

**MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF GIANT BLACK
TIGER PRAWN, PENAEUS MONODON INFECTED WITH
YELLOW-HEAD VIRUS**

KORNNIKA KHANOBDEE

**With compliments
of**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-663-673-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

74
K2077
2000
12

43959 e.1

3837068 SCAN/D : MAJOR : ANATOMY ; Ph.D. (ANATOMY)

KEY WORDS : YELLOW-HEAD VIRUS / YELLOW-HEAD DISEASE / APOPTOSIS / PENAEUS MONODON / GIANT BLACK TIGER PRAWN / NECROSIS / TUNEL / DAPI / TEM

KORNNIKA KHANOBDEE : MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF GIANT BLACK TIGER PRAWN, PENAEUS MONODON INFECTED WITH YELLOW-HEAD VIRUS. THESIS ADVISORS : BOONSIRM WITHYACHUMNARNKUL, M.D., Ph.D., TIM FLEGEL, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D., VICHAI BOONSAENG, Ph.D. 117 P. ISBN 974-663-673-1

This study was undertaken to investigate the morphological and biochemical changes in giant black tiger prawn, *P. monodon*, following yellow-head virus (YHV) infection at various time sequences. The study included (1) the total haemocyte count, (2) light microscopy (LM) with haematoxylin & eosin and Wright & Giemsa stains, (3) labeling of nuclear DNA by 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL), (4) Transmission electron microscopy (TEM) and (5) determination of specific activity of lactate dehydrogenase (LDH). The shrimp were injected with virulent YHV, and several tissues were studied at different time intervals after the injection. The total haemocyte count at 0 h was $12.29 \times 10^6 \pm 1.93 \times 10^6$ cells/ml. The number decreased to about half of the control level ($p < 0.05$) at 6 h post-injection. It declined progressively ($p < 0.05$) at every sampling point to almost zero at 36 h post-injections. Abnormal nuclei, including pyknosis and karyorrhexis were observed in haemocytes and other tissues, starting from 12 h post-injection. By LM study, it was found that the lymphoid organ of the shrimp was the first organ attacked by YHV, which was at 6 h post-injection. The lymphoid organ also showed the highest degree of destruction, compared to other organs under studied. Extensive destruction by YHV was also observed in haematopoietic tissue and gills at 24 and 36 h post-injection. At 24 h post-injection, nuclear margination and cellular vacuolation were noticed. Labeling study by DAPI and TUNEL showed both chromatin condensation and fragmentation, which are characteristics of apoptosis, in gills and the lymphoid organ of the infected shrimp. The pathological features, particularly in the lymphoid organ, were progressive from 12 h toward 36 h post-injection. The features were further supported by TEM observation, which showed the lymphoid organ of YHV infected shrimp having marginated, condensed and fragmented chromatin without concurrent cytoplasmic damages. The LDH levels were significantly increased in heart and muscles of the moribund YHV-infected shrimp, compared to the control ones, which could reflect and increased glycolysis-dependent energy production. These results strongly suggests that *P. monodon* infected with YHV results in apoptosis in cells of several vital organs, and is probably the cause of the animal death.

3837068 SCAN/D : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; ปร.ค. (กายวิภาคศาสตร์)

กรณีศึกษา ขนบดี : การศึกษาทางโครงสร้างและชีวเคมีในกุ้งกุลาดำที่ติดเชื้อไวรัสหัวเหลือง (MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL STUDIES OF GIANT BLACK TIGER PRAWN, PENAEUS MONODON INFECTED WITH YELLOW-HEAD VIRUS). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : บุญเสริม วิทยชำนาญกุล, M.D., Ph.D., ทิม พลิกเกล, Ph.D., ประเสริฐ โสภณ, Ph.D., วิชัย บุญแสง, Ph.D. 117 หน้า ISBN 974-663-673-1

ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและชีวเคมีในกุ้งกุลาดำหลังได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลืองโดย (1) การนับจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด, (2) การศึกษาเนื้อเยื่อและเม็ดเลือดทางกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (LM) ด้วยการย้อมด้วยสี haematoxylin & eosin และ Wright & Giemsa (3) การติดฉลากดีเอ็นเอด้วย 4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) และ TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) (4) การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (TEM) และ (5) การวัดระดับ specific activity ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ของเนื้อเยื่อต่างๆ และเม็ดเลือด ที่ช่วงเวลาต่างๆหลังการติดเชื้อไวรัสเข้ากล้ามเนื้อ พบว่าจำนวนเม็ดเลือดที่เวลา 0 ชั่วโมงเท่ากับ $12.29 \times 10^6 \pm 1.93 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร และจะลดลงเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของกลุ่มควบคุม เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง การลดลงจะมากขึ้นเรื่อยๆอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในทุกช่วงเวลา ลักษณะผิดปกติของนิวเคลียสซึ่งได้แก่ pyknosis และ karyorrhexis เริ่มสังเกตได้ในเม็ดเลือดและเนื้อเยื่ออื่นๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ โดยการศึกษาทาง LM พบว่าอวัยวะน้ำเหลืองของกุ้งเป็นอวัยวะแรกที่ถูกโจมตีโดยไวรัสหัวเหลือง ซึ่งพบได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ และยังเป็นอวัยวะที่ถูกทำลายสูงสุดเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆที่ศึกษา การทำลายอย่างรุนแรงยังพบได้ในเหงือกและอวัยวะสร้างเม็ดเลือด ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ นอกจากนี้ยังพบ chromatin margination และ cellular vacuolation ในเนื้อเยื่อเหล่านี้ที่เวลา 24 ชั่วโมงไปแล้ว การติดฉลากดีเอ็นเอโดย DAPI และ TUNEL จะพบทั้ง chromatin condensation และ fragmentation ซึ่งเป็นคุณลักษณะจำเพาะของ apoptosis ทั้งในอวัยวะน้ำเหลืองและในเหงือก ตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อเป็นต้นไป โดยเฉพาะในอวัยวะน้ำเหลือง และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 36 ชั่วโมงหลังการติดเชื้อ การศึกษาทาง TEM พบว่า มีการเกิด nuclear margination, condensation และ fragmentation ของ chromatin โดยปราศจากการเปลี่ยนแปลงในไซโทพลาสซึม พบการเพิ่มขึ้นของระดับ specific activity ของ lactate dehydrogenase ในกล้ามเนื้อและหัวใจของกุ้งใกล้ตายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นการสะท้อนถึงความต้องการพลังงานจากกระบวนการ glycolysis จากผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ชัดว่ามีการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในอวัยวะสำคัญหลายแห่งของกุ้งกุลาดำที่ได้รับเชื้อไวรัสหัวเหลือง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการตายในกุ้งเหล่านี้