

การค้นหายีนในยีนระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสัมพันธ์
กับลักษณะความต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำ

Identification of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in Immune System
Gene Related to White Spot Syndrome Virus (WSSV) Resistance
in Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius)

สุदारัตน์ แสงเงิน^{1*} สุวิทย์ วุฒิสุทธิเมธาวิ¹ สถาพร ดิเรกบุษราคม¹ และปิยะพงศ์ โชติพันธุ์¹
Sudarat Saengngern^{1*} Suwit Wuthisuthimethavee¹ Sataporn Direkbusarakom¹ and Piyapong Chotipuntu¹

¹สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ นครศรีธรรมราช 80160

*Corresponding author, e-mail: rraya6@gmail.com

บทคัดย่อ

ศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียว (Single Nucleotide Polymorphism, SNP, สนิปส์) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะต้านทานโรคไวรัสตัวแดงดวงขาว (White Spot Syndrome Virus, WSSV) ในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยการตรวจสอบการต้านทานเชื้อไวรัสของตัวอย่างกุ้งกุลาดำที่ปลอดโรค จำเพาะ (SPF) ครอบครัวยุค 100 ตัว จำนวน 11 ครอบครัว ที่ได้รับเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เท่ากับ $10^{-5.8}$ (3.74×10^4 copies/ul) ทำให้กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการทดสอบตายร้อยละ 50 (ID_{50}) และเก็บข้อมูลการตายและรอดตายเป็นระยะเวลา 10 วัน เมื่อนำดีเอ็นเอของตัวอย่างกุ้งที่ตายและรอดตายจาก 4 ครอบครัว ที่ยังคงสามารถสืบประวัติการผสมพันธุ์ได้และมีประชากรเหลืออยู่ไปศึกษาตำแหน่งสนิปส์ของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำจำนวน 24 ยีน โดยวิธีเอสเอสซีพี (SSCP) พบว่าส่วนของยีน 4 ยีน แสดงความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มตัวอย่างตาย และกลุ่มตัวอย่างรอดตาย ได้แก่ ส่วนของยีน Anti-lipopolysaccharide factor isoform 3 (ALFPm3), Crustin *Penaeus monodon* factor 1 (CrustinPm1), Serine proteinase inhibitors B3 (SERPINB3) และ Perithophin (PTPh) เมื่อนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากยีนเหล่านั้นของแต่ละกลุ่มตัวอย่างไปหาลำดับเบสดีเอ็นเอ (DNA sequencing) พบตำแหน่งสนิปส์ที่แสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างในส่วน ของยีน 2 ยีน คือยีน ALFPm3 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 219A/G และยีน CrustinPm1 ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 107T/G

คำสำคัญ: สนิปส์ ระบบภูมิคุ้มกัน ไวรัสตัวแดงดวงขาว ยีน กุ้งกุลาดำ

Abstract

Identification of single nucleotide polymorphism (SNP) related to white spot syndrome virus (WSSV) resistance in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) was carried out by challenge test and DNA analysis. A total of 11 SPF black tiger shrimp families with 100 shrimps of each family were challenged by intramuscular injection of WSSV at the ID_{50} of $10^{-5.8}$ (3.74×10^4 copies/ul) and observed cumulative mortality for 10 days. Dead and survived shrimp from 4 families which breeding history

has been recorded were used for SNPs identification using SSCP. From SSCP analysis, 24 immune related genes were amplified and analyzed in both groups of shrimp. The result showed that 4 genes consisting of Anti-lipopopolysaccharide factor isoform 3 (ALFPm3), Crustin *Penaeus monodon* factor 1 (CrustinPm1), Serine proteinase inhibitors B3 (SERPINB3) and Perithophin (PTPh) gave polymorphisms between dead and survived shrimp. From those, 2 genes (ALFPm3 and CrustinPm1) were clearly found polymorphic SNPs between dead and survived by DNA sequencing technique consisting of SNP position 219A/G in ALFPm3 gene and SNP position 107T/G in CrustinPm1 gene.

Keywords: single nucleotide polymorphism (SNP), immune system, white spot syndrome virus (WSSV), gene, *Penaeus monodon* (Fabricius)

คำนำ

ไวรัสตัวแดงดวงขาวเป็นไวรัสชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในระบบเศรษฐกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ความรุนแรงของไวรัสชนิดนี้สามารถทำให้กุ้งติดเชื้อได้ภายใน 36-72 ชั่วโมง และอัตราการตายถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3-7 วัน ทำให้มีปริมาณการเลี้ยงและส่งออกลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงในปัจจุบัน (Lightner, 1996, van Hulten *et al.*, 2001; Rajesh Kumar *et al.*, 2008) ถึงแม้ว่าการแพร่ระบาดของไวรัสชนิดนี้จะลดลงในปัจจุบันแต่ความรุนแรงก็ยังคงรุนแรงเท่าเดิม ทั้งนี้สาเหตุสำคัญที่ทำให้กุ้งติดเชื้อได้ง่ายและแพร่ระบาดได้รวดเร็วเนื่องจากกุ้งกุลาดำนั้นมีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงในระดับอาศัยเซลล์และสารน้ำ ดังนั้นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวควบคู่กับการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมจึงน่าจะเป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์และสร้างความมั่นคงทางเศรษฐกิจในการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของเกษตรกรต่อไป จากรายงานก่อนหน้านี้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในระดับอาศัยสารน้ำมีถิ่นหลายถิ่นที่มีการตอบสนองและแสดงออกในปริมาณที่แตกต่างกันต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว เช่น ยีน *Penaeus monodon* PMAV (PmAV) เป็นยีนของโปรตีนตัวแรกที่มีการค้นพบว่ามียับยั้งที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันในการต้านทานไวรัสในกุ้ง (Luo *et al.*, 2003) ยีน rALFPm3 สามารถต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและแบคทีเรียได้ รวมทั้งสามารถต้านทานต่อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยเฉพาะ *Vibrio harveyi* และเชื้อรา (Somboonwivat *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2006; Tharntada *et al.*, 2009) ยีน CrustinPm1-3 มีการแสดงออกของยีนในกุ้งกุลาดำเพิ่มจำนวนมากขึ้นตั้งแต่เกิดการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในวันแรก (Antony *et al.*, 2011) ยีน SERPIN isoform1-8 โดยเฉพาะ PmSERPIN6-producing hemocytes มีความสำคัญต่อการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว (Homvises *et al.*, 2010)

จากการศึกษาข้างต้นเป็นเพียงการศึกษาการแสดงออกของยีนที่มีความสัมพันธ์ต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ดังนั้นการใช้เทคนิคทางด้านเครื่องหมายพันธุกรรมเข้ามาช่วยในการตรวจหาลักษณะการเปลี่ยนแปลงระดับดีเอ็นเอและนิวคลีโอไทด์ (single nucleotide polymorphism, SNP) จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาตรวจหายีนที่มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ โดยเทคนิคที่นำมาใช้ได้แก่ PCR-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) และ DNA sequencing ทั้ง

สองเป็นเทคนิคตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความแตกต่างกันเพียงหนึ่งนิวคลีโอไทด์ (SNP) ใน ซีนดีเอ็นเอที่สนใจได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์ต่อการต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาว และเพื่อใช้ในการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอ SNP ใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ประชากรกึ่งกุลาดำทดลอง

ตัวอย่างกึ่งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) นำมาทดลองนำมาจากหน่วยกักกันโรคพ่อแม่พันธุ์กึ่งมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จำนวน 11 ครอบครัว ครอบครัวละ 100 ตัว น้ำหนักประมาณ 5-10 กรัม

2. การเตรียมเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวและหาความรุนแรงของไวรัส

เชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวเริ่มต้นได้จากกึ่งขาวหนาไม่น้ำหนัก 6 กรัม ที่ตรวจพบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จ. นครศรีธรรมราช จากนั้นตัดเนื้อเยื่อส่วนเหงือกและบดจนละเอียดใน 0.26 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 20 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย Millipore filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปฉีดในกึ่งกุลาดำจำนวน 20 ตัว เพื่อเพิ่มจำนวนให้มากพอสำหรับใช้ในการทดลอง หลังจากฉีดเชื้อทำการเก็บตัวอย่างและยืนยันการติดเชื้อโดยเทคนิคพีซีอาร์ แล้วจึงตัดเหงือกมาเตรียมเป็นเชื้อ stock ดังวิธีข้างต้น หลังจากนั้นหาความรุนแรงของไวรัสโดย ทำการหาปริมาณไวรัสตัวแดงดวงขาวที่สามารถก่อการติดเชื้อและตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในกึ่งกุลาดำ นำประชากรกึ่งที่มีน้ำหนักทดลองประมาณ 5-10 กรัม จำนวน 350 ตัว นำกึ่งมาพักในตู้ทดลองขนาด 30 ลิตร ประมาณ 3-5 วัน เพื่อให้กึ่งได้มีการปรับตัวเข้ากับสภาพในตู้ทดลองก่อนเริ่มทำการทดลอง จากนั้นนำเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่เตรียมไว้มาเจือจางความเข้มข้นของเชื้อตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-7} ใน โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ โดยเจือจางความเข้มข้นละ 10 เท่า แล้วฉีดเข้าในกึ่งกุลาดำ ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงในตู้ทดลองขนาด 30 ลิตร จำนวน 35 ตู้ โดยระดับความเจือจางของเชื้อละ 5 ซ้ำๆ ละ 10 ตัว หลังจากนั้นบันทึกข้อมูลการตายของกึ่งกุลาดำที่ระดับความเจือจางต่างๆ เพื่อนำไปคำนวณหาค่า infective dose (ID_{50}) โดยวิธี Reed-Muench (1983)

3. การทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ

ในการทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำเพื่อคัดแยกกลุ่มกึ่งที่มีความต้านทานโรค และกลุ่มกึ่งที่อ่อนแอ นั้น ใช้กึ่งกุลาดำที่มีน้ำหนักประมาณ 5-10 กรัม จำนวน 11 ครอบครัวๆ ละ 100 ตัว โดยเริ่มต้นนำกึ่งทดลองในแต่ละครอบครัวมาพักในตู้ทดลองเพื่อให้กึ่งปรับสภาพเป็นเวลาประมาณ 3-5 วัน (ตู้กระจกปริมาตร 30 ลิตร จำนวน 10 ตู้ๆ ละ 10 ตัว ต่อครอบครัว) จากนั้นฉีดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในระดับการเจือจางที่ทำให้กึ่งติดเชื้อและตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Infective dose, ID_{50}) ตัวละ 0.2 มิลลิลิตร และกลุ่มควบคุมฉีดด้วย 2.6 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร จำนวน 100 ตัวต่อครอบครัว และเก็บข้อมูลการตายของกึ่งทุกวันจนเสร็จสิ้นการทดลองเป็นเวลา 10 วัน

4. การค้นหาลำดับดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาว

4.1 การหาลำดับดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-SSCP

ตรวจสอบโดยนำกุ้งตัวอย่างในครอบครัวที่มีอัตราการรอดตายต่ำสุด โกล้เฉลี่ย 50 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยในแต่ละครอบครัวแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มกุ้งตายภายใน 3 - 7 วัน และกลุ่มกุ้งรอดตายจากการทดลอง จากนั้นนำกุ้งมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดัดแปลงจาก Wuthisuthimethavee (1999) ตัวอย่างดีเอ็นเอของแต่ละกลุ่มเข้าด้วยกัน 5 ตัวอย่างต่อ 1 ดีเอ็นเอ (pools DNA) และนำไปยืนยันการดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์กับไพรเมอร์ LMT1 และ LMT2 (Natividad *et al.*, 2006) จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับยีนในระบบภูมิคุ้มกันกุ้งกุลาดำจำนวน 24 (Table 1) แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์มาหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค single strand conformation polymorphism (SSCP) โดยแยกความแตกต่างแถบดีเอ็นเอบน non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต

Table 1 Primers of immune genes

Gene	Primer Sequence (5'----->3')	References
PmproPO1	GGT CTT CCC CTC CCG CTT CG	Amparyup <i>et al.</i> , 2009
	GCC GCA GGT CCT TTG GCA GC	
PmproPO2	GCC AAG GGG AAC GGG TGA TG	Amparyup <i>et al.</i> , 2009
	TCC CTC ATG GCG GTC GAG GT	
CrustinPm1	GAA TTC AAA ATG AAG GGT CTC GGA G	Tonganunt <i>et al.</i> , 2008
	CTC GAG GGC AAA AAA TTC ATA GAA G	
Crustin	CTG CTG CGA GTC AAG GTA TG	Vatanavicharn <i>et al.</i> , 2009
	AGG TAC TGG CTG CTC TAC TG	
Crus-like Pm	CGG CAG GTG TCC ACA GAT TCG	Amparyup <i>et al.</i> , 2008
	GCA GAC GGT GTC GTT CAA GCA	
CrustinPm5	ACC AGG GCC AAG GAA ACT AT	Vatanavicharn <i>et al.</i> , 2009
	GCA GCA TTT GTC GTT TGA GG	
DAD1	AGA TCG TCG ATG CCT ACC TCT TCT A	Molthathong <i>et al.</i> , 2008
	GTA CTG ATG AAC CAG ACA GGA AGG A	
ALFPm3	CCC ACA GTG CCA GGC TCA A	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	TGC TGG CTT CTC CTC TGA TG	
SERPINB3	CCC TCA AAC GCC TCA AAG TC	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	GTC GGT CCA CGG TGA AGG	
Profilin	GCT GGT GGA ATC TGG AAA CG	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	GCG GTG TTA GTC TTG GTG ATG	

Table 1 Primers of immune genes (continue)

Gene	Primer Sequence (5'----->3')	References
Perithophin	AGG CTA ATG ATT TCC GTG TGG	Pongsomboon <i>et al.</i> , 2008
	GGA CAC TGG TAA CGC ATT TG	
PMTST1	GGG AGG AAG AAC ACC CCA ATG	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	TAC ACG CTG AGC AAC GAG AAC G	
PMSUMO-1	AGA AGG GGA AGG GAACGA ATACA	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	ACG CAG CGA TGC TAC AGG GA	
PMCYA	GGG CGG CAA GTC CAT CTA CG	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	GTG CTT GTT GTC CAG CCA GGG	
PMTra-2	CAG TCT CAC ACC TCG TTC GC	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	GTC AAT CTC CAT CCC AGA ACA CT	
prohibitin2	CGT ATG GCA TCT CGC AGT CC	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	CCT CTC CTG TCT CGC TCT CTC G	
Trap240	TAG GTA GGC TTG GTA GAA TGG GC	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	GGA ATC TCT GCT GTG CTG ACT GA	
MIPP2	TAT TCC AAG GAC AAC CCA GGC T	Leelatanawit <i>et al.</i> , 2009
	TTT ACA TCC CCT CGT CCC GCT T	
PmTIR	CTT ATC AGC CAC TAC TCT TGA CTA CC	Arts <i>et al.</i> , 2007
	GAG AAG GAA AAC TGT GAT GAG CAC GAT T	
Lysozyme	GCT GCT GGT TGG GCT TCT G	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	TGC GGT TGC GGT TGA TGG	
IFRD1	GGA AGG TCT GTC GGA GAT GG	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	ACG GGT GAG AGG CTT ACA AC	
GLUT1	GCG AAA CGA CGA TGA TTG TG	Somboonwivat <i>et al.</i> , 2006
	TGA AGA AGC GAG CGA TGA TG	
Cathepsin L	CAT TAG AAG ATG AAA TTC TTA AGT G	Pongsomboon <i>et al.</i> , 2008
	ATG CAA GAC AAG GTC TAG TGC TCA G	
Cathepsin B	AGT CGA GAG CAG TTG TCT TC	Pongsomboon <i>et al.</i> , 2008
	GCT AAG TGC AAA CAC TAT GAG	

4.2 การหาสนิปส์ด้วยเทคนิค DNA sequencing

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอจาก SSCP ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่อง automated DNA sequencing วิเคราะห์หาตำแหน่งสนิปส์จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor และ ClustalX (1.81)

ผลการวิจัย

1. หาความรุนแรงของเชื้อที่ทำให้กึ่งติดเชื้อและตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ID₅₀)

จากการเตรียมไวรัสเริ่มต้นมีเข้มข้น 4.18×10^7 copies/ul เมื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งติดเชื้อและตาย 50 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ตัวอย่างกึ่งน้ำหนักประมาณ 5-10 กรัม จากการสุ่มมาจาก 11 ครอบครัวยุโรปที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าที่ระดับการเจือจางของเชื้อ 10^{-4} มีการตายของกึ่ง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่ระดับการเจือจางของเชื้อ 10^{-5} และ 10^{-6} พบการตายของกึ่ง 93 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำผลที่ได้ไปคำนวณค่า ID₅₀ โดยวิธีของ Reed-Muench (1983) พบว่ามีค่า ID₅₀ อยู่ที่ความเจือจาง $10^{-5.8}$ ซึ่งเท่ากับไวรัสจำนวน 3.74×10^4 copies/ul

2. การทดสอบการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกึ่งกุลาดำ

หลังจากทดสอบความต้านทานโรค ต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ที่ระดับความเข้มข้น 3.74×10^4 copies เป็นเวลา 10 วัน ต่อกึ่งกุลาดำ 11 ครอบครัวยุโรป คือ Q1, Q2, Q3, Q4, Q5, Q6, Q7, Q8, Q9, Q10 และ Q11 พบอัตราการรอดตายเป็นร้อยละ 73, 66, 0, 7, 13, 45, 58, 68, 51, 38 และ 64 ตามลำดับ โดยสามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอัตราการรอดตายต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Q3, Q4, Q5, Q6 และ Q10 และกลุ่มที่มีอัตราการรอดตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Q1, Q2, Q7, Q8 และ Q9 เมื่อยืนยันผลการทดลองว่ากึ่งติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวโดยใช้ไพรเมอร์ LMT1 และ LMT 2 ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 211 คู่เบส

3. การค้นหาสนิปส์ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาว

ตัวอย่างกึ่งกุลาดำ 4 ครอบครัวยุโรป ประกอบด้วยครอบครัวยุโรปที่สามารถสืบประวัติการผสมพันธุ์ได้และมีอัตราการรอดตายต่ำสุด ได้แก่ Q3 และ Q10 ครอบครัวยุโรปที่มีอัตราการรอดตายใกล้เคียง 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Q9 และมีอัตราการรอดตายมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ Q8 นำมาสกัดดีเอ็นเอจากนั้นนำตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม (กลุ่มตายภายใน 3-7 วัน และกลุ่มรอดตาย) ของแต่ละครอบครัวยุโรปดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน 5 ตัวอย่างต่อ 1 กลุ่มตัวอย่าง (pools DNA) (Table 2) เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับยีนในระบบภูมิคุ้มกันทั้ง 24 ยีน แล้วตรวจสอบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบ 4 ยีน ที่แสดงแถบดีเอ็นเอระหว่างกลุ่มตายและรอดตายแตกต่างกันประกอบด้วยยีน ALFPm3, CrustinPm1, Perithophin และ SERPINB3 (Figure 1)

Table 2 DNA Pools for PCR-SSCP and DNA sequencing

Family	Die within 3 – 7 days	Survived
3	3 DNA pools	0 DNA pools
8	3 DNA pools	3 DNA pools
9	2 DNA pools	3 DNA pools
10	2 DNA pools	4 DNA pools

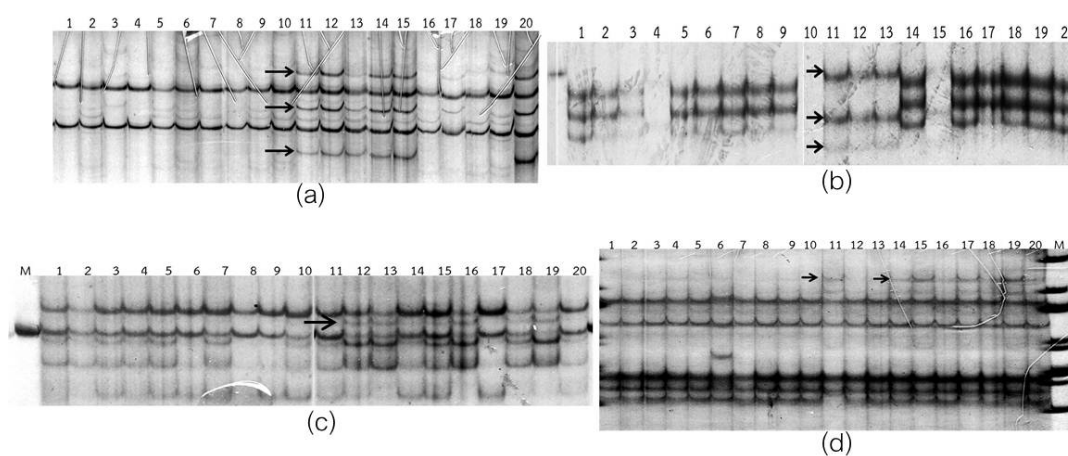


Figure 1 (a) *ALFPm3* gene (b) *CrustinPm1* gene (c) *Perithophin* gene (d) *SERPINB3* gene
(lane 1-10 = die shrimps; lane 11-20 = survival shrimps)

นำชิ้นดีเอ็นเอ 4 ยีน (*ALFPm3*, *CrustinPm1*, *Perithophin* และ *SERPINB3*) ที่ได้จากการหาความแตกต่างของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-SSCP ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบสนิปส์ (Table 3) ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ สนิปส์ 219A/G ในยีน *ALFPm3* (accession no. EF523562.1) และสนิปส์ 107T/G ในยีน *CrustinPm1* (accession no. FJ6860) และสนิปส์ที่ไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ได้แก่ สนิปส์ C/T ในยีน *PTPh* (accession no. EF153270.1) และสนิปส์ C/G ในยีน *SERPINB3* (accession no. KF525274.1) ซึ่งเป็นสนิปส์ที่พบได้ทั้งในตัวอย่างกลุ่มตายและรอดตาย เมื่อพิจารณาการถอดรหัสกรดอะมิโนจากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป พบว่า สนิปส์ A/G ในยีน *ALFPm3* ถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้ว กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก Isoluecine เป็น Valine และสนิปส์ T/G ในยีน *CrustinPm1* กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก Methionine เป็น Arginine

Table 3 SNPs (genotype) in each gene of die and survival shrimps

Gene	Accession No.	SNPs (genotype)	
		Die within 3-7 days	survival
anti-lipoplysachharide factor 3	EF523562.1	A/A	G/A
CrustinPm1	FJ6860	T/T	G/G
Perithophin	EF153270.1	C/T	C/T
SERPINB3	KF525274.1	C/G	C/G

สรุปและวิจารณ์ผล

1. ความรุนแรงของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ทำให้กุ้งกุลาดำตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (ID₅₀)

ID₅₀ ของเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวที่ได้เตรียมขึ้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ที่ระดับความเจือจางระดับ $10^{-5.8}$ (3.74×10^4 copies/ul) แล้วนำไปทำให้กุ้งกุลาดำติดเชื้อโดยวิธีฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนหางเป็นเวลา 10 วัน พบอัตราการรอดตายของกุ้ง 0-73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่า ID₅₀ ที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ มีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Wang *et al.* (2013) ได้ใช้ความเข้มข้นเชื้อไวรัส 3×10^3 copies/ul ในการศึกษาอัตราการรอดตายของกุ้งขาวจีน จากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว โดยกุ้งที่ได้รับเชื้อไวรัสมีอัตราการรอดตาย 40-90 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Yi *et al.* (2014) พบค่า ID₅₀ ที่ใช้ศึกษาอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม่มีค่าเท่ากับ 1×10^6 copies/ul ที่ระยะเวลา 10 วัน ซึ่งจะเห็นว่าค่า ID₅₀ ที่ใช้ในแต่ละงานวิจัยที่มีการเตรียมจากเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวจากกุ้งต่างชนิดกันนั้น จำนวน copies number ของเชื้อไวรัสนั้นแตกต่างกัน อาจเป็นไปได้ว่ากุ้งแต่ละชนิดมีการตอบสนองและต้านทานต่อเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แตกต่างกัน จึงทำให้ความรุนแรงของเชื้อไวรัสที่ทำให้กุ้งตาย 50 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกัน

2. การทดสอบความต้านทานโรคของกุ้งกุลาดำจากประชากรต่างกลุ่ม

จากการศึกษาความต้านทานโรคในกุ้งกุลาดำทั้ง 11 ครอบครัพบว่ากุ้งในแต่ละครอบครัวมีความต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แตกต่างกันโดยในครอบครัว Q3 มีอัตราการรอดต่ำสุดร้อยละ 0 ครอบครัวยุค Q1 มีอัตราการรอดตายสูงสุดร้อยละ 73 ซึ่งจากการศึกษาจะเห็นว่ากุ้งที่มาจากพ่อแม่พันธุ์ต่างกันให้ผลความต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้แตกต่างกัน ซึ่งให้เห็นว่ากุ้งกุลาดำในแต่ละครอบครัวยุคมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่สูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Cuellar-Anjel *et al.* (2012) โดยอัตราการรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว 23%, 57% และ 26% จากครอบครัว LP-1, LP-2 และ LP-3 ตามลำดับ

3. การค้นหาตำแหน่งยีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานไวรัสตัวแดงดวงขาว

จากการค้นหาตำแหน่งยีนโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน ALFPm3 CrustinPm1 SERPINB3 และ Perithophin ที่พบรูปแบบความผันแปรทางพันธุกรรมแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างตายภายใน 3-7 วัน และกลุ่มรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว จากเทคนิค SSCP พบยีนที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มตัวอย่างต่อความสามารถในการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ในยีน ALFPm3 จีโนไทป์ AA

และ A/G และในยีน *CrustinPm1* จีโนไทป์ T/T และ G/G โดยพบว่าจีโนไทป์แบบ heterozygous A/G ในยีน *ALFPm3* และ homologous G/G ในยีน *CrustinPm1* สัมพันธ์ต่อลักษณะความต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว เนื่องจากพบสนิปส์ทั้งสองชนิดได้เฉพาะในกลุ่มตัวอย่างที่รอดตายจากการติดเชื้อหลังเสร็จสิ้นการทดลอง

ยังไม่มีรายงานก่อนหน้านี้ในการศึกษาสนิปส์ในยีนระบบภูมิคุ้มกันที่สัมพันธ์กับลักษณะความต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาวในกุ้งกุลาดำซึ่งผลการทดลองนี้ก็สอดคล้องกับผลการศึกษาในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นรวมทั้งกุ้งถึงลักษณะสนิปส์ที่เกิดขึ้น คือ ชนิดของจีโนไทป์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์มีผลต่อลักษณะใดลักษณะหนึ่งระหว่างกลุ่มตัวอย่าง โดย Zeng *et al.* (2008) พบว่า สนิปส์ตำแหน่ง 892C/T มีผลต่อกลุ่มประชากรที่มีความต้านทานต่อไวรัส TSV ในกุ้งขาวแวนาไม แตกต่างจากกลุ่มตัวอย่างที่อ่อนแออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) เช่นเดียวกับ Glenn *et al.* (2005) กล่าวว่า สนิปส์ G ในตำแหน่ง C681G ของยีน *Cathepsin-L* มีความสัมพันธ์กับกลุ่มตัวอย่างที่มีน้ำหนักตัวสูงในกุ้งกุลาดำ และ Yu *et al.* (2006) รายงานว่า สนิปส์ในยีน *MIH I, II* และ *CHH* มีความสัมพันธ์ต่อลักษณะการลอกคราบของกุ้งขาวแวนาไม ในขณะที่ Thanh *et al.* (2010) รายงานว่า สนิปส์ TGAA haplotype ของยีน *Crustacean hyperglycemic hormone, CHH* มีความสัมพันธ์กับลักษณะของกลุ่มประชากรที่มีน้ำหนักตัวสูง

เมื่อพิจารณาการถอดรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการศึกษาพบว่า ในตำแหน่งที่เกิดสนิปส์ A/G ในยีน *AFLPm3* เมื่อถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน กรดอะมิโนเกิดการเปลี่ยนแปลงจาก isoleucine เป็น valine และสนิปส์ T/G ในยีน *CrustinPm1* กรดอะมิโนเปลี่ยนจาก methionine เป็น arginine ซึ่งเมื่อกรดอะมิโนเปลี่ยนก็อาจจะทำให้โปรตีนหรือสายโพลีเปปไทด์เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยส่งผลให้เปปไทด์ที่ได้จากยีนทั้งสองชนิดสามารถต้านทานต่อไวรัสของกุ้งกุลาดำได้ดีขึ้น ซึ่งยีนทั้ง 2 ยีน เป็นยีนในกลุ่ม antimicrobial peptides (AMPs) ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดแบบ humoral immune defense ในการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย โดยเปปไทด์เหล่านี้จะมีขนาดประมาณ 1-5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหมู่ของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (cation antimicrobial peptides) เมื่ออยู่ในสารละลายที่เป็นกลาง (non-polar solvents) ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) โดยกลไกการทำงานของเปปไทด์ต้านจุลินทรีย์เริ่มต้นด้วยการดึงดูดกันระหว่างขั้วบวกของเปปไทด์กับขั้วลบที่อยู่บริเวณพื้นผิวของเชื้อจุลินทรีย์ และแทรกแซงเข้าไปในชั้นของผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้สารต่างๆ ภายในเซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ในที่สุดเชื้อก็ตาย (Kim, 2005) ซึ่งจากองค์ประกอบของ AMPs ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประจุบวก จึงเห็นได้ว่าผลการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากการศึกษานี้ อาจทำให้โครงสร้างหรือหน้าที่ของเปปไทด์เปลี่ยนไปทำให้การทำงานของเปปไทด์ทำงานได้ดีขึ้นในการกำจัดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว ซึ่งผลจากการศึกษานี้ก็สอดคล้องกับการศึกษาในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ถึงบทบาทการเปลี่ยนไปของกรดอะมิโน โดย Gallois *et al.* (2010) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนใน viral genome-linked protein (VPg) ของไวรัส turnip mosaic virus (TuMV) มีผลให้ไวรัสต้านทานต่อลักษณะความต้านทานต่อไวรัสในพืช *Arabidopsis thaliana* ได้และยังสามารถก่อความรุนแรงได้มากขึ้นอีกในพืชชนิดนี้ อีกทั้ง Xiong *et al.* (2004) กล่าวว่า การเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนในโปรตีน *hos2* ส่งผลให้พืช *Arabidopsis* มีคุณสมบัติทนต่อ lithium และสภาวะอากาศเย็นได้ ส่งผลให้ขนาดของลำต้นมีการพัฒนาช้า ก้านดอกและใบมีขนาดเล็กและสั้นกว่าใน

พีชป่า (wild type) Olesky *et al.* (2002) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนของ membrane protein porin IB ตำแหน่ง G120D และ A121D ส่งผลให้แบคทีเรีย *Neisseria gonorrhoeae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคหนองใน มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ penicillin และ tetracycline ได้ และ Atsumi *et al.* (2012) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนภายในยีน ATP-binding cassette transporter gene ทำให้หนอนไหม (*Bombyx mori*) มีคุณสมบัติในการต้านทานต่อสารพิษ Bt (Cry1Ab) ซึ่งมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง Huang *et al.* (2006) พบว่า ตำแหน่งสไนป์ส T1254C มีผลให้ไก่มีความสัมพันธ์กับลักษณะภาวะนิ้วเกิน (chicken polydactyly) ในไก่ได้ และ Lee *et al.* (2012) พบว่า สไนป์ส A ในยีน NK-lysin ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน N29N มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียและกระบวนการสร้างเซลล์มะเร็งในไก่ได้ดีกว่าสไนป์ส G ที่ตำแหน่งกรดอะมิโน N29D

ดังนั้นสไนป์สของยีน ALFPm3 และ CrustinPm1 ที่พบได้เฉพาะในกุ้งกุลาดำรอดตายจากการศึกษาในครั้งนี้และยังส่งผลให้ชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนแปลงน่าจะมียับยั้งที่สาเหตุที่สาเหตุในการต้านทานต่อไวรัสตัวแดงดวงขาว

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ และหน่วยวิจัยความเป็นเลิศด้านกุ้ง มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

เอกสารอ้างอิง

- Amparyup, P., Kondo, H., Hirano, I., Aoki, T., and Tassanakajon, A. 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*, 45, 1085-1093.
- Antony, S. P., Philip, R., Joseph, V. and Bright-Singh, I. S. 2011. Anti-lipopolysaccharide factor and crustin-III, the anti-white spot virus peptides in *Penaeus monodon*: Control of viral infection by up-regulation. *Aquaculture*. 319: 11-17.
- Arts, J. A. J., Cornelissen, F. H. J., Cijssouw, T., Hermsen, T., Savelkoul, H. F. J. and Stet, R. J. M. 2007. Molecular cloning and expression of a Toll receptor in the giant tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23, 504-513.
- Atsumi, S., Miyamoto, K., Yamamoto, K., Narukawa, J., Kawai, S., Sezutsu, H., Kobayashi, I., Uchino, K., Tamura, T., Mita, K., Kadono-Okuda, K., Wada, S., Kanda, K., Goldsmith, M. R. and Noda, H. 2012. Single amino acid mutation in an ATP-binding cassette transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(25): pp. E1591-E1598.

- Cuéllar-Anjel, J., White-Noble, B., Schofield, P., Chamorro, R. and Lightner, D. 2012. Report of significant WSSV-resistance in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from a Panamanian breeding program. *Aquaculture*. 368-369.
- Gallois, J. L., Charron, C., Sanchez F., Pagny, G., Houvenaghel, M. C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C. and German-Retana, S. 2010. A single amino acid change in the Turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confers virulence in *A. thaliana* mutants knocked-out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *Journal of General Virology*. 91: 288-293.
- Glenn, K. L., Grapes, L., Suwana sopee, T., Harris, D. L., Li, Y., Wilson, K. and Rothschild M. F. 2005. SNP analysis of AMY2 and CTSL genes in *Litopenaeus vannamei* and *Penaeus monodon* shrimp. *Animal Genetics*. 36(3): 235-236.
- Homvises, T., Tassanakajon, A. and Somboonwivat, K. 2010. *Penaeus monodon* SERPIN, PmSERPIN6, is implicated in the shrimp innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*. 29: 890-898.
- Huang, Y. Q., Deng, X. M., Du, Z. Q., Qiu, X., Du, X., Chen, W., Morisson, M., Leroux, S., Ponce, de., Léon, FA., Da, Y., Li, N. and Ning Li, N. 2006. Single nucleotide polymorphisms in the chicken *Lmbr1* gene are associated with chicken polydactyly. *Gene: Section Fictional Genomics*, 374, 10-18.
- Kim, A. B. 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*. 3: 238-250.
- Lee, M. O., Kimb, E. H., Janga, H. J., Park, M. N., Woob, H. J., Hana, J. Y. and Womack, J. E. 2012. Effects of a single nucleotide polymorphism in the chicken NK-lysin gene on antimicrobial activity and cytotoxicity of cancer cells. *Proceeding of the National Academy of Science of United States of America*. 109(30): 12087-12092.
- Leelatanawit, R., Sittikankeaw, K., Yocawibun, P., Klinbunga, S., Roytrakul S., Aoki, T., Hirono, I. and Menasveta, P. 2009. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A*. 152: 66-76.
- Lightner, D. V. 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp*. Louisiana: World Aquaculture Society, Baton Rouge.

- Liu, H., Jiravanichpaisal, P., Soderhall, I., Cerenius, L. and Soderhall, K. 2006. Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Virology*. 80(21): 10365-10371.
- Luo, T., Zhang, X., Shao, Z. and Xu, X. 2003. PmAV, a novel gene involved in virus resistance of shrimp *Penaeus monodon*. *FEBS Letters*. 551: 53-57.
- Molthathong, S., Senapin, S., Klinbunga, S., Puanglarp, K., Rojtinnakorn, J. and Flegel, W. T. 2008. Down-regulation of defender against apoptotic death (DAD1) after yellow head virus (YHV) challenge in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*. 24. 173-179.
- Natividad, K. D. T., Migo, M. V. P., Albaladejo, J. D., Magbanua, J. P. V., Namura, N. and Matsumura, M. 2006. Simultaneous PCR detection of two shrimp viruses (WSSV and MBV) in postlarvae of *Penaeus monodon* in the Philippines. *Aquaculture*. 25: 142-149.
- Olesky, M., Hobbs, M. and Nicholas, R. A. 2002. Identification and analysis of amino acid autations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(9): 2811-2820.
- Pongsomboon, S., Wongpanya, R., Tang, S., Chalorsrikul, A. and Tassanakajon, A. 2008. Abundantly expressed transcripts in the lymphoid organ of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and their implication in immune function. *Fish and Shellfish Immunology*, 25, 485-493.
- Reed, R. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating 50 percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 27: 493-497.
- Somboonwiwat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., Yannick Gueguen, Y., Boze, H., Moulin, G. and Bachere, E. 2005. Recombinant expression and anti-microbial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*. 29(10): 841-851.
- Somboonwiwat, K., Supungul, P., Rimphanitchayakit, V., Aoki, T., Hirono, I. and Tassanakajon, A. 2006. Differentially expressed genes in hemocytes of *Vibrio harveyi* challenged shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 39. 26-36.
- Thanh, N. M., Barnes, A. C., Mather, P. B., Li, Y. and Lyons, R. E. 2010. Single nucleotide polymorphisms in the actin and crustacean hyperglycemic hormone genes and their correlation with individual growth performance in giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*. 301: 7-15.

- Tharntada, S., Ponprateep, S., Somboonwiwat, K., Liu, H., Soderhall, I., Soderhall, K. and Tassanakajon, A. 2009. Role of antilipoplysaccharide factor from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection from white spot syndrome virus infection. *Journal of General Virology*. 90: 1491-1498.
- Vatanavicharn, T., Supungul, P., Puanglarp, N., Yingvilasprasert, W. and Tassanakajon, A. 2009. Genomic structure, expression pattern and functional characterization of crustinPm5, a unique isoform of crustin from *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*. 153: 244-252.
- Wang, L., Li, F., Wang, B. and Xiang, L. 2013. A new shrimp peritrophin-like gene from *Exopalaemon carinicauda* involved in white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology*. 35: 840-846.
- Xiong, L., Lee, H., Huang, R. and Zhu, J. K. 2004. A single amino acid substitution in the Arabidopsis FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *The Plant Journal*. 40: 536-545.
- Yi, Q., Liu, R., Sun, R., Wang, L., Zhou, Z., Wang, M., Liu M., Sun, J., Madzak, C. and Song, L. 2014. The protection of CpG ODNs and *Yarrowia lipolytica* harboring VP28 for shrimp *Litopenaeus vannamei* against White spot syndrome virus infection. 11: 119-131.
- Yu, M., Cheng, Y. and Rothschild, M. 2006. SNP analysis of molting-related genes in *Penaeus monodon* and *Litopenaeus vannamei*. *Dummerstorf*. 49(4): 411-412.
- Zeng, D., Chen, X., Li, Y., Peng, M., Ma, N., Jiang, W., Yang, C. and Li, M. 2008. Analysis of HSP70 in *Litopenaeus vannamei* and detect of SNPs. *Journal of Crustacean Biology*. 28(4): 727-730.