (yolk sac) ติดอยู่กับลำตัวจึงสามารถใช้อาหารจากถุงได้

Protozoea ลำตัวยาวขึ้นส่วนหัวและลำตัวแยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัด ลำตัวจะพัฒนาเป็นรอยนูนตรงบริเวณหัว และเชื่อมติดกับก้านตาที่โผล่ออกมา ระยะเวลาที่ใช้ทั้งหมดประมาณ 4-5 วัน

Mysis ระยะนี้ลูกกุ้งมีรูปร่างคล้ายลูกกุ้งวัยรุ่นแล้ว แต่การว่ายน้ำยังแตกต่างกันอยู่คือ ว่ายน้ำแบบหัวทุ่มลงและดีดขึ้นลง การพัฒนาใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 3-4 วัน

Postlarva ลูกกุ้งระยะนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับลูกกุ้งวัยรุ่นมากขึ้น มีอวัยวะต่าง ๆ ครบทุกส่วน และพัฒนาจนเข้าสู่ juvenile ต่อไป ซึ่งระยะนี้กุ้งจะว่ายน้ำขนานไปกับผิวน้ำ โดยเวลาที่ใช้ในการพัฒนาประมาณ 3-7 วัน เมื่อเลี้ยงไปจนถึงช่วง post larva 22-30 วัน ก็สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงต่อไปได้ (วรวิทย์ ชีวาพร และคณะ, 2534)

1.2.4 โรคตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus) = WSSV

ในการเพาะเลี้ยงกุ้งแบบพัฒนา โอกาสที่จะเกิดการสูญเสียจากโรคย่อมเป็นไปได้มาก ถึงแม้ว่าจะมีการดูแลและเอาใจใส่อย่างดี ทั้งนี้ เนื่องจากการเลี้ยงสัตว์น้ำนี้

สภาพแวดล้อมหรือองค์ประกอบอื่นๆทางธรรมชาติยังมีอิทธิพลมาก เป็นต้นว่า อุณหภูมิของน้ำ ความเค็มของน้ำ รวมทั้งความเป็นกรดด่าง สิ่งเหล่านี้ควบคุมได้ยาก เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นสาเหตุโน้มนำก่อให้เกิดโรคต่างๆ ตามมา เป็นต้นว่า การเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่ายขึ้น มีพยาธิเกาะตามภายนอกของตัวกุ้งมากขึ้น ก่อให้เกิดความเสียหายในการเพาะเลี้ยงกุ้งอย่างมาก

1.2.4.1 สาเหตุของโรค

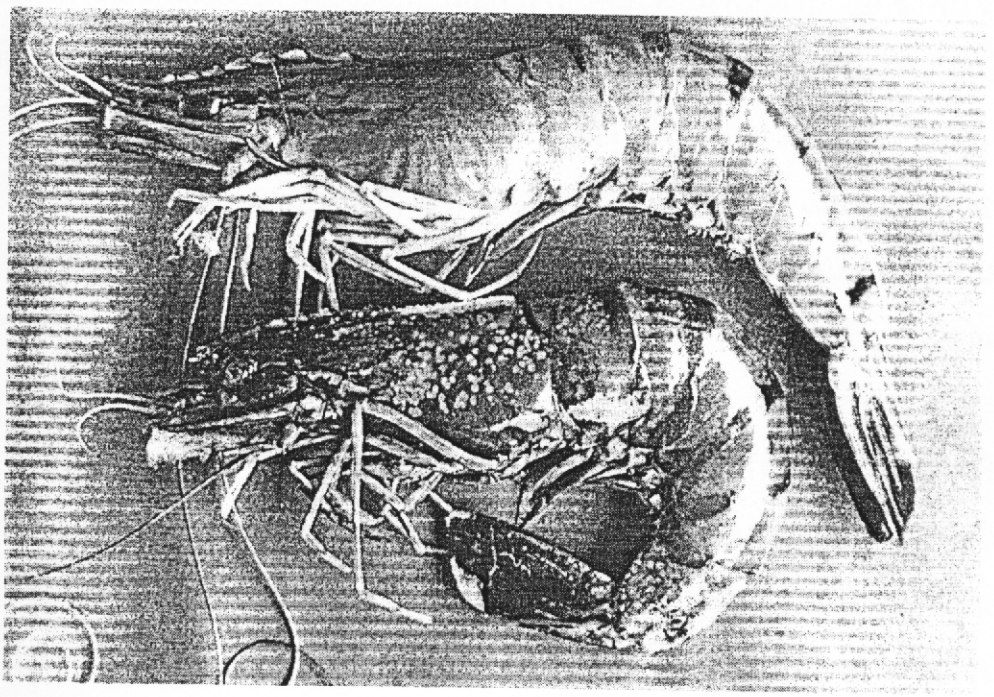
เกิดจากเชื้อไวรัสมีชื่อเรียกว่า Systemic Ectodermal and Mesodermal Baculovirus (SEMBV) เป็นไวรัสที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (Bacilliform) ขนาด 270-290 นาโนเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 110-120 นาโนเมตร มี envelope แบบ trilarmia structure การเพิ่มจำนวนและการรวมตัวเป็นอนุภาคสมบูรณ์ที่เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส มี nucleic acid เป็นชนิดดีเอ็นเอ (จิราพร เกษรจันทร์และคณะ, 2538) ลักษณะนิวเคลียสที่ตรวจสอบจากกุ้งที่เป็นโรคที่พบในประเทศไทยนั้น ในระยะแรกจะเห็นนิวเคลียสคล้าย Cowdry A inclusion ซึ่งต่อมานิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้นและติดสี acidic มากขึ้น ซึ่งในระยะนี้ยังพอมองเห็นส่วนไซโทพลาสซึมอยู่บ้าง แต่ในระยะสุดท้ายการติดสีจะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงินอ่อน (basophilic) ซึ่งนิวเคลียสจะขยายใหญ่จนเต็มเซลล์ (hypertrophied nuclei) (Wang *et al.*, 1998) นอกจากนั้นเมื่อทำการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า อนุภาคไวรัสที่มีแท่งนั้น ไม่มีเกราะโปรตีนหุ้ม (non-occluded virus) (Wongteerasupaya *et al.*, 1996)

จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ (2538) ได้ทำการทดลองฉีดกุ้งปกติด้วยสารสกัดที่ปราศจากเชื้อแบคทีเรียจากเหงือกกุ้งเป็นโรค พบว่าลำตัวกุ้งที่ฉีดด้วยสารสกัดจะมีสีแดงหรือแดงอมชมพู และมีดวงสีขาวที่เปลือก กุ้งจะตายหมดภายใน 5-7 วัน หลังจากฉีด เมื่อนำเหงือก หัวใจ ลิมฟอยด์ ออร์แกน ของกุ้งที่เป็นโรคทั้งจากบ่อเลี้ยง และกุ้งที่ได้จากการทดลองฉีด ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสที่มีรูปแท่ง (bacilliform morphology) จากอวัยวะดังกล่าว และจากการตรวจสอบ

ลักษณะทางพยาธิสภาพของกุ้งที่เป็นโรคความผิดปกติของนิวเคลียสจากเซลล์เนื้อเยื่อในหลายอวัยวะที่มีกำเนิดมาจาก ectoderm และ mesoderm

อวัยวะที่มีการติดเชื้อ WSSV ในกุ้งกุลาดำมีดังนี้คือ เหงือก (gill), เนื้อเยื่อใต้เปลือก, อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (haemopoietic tissues), ลิมฟอยด์ ออร์แกน (lymphoid organ), เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue), กระเพาะอาหารและท่อทางเดินอาหาร เป็นต้น (Hameed *et al.*, 1998; Nunan *et al.*, 1998; Wongteerasupaya *et al.*, 1995; Takahashi *et al.*, 1994)

Wongteerasupaya และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาลักษณะของ non-occluded baculovirus ในกุ้งกุลาดำ โดยใช้เทคนิค transmission electron microscope (TEM) ดูลักษณะนิวเคลียสของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อจะมีลักษณะต่างจากไวรัสหัวเหลืองซึ่งไวรัสตัวนี้จะทำให้นิวเคลียสของเนื้อเยื่อกุ้งที่ติดเชื้อบวมโต พบมากบริเวณ epithelial cell ของกระเพาะอาหาร และเหงือก เป็นต้น โดยในการทดลองจะได้ดีเอ็นเอของไวรัสที่มีขนาดประมาณ 168 kb ซึ่งไม่เกิด cross-hybridization กับชิ้นดีเอ็นเอของไวรัสหัวเหลือง หรือ monodon baculovirus (MBV)



รูปที่ 1 การเปรียบเทียบลักษณะของกุ้งกุลาดำปกติ (บน) และกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อWSSV (ล่าง) (Hameed และคณะ, 1998)

Figure 1 Normal (upper) and SEMBV –infected (below) *Penaeus monodon*

Hameed และคณะ (1998) ได้ทำการแยกและทำบริสุทธิ์ไวรัส WSSV โดยใช้ 10-50% sucrose density gradient ในการทำบริสุทธิ์ ไวรัสมีความยาว 266 ± 5 nm โดยในการทดลองติดเชื้อไวรัสในกุ้ง *P. indicus* และ *P. monodon* โดยใช้วิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular injection) และการให้โดยการกิน (oral route) ซึ่งพบ WSSV ในเลือด, ก้านตา, เหงือก, เนื้อเยื่อส่วนหัว และกล้ามเนื้อส่วนท้อง แต่ไม่พบในเนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) ในกุ้งกุลาดำ โดยวิธีที่ใช้ในการตรวจหา WSSV คือ เทคนิค nitrocellulose-enzyme immunoblot (NC-EIB) โดยใช้ antiserum ต่อไวรัสโปรตีนที่ผลิตจากหนู และเทคนิค competitive ELISA แล้วเมื่อนำโปรตีนที่ได้จากอวัยวะต่างๆ มาทำ SDS-PAGE จะได้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 3 ขนาด คือ 18, 22 และ 27 KDa

Rajan และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้ง *P. indicus* ซึ่งอยู่ในระยะ juvenile และ subadult ในประเทศอินเดียโดยนำเอาเซลล์เนื้อเยื่อชั้นนอกของเหงือกกุ้งซึ่งถูกติดเชื้อด้วยไวรัส WSSV มาทำการย้อมด้วย Davidsan' s fixative โดยผ่านการหั่นให้แต่ละชิ้นมีความหนา 5 ไมโครเมตรแล้วนำมาส่องใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบไวรัสรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped), non-occluded, และมี double-enveloped WSSV ซึ่งไวรัสมีขนาด 154 ± 2 x 373 ± 5 nm และ nucleocapsid มีขนาด 111 ± 1.5 x 293 ± 7 nm และเซลล์จะมีจำนวน golgi complex, endoplasmic reticulum (ER) และ mitochondria ลดลง แต่จะมีขนาดของนิวเคลียสที่ใหญ่จนเต็มเซลล์

1.2.4.2 อาการของโรค

กุ้งที่เป็นโรคดวงขาวจะมีลักษณะจุดขาว หรือดวงขาวแสดงในรูปที่ 1 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-2 มิลลิเมตร กุ้งที่เป็นโรคนี้จะว่ายน้ำอยู่ในบริเวณผิวน้ำ หรือเกยขอบบ่อ ไม่มีแรงดีดตัว กินอาหารลดลง บางครั้งกุ้งมีอาการลอกคราบไม่ออก หรือลอกคราบแล้วไม่แข็งตัว ตัวนิ่ม อัตราการตายของกุ้งหลังจากเกิดโรคขึ้นอยู่กับแหล่งเลี้ยงและฤดูกาล ในช่วงที่มีอากาศหนาวหรือฝนตกหนักติดต่อกันนานๆ อัตราการตายของ

ลูกกุ้งสูงถึง 80-100% ภายในเวลา 4-5 วัน โดยอาการของกุ้งตัวแดง หรือดวงขาวจะพบได้ในกุ้งอายุตั้งแต่ 25 วันขึ้นไปจนถึงขนาดจับขาย แต่ที่ทำความเสียหายให้แก่เกษตรกรมากที่สุดคือ กุ้งที่มีอายุตั้งแต่ 40-70 วัน (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2538)

1.2.4.3 การรับเชื้อของกุ้ง แบ่งเป็น 2 ทาง คือ

1.2.4.3.1 พ่อแม่ของกุ้งที่นำมาเพาะนั้นมีเชื้อไวรัสอยู่ แล้วถ่ายทอดสู่ลูกกุ้ง ซึ่งจิราพร เกษรจันทร์ และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว (WSSV) จากพ่อแม่พันธุ์และลูกกุ้งระยะต่างๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยวิธี PCR และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยแบ่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่ผ่านการตรวจเชื้อไวรัส WSSV ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะกินปูที่ติดเชื้อไวรัส วันละ 1 มื้อ ติดต่อกัน 2, 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ กลุ่มควบคุมให้กินเนื้อปูที่ไม่ติดเชื้อไวรัส ตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส WSSV ในแม่กุ้ง ก่อนวางไข่ 1 วัน พบเชื้อ WSSV ในเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ไข่อ่อน และไข่ที่กำลังพัฒนา จากการทดลองจึงเห็นได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่เชื้อ WSSV สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่กุ้งกุลาดำสู่ลูกกุ้ง โดยเชื้อไวรัสจะเกาะติดที่ผิวไข่ สำหรับไข่อ่อนที่กำลังพัฒนา เชื้อไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสและเพิ่มจำนวนอนุภาค ทำให้ไข่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้

1.2.4.3.2 การรับเชื้อจากพาหะอื่น ๆ หรือสภาพแวดล้อมภายนอก สาเหตุอาจเนื่องมาจากคุณภาพน้ำที่ใช้เลี้ยงไม่ดีพอ ปัญหาการเตรียมบ่อไม่เหมาะสม การปล่อยกุ้งหนาแน่นมาก ระบบการเลี้ยงและฤดูกาล โดยเฉพาะสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนในฤดูหนาวและฤดูฝน มักก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้รวดเร็วขึ้น (พรเลิศ จันทร์รัชชกูล, 2538) การมีกุ้ง, ปูที่แปลกปลอมลงไปในบ่อ หรือแม้แต่นกที่ถ่ายลงในบ่อ นอกจากนี้ในการติดเชื้อไวรัสในการทดลองสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การจุ่มในสารละลายที่มีไวรัส (immersion), การให้เชื้อโดยการกิน (oral route) และ การฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intra muscular injection)

Hameed และคณะ (2000) ทำการศึกษาความสามารถทนต่อการทำลายของเชื้อ WSSV ต่อกุ้งน้ำจืด *Macrobrachium rosenbergii* ซึ่งทำการติดเชื้อไวรัส 3 วิธี คือ

การจุ่มเชื้อ การให้กิน และการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ พบว่า เมื่อทำการจุ่มในเชื้อจะทำให้เกิดการตายของกุ้ง *Macrobrachium lamerrae* และ *Macrobrachium idella* ในอัตรา 43.3 และ 53.3% ตามลำดับส่วนเมื่อให้เชื้อโดยการกินกุ้ง *M. lamerrae* และ *M. idella* มีอัตราการตาย 53.3 และ 66.7% ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อทำการฉีดเชื้อเข้ากล้ามเนื้อกุ้งทุกสปีชีส์มีอัตราการตาย 100% ยกเว้น *M. rosenbergii* ที่ไม่มีผลกระทบเกิดขึ้นเลย แต่ยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่นอน

1.2.4.4 เทคนิควิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส WSSV โดย *in situ* hybridization และ Polymerase Chain Reaction (PCR)

Wongteerasupaya และคณะ (1996) ทำการศึกษาในเรื่องการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อ Pm NOB II (*Penaeus monodon* baculovirus) ที่ให้ผลด้านบวกต่อเชื้อตัวแดงดวงขาว หรือสามารถจับ crosslink กับเชื้อ WSSV ได้ โดยกุ้งที่ติดเชื้อมี 6 ชนิด คือ *Penaeus chinensis*, *P. indicus*, *P. japonicus*, *P. merguiensis*, *P. monodon* และ *Penaeus vannamei* ในการทดลองสกัดดีเอ็นเอของ Pm NOB II แล้วตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Eco*R I จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ Bluescribe vector แล้วถ่ายโอนสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM107 ซึ่งได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้น ขนาด 0.9 และ 4.2 Kbp เป็น probe ซึ่งติดฉลากด้วย dioxygenin แล้วนำไปตรวจหาเชื้อตัวแดงดวงขาว ด้วยวิธี *in situ* hybridization ซึ่งสามารถตรวจหากุ้งที่เป็นโรคได้ทั้ง 6 สปีชีส์

Takahashi และคณะ (1996) ได้ใช้เทคนิค PCR มาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ probe ของเชื้อไวรัสรูปแท่ง RV-PJ ในกุ้ง *P. monodon* ในประเทศญี่ปุ่นโดยทำการสกัด genomic DNAของไวรัสออกจาก lymphoid organ และ gill ของกุ้งที่เป็นโรค แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI กับ *Hind* III เพื่อตัดต่อเข้าสู่พลาสมิด pGEM3zf แล้วถ่ายโอนสู่ *E.coli* XL1-Blue MRF′ แล้วทำการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ที่มีขนาด 643 bp แล้วทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR ซึ่งนำไปใช้เป็น probe ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส RV-PJ และ WSSV แต่ไม่จำเพาะกับไวรัสตัวอื่น ๆ

Wang และคณะ (1998) ได้ทำการพัฒนา primer ที่ออกแบบมาจาก ดีเอ็นเอ ของ WSSV ที่แยกจาก *P. monodon* ในไต้หวัน โดยกุ้งทะเลที่มักพบเชื้อ WSSV ได้แก่ *P. monodon, Penaeus japonicus, Penaeus penicillatus* และ *Metapenaeus ensis* ในกุ้งน้ำจืด ได้แก่ *Exopalaemen orientalis, Trachypenaeus currirostris* และ *Procambarus Clarkii* นอกจากนี้ยังพบในปูน้ำจืด ได้แก่ *Calappa lophos, Charybdis granulata* และ *Charybdis feriata* เป็นต้น โดยในการทดลองใช้ primer 146 F1 และ 146 R1 ซึ่งออกแบบมาจาก Pm NOB III DNA ซึ่งมีความยาว 146 bp แล้วนำมาทำ two-step PCR amplification พบว่าสามารถนำไปตรวจสอบเชื้อไวรัส WSSV ในธรรมชาติ โดยมีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดติดเชื้อ แต่จะมีอวัยวะเป้าหมายของไวรัสที่ต่างกัน

1.2.5 สารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการทำปฏิกิริยากันระหว่างไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้าน

โดยทั่วไประบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตกลุ่ม crustacean ซึ่งรวมทั้งกุ้งกุลาดำเชื่อกันว่าสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular immunity) มักจะใช้เม็ดเลือดเป็นหลักในการต่อสู้สิ่งแปลกปลอมซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ ความสามารถในการกลืนเซลล์โดยวิธี phagocytosis, การเกิด nodule (nodule formation) และการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม (encapsulation) ถ้าสิ่งแปลกปลอมมีขนาดเล็กและมีจำนวนน้อยจะถูกกำจัดโดยกระบวนการ phagocytosis ซึ่งนับเป็นด่านแรกในการป้องกันเมื่อมีพาราไซต์หรือสิ่งแปลกปลอมบุกรุกผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย วิธีในการกลืนเซลล์สิ่งแปลกปลอมจะมีการยื่น cytoplasm ไปล้อมสิ่งแปลกปลอมแล้ว lysosome จะหลั่งสารช่วยย่อยซึ่งมีทั้งสารต่อต้านแบคทีเรียและ hydrolytic enzyme หลังจากทำการย่อยสลายแล้วก็จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายออกมาจากเซลล์ สำหรับการเกิด nodule จะใช้เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้ามาเป็นจำนวนมาก ส่วนการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมจะเกิดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมนั้นมีขนาดใหญ่

ส่วนอีกระบบคือ ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) ซึ่งมีกลไกต่างๆได้แก่ clotting, agglutination และ antimicrobial activity

เลคติน (lectins) หรือ agglutinins หน้าที่สำคัญของเลคตินในระบบภูมิคุ้มกันคือการกำจัดเซลล์ที่ไม่ต้องการไปในระหว่างขบวนการเจริญเติบโต (metamorphosis) และมีส่วมร่วมในปฏิกิริยาการป้องกันการติดเชื้อ โดยสามารถจับกับสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆบนผนังเซลล์ที่ต่างกัน (Maria and Margherita, 2000)

Ma′rcia และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษากลไกการเกาะกลุ่มกันของเซลล์ใน hemolymph ของ *Litopenaeus schmitti* พบว่าเลคตินในเลือดมีความจำเพาะและสามารถจับกับ LPS (lipopolysaccharide) บนเมมเบรนของแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งได้

นอกจากนั้นเอนไซม์ phenoloxidase เป็นเอนไซม์ที่เกิดจากการกระตุ้นของระบบ prophenoloxidase (proPO activating system) ของ crustacean โดย LPS, peptidoglycan และ β-1,3 glucan ซึ่งเป็นสารประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่ง phenoloxidase จะไป oxidize สารกลุ่ม phenol ให้เป็น quinone แล้วเปลี่ยนไปเป็น melanin ต่อไป โดยหน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกันการเจริญเติบโตของพวกเชื้อแบคทีเรียได้ นอกจากนั้นในกลไกการทำงานของเอนไซม์ phenoloxidase จะมีการทำงานของ peroxinectin ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกันการเกาะติดของเซลล์ (cell adhesion molecules) โดย peroxinectin จะสะสมอยู่ใน semi-granular และ granular hemocytes และถูกหลั่งออกมาจับกับ 90 kDa peripheral cell surface superoxide dismutase (SOD) ของ crayfish blood cells จากนั้น integrin ซึ่งเป็น transmembrane protein มีหน้าที่เป็นตัวรับและจดจำสิ่งแปลกปลอม จะจับกับ peroxinectin ทำให้เอนไซม์กลุ่ม SOD และ peroxidase สามารถเข้าทำลายเซลล์ของพาราไซต์ได้ นอกจากนี้ intergrin ยังเกี่ยวข้องในการเคลื่อนย้ายเซลล์ไปยังบริเวณที่เกิดการติดเชื้อ การรักษาบาดแผลและการสื่อสารระหว่างเซลล์ในระหว่างการเกิดกระบวน encapsulation อีกด้วย (Smith and Chisholm, 1992; Soderhall and Cerecius, 1992; Bachere *et al.*, 1995; Lee

et al., 2000; Vargas-Albores *et al.*, 1996 อ้างโดย Gross *et al.*, 2001; Holmblad and Soderhall, 1999)

สารต่อต้านแบคทีเรีย (antimicrobial substances) เป็นสารประกอบขั้นสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการของระบบ prophenoloxidase เช่นเดียวกับเอนไซม์ phenoloxidase รวมทั้งคุณสมบัติในการป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและรา นอกจากนั้น antimicrobial peptides ใน crustacean ส่วนใหญ่จะเป็นพิษโดยตรงต่อการเข้าทำลายเชื้อโรค เช่น 6.5 kDa peptide ซึ่งพบในปู (*Carcinus maenas*) มีลำดับเบสเหมือนกับ bivine antimicrobial peptide, bactenecin-7 ถึง 60% ซึ่งโปรตีนนี้จัดอยู่ในกลุ่ม cathelicidin ของสารปฏิชีวนะ และ 11.5 kDa peptide ซึ่งพบใน granular hemocytes ของปู (*C. maenas*) ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียแกรมบวกในน้ำทะเลได้ โดยใช้ความเข้มข้นเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Schnapp *et al.*, 1996; Relf *et al.*, 1999 อ้างโดย Gross *et al.*, 2001)

Gross และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษา antimicrobial peptide ในกุ้ง *Litopenaeus vannamei* และ *Litopenaeus setiferus* เรียกว่า penaeidin peptide ซึ่งจะจับกับไคตินทำให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันที่เนื้อเยื่อใต้ผิวเปลือกของกุ้ง โดยมีลำดับเบส 720 bp

นอกจากนั้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมี interferon และ interleukin เป็นสารในกลุ่มไซโตไคน์ interferon มีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสโดยกระตุ้นให้เซลล์ของร่างกายสร้างเอนไซม์หลายชนิด เช่น protein kinase สามารถแบ่ง interferon ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ type I IFN ซึ่งจะมีการสร้าง interferon ชนิดนี้เมื่อมีการติดเชื้อไวรัส (Bogdan, 2000 อ้างโดย พจนพร ไกรดิษฐ์, 2543) โดยหน้าที่หลักคือ การต่อสู้กับการติดเชื้อไวรัสและควบคุมการแบ่งเซลล์ของร่างกายให้อยู่ในสภาวะปกติ ส่วน type II IFN มีหน้าที่ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ (วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, 2537 อ้างโดย พจนพร ไกรดิษฐ์, 2543)

1.2.6 กลไกการเข้าติดเชื้อของไวรัสกับเซลล์เจ้าบ้าน

การเข้าสู่เซลล์เป้าหมายของ retrovirus จะเริ่มจากการจับกับ specific receptor molecule ของเซลล์เจ้าบ้านกับ virus surface glycoprotein บน outer membrane ของเซลล์เจ้าบ้านดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย 2 polypeptides คือ glycosylated hydrophilic polypeptide (SU) และ membrane-spanning protein (TM) ซึ่งแสดงออกโดย *Env* gene ซึ่งจะถูกย่อยสลายในระหว่างการขนส่ง virion ไปยังผนังเซลล์ โดย SU จะจับกับ receptor ของเซลล์แล้วกระตุ้นให้เกิดกระบวนการรวมกันของเมมเบรน โดยการทำงานของ TM ซึ่งหากไวรัสขาดสารทั้งสองตัวนี้ จะไม่สามารถเข้าติดเชื้อในเซลล์เป้าหมายได้ และในทางกลับกันหากไม่มี receptor ของไวรัสนั้นๆในเซลล์ก็จะไม่มีการติดเชื้อเกิดขึ้นเช่นกัน (Gilbert *et al.*, 1995 อ้างโดย Damico and Bates, 2000)

Hefferon และคณะ (1999) พบว่า GP64 ซึ่งเป็น envelope glycoprotein ของ baculovirus จะทำหน้าที่เกาะจับกับ host cell receptor โดยการผลิตโปรตีน GP64 แล้วเติมไปในอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ที่ 4 °C จากนั้นวิเคราะห์ประสิทธิภาพการติดเชื้อไวรัสของเซลล์โดยใช้เทคนิค protease sensitivity assay ซึ่งพบว่า virion ใช้เวลาเข้าสู่เซลล์ประมาณ 12.5 นาทีหลังเกิดการจับกันและมีการปลดปล่อย nucleocapsid จาก endosomee ของไวรัส หลังจากการหลอมรวมกันของเมมเบรนโดยใช้เวลาประมาณ 25 นาที

Manchester และคณะ (2000) ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการติดเชื้อ measle virus (MV) ในเซลล์ชนิดต่างๆ เช่น lymphocytes, versus หรือ fibroblasts ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีและไม่มียีนที่ควบคุมการผลิต CD46 ซึ่งเป็น cellular receptor ซึ่งพบว่าเซลล์ที่มีการผลิต CD46 จะมีปริมาณไวรัสมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการผลิตโปรตีน CD46

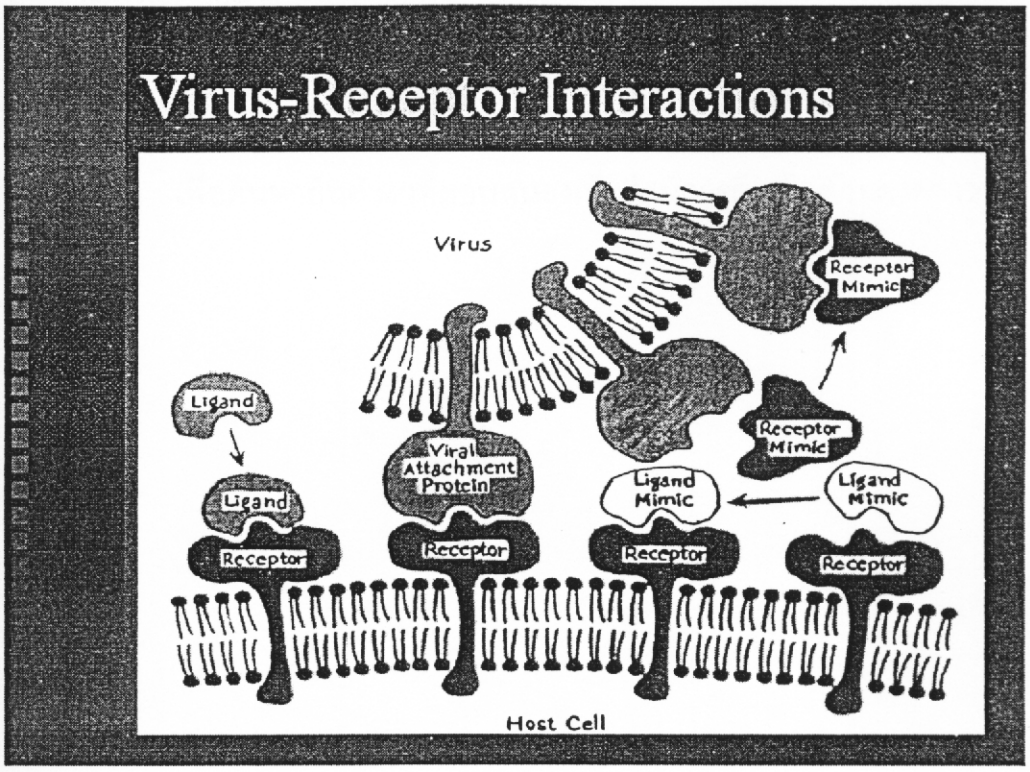
Kragler และคณะ (2000) พบว่าในพืชการขนถ่าย viral protein และ ribonucleoprotein complexes (RNPCs) ของไวรัส จะต้องผ่านทาง plasmodesmata ของพืช จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ซึ่งกระบวนการขนถ่ายนี้จะ

เกิดขึ้นในปฏิกิริยาระหว่าง proteins/ RNPCs ของไวรัส และ plasmodesmal chaperones หรือ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน โดยในการทดลองได้ดัดแปลงเอา phage display screening system มาใช้หาโปรตีนจากเซลล์เจ้าบ้านที่เกิดปฏิกิริยากับโปรตีนของไวรัส ซึ่ง phage display มีการแสดงออกของเปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับกับ receptor เช่นเดียวกับโปรตีนของไวรัส ทำให้โปรตีนของไวรัสไม่สามารถเคลื่อนที่ผ่าน plasmodesmal เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้

Gilbert และคณะ (1995) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความจำเพาะต่อการจับของ Tva ซึ่งทำหน้าที่เป็น host cell receptor ของ avian leukosis and sarcoma virus (ALSV) ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม retrovirus ซึ่งพบว่า Tva จะมีความจำเพาะกับ subgroup A envelope glycoprotein (Env-A) ของไวรัสชนิดนี้เท่านั้น ซึ่งจะก่อให้เกิดการติดเชื้อในเซลล์เจ้าบ้าน โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Env-A เมื่อจับกับ Tva จะมีสมบัติให้เกิดการรวมตัวกับเมมเบรนของเซลล์เจ้าบ้าน (fusion active state) แต่เมื่อเปรียบเทียบการจับกันของ Tva กับ Env-C พบว่าเซลล์เจ้าบ้านไม่ถูกติดเชื้อด้วยไวรัสชนิดนี้

Morrison และ Racaniello (1992) ได้ทำการทดลองเพิ่มจำนวนและการแสดงออกของยีนของหนูที่มีลักษณะเหมือนกับยีนตัวรับของ human poliovirus โดยเมื่อทำการตรวจสอบยีนด้วยเทคนิค southern blot hybridization พบว่า murine genome จะมีส่วนประกอบของลำดับเบสที่คล้ายกันกับ poliovirus receptor (pvr) อยู่ แล้วเมื่อนำ murine pvr homolog (mph) มาศึกษาพบว่ามีการแสดงออกได้เป็นสายโพลีเปปไทด์ที่มีโครงสร้างภายนอกเหมือนกับ human pvr และสามารถเตรียม mph mRNA ที่มีขนาด 2 และ 3 kb ได้จากอวัยวะส่วนสมอง, ไขสันหลัง, ไต, หัวใจ และตับของหนู ซึ่ง mph protein ไม่สามารถทำหน้าที่เป็น receptor ของ poliovirus ได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อมีการแทนที่ส่วน domain 1 ของ mph protein ด้วยส่วนของยีน pvr จะสามารถผลิต chimeric receptor ที่สามารถจับกับ poliovirus และชักนำให้เกิดการติดเชื้อของไวรัสได้

ด้วยเหตุนี้จึงมีแนวคิดที่จะค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับ WSSV เพื่อพัฒนางานวิจัยด้านการป้องกันและรักษาโรคในกุ้งต่อไป เนื่องจากการทดลองที่ผ่านมาได้มีการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนและลำดับของนิวคลีโอไทด์ของสารที่ได้จากการแสดงออกของยีนที่มีปฏิกิริยากับไวรัส ซึ่งพบว่าลำดับของกรดอะมิโนของสารที่ทำหน้าที่เดียวกัน เช่น receptor หรือโปรตีนที่มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการขนถ่ายโปรตีนของไวรัสเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งจะมีลำดับของกรดอะมิโนที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งส่งผลต่อบทบาทการทำปฏิกิริยากับไวรัสได้เหมือนกัน นอกจากนี้ยังสามารถนำยีนที่ได้มาเพิ่มจำนวนโดยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรม เช่น การตัดต่อยีนเข้าสู่ expression vector ให้มีการแสดงออกของยีนนั้นในเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งจะได้เป็นสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับกลไกการติดเชื้อของไวรัสต่างๆได้ และในอนาคตเป็นที่น่าสนใจที่จะนำเอาสารที่ได้จากการแสดงออกของยีนมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนการเตรียมบ่อสำหรับเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำในการกำจัดไวรัส โดยการใช้สารที่ผลิตขึ้นไปทำปฏิกิริยากับไวรัส เช่นการแย่งจับกับไวรัส ทำให้ป้องกันการติดเชื้อในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ นอกจากนี้หากเราสามารถยับยั้ง การทำงานของโปรตีนในส่วนที่มีบทบาทในการทำปฏิกิริยาการจับกับไวรัสได้ก็จะทำให้ไม่เกิดการติดเชื้อในสิ่งมีชีวิตนั้น



รูปที่ 2 กลไกการทำปฏิกิริยาของไวรัสกับ receptor ของเซลล์เจ้าบ้าน (http://www.bio.davidson.edu)

Figure 2 Virus- Receptor Interactions

1.3 วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อค้นหายีนที่มีปฏิกิริยากับเชื้อตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

1.3.2 เพื่อทราบถึงลำดับเบสของยีนที่มีปฏิกิริยากับเชื้อตัวแดงดวงขาว

1.3.3 เพื่อค้นหายีนต่างๆที่ตอบสนองเมื่อกุ้งมีการติดเชื้อตัวแดงดวงขาว