การตอบสนองในระดับโมเลกุลและความเป็นพิษของคลอร์ไพรีฟอสในกุ้งกุลาดำ

นางสาว ทัศนีย์ เอี่ยมกมล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

MOLECULAR RESPONSES AND THE TOXICITY OF CHLORPYRIFOS IN GIANT TIGER SHRIMP

Miss Tassanee Eamkamon

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Environmental Management
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2006

ทัศนีย์ เอี่ยมกมล : การตอบสนองในระดับโมเลกุลและความเป็นพิษของคลอร์ไพรีฟอสในกุ้งกุลาดำ (MOLECULAR RESPONSES AND THE TOXICITY OF CHLORPYRIFOS IN GIANT TIGER SHRIMP) อ. ที่ปรึกษา: ศ. ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ณรงค์ศักดิ์ พ่วงลาภ 210 หน้า.

การศึกษาถึงผลของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพรีฟอสในกุ้งกุลาดำ *P. monodon* ในการศึกษานี้ประกอบด้วยความเป็นพิษเฉียบพลัน การยับยั้งระดับของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม สำหรับการศึกษาถึงความเป็นพิษเฉียบพลันด้วยระบบปิดพบว่าค่า LC_{50} ที่คำนวณได้ที่เวลา 24 ถึง 96 ชั่วโมงคือระหว่าง 52.43 และ 20.74 µg/l การยับยั้งระดับของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเหงือกของกุ้ง พบว่าที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลัน ที่ 68.1 และ 681 µg/l ระดับของเอนไซม์ลดลง 1.7 และ 3.3 เท่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมภายใน 30 นาทีภายหลังการสัมผัสสาร (N=5, P<0.05) สำหรับความเข้มข้นต่ำ ที่ 0.681 µg/l ระดับของเอนไซม์ลดลง 1.9 เท่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมภายหลัง 72 ชั่วโมงที่ได้รับการสัมผัสสาร (N=5, P<0.05) การลดลงอย่างชัดเจนของระดับของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ความเข้มข้นต่ำ 0.681 µg/l ซึ่งต่ำกว่าค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง ถึง 30 เท่า แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพต่อการได้รับคลอร์ไพรีฟอส การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยวิธี single-cell gel electrophoresis ชี้ให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ DNA tail length และ tail moment เมื่อเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งสัมผัสคลอร์ไพรีฟอสที่ 0.034 and 0.170 µg/l เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควาบคุม (N = 3, P<0.05) และผลยังปรากฏอยู่ 6 ชั่วโมงภายหลังที่สัมผัสสารที่ 0.170 µg/l การค้นหายีนที่มีศักยภาพในการใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพต่อการได้รับคลอร์ไพรีฟอสด้วยเทคนิค mRNA DDRT-PCR พบ 44 transcript ที่มีการแสดงออกที่แตกต่างระหว่างกลุ่มของกุ้งที่ได้รับคลอร์ไพรีฟอส ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี BLASTx (NCBI) พบว่า 22 transcript เป็นยีนที่มีการศึกษาและระบุชนิดแล้ว (16 up-regulated และ 6 down-regulated) และ22 transcript เป็นยีนที่ยังไม่ได้มีการศึกษาระบุชนิด (8 up-regulated และ 14 down-regulated) การศึกษาถึงระดับการแสดงออกของยีนประกอบด้วย cytochrome P450, beta glucuronidase, heat shock protein 70, heat shock protein 90, vitellogenin และ glutathione-s-transferase และ ยีนจาก mRNA DDRT-PCR ประกอบด้วย OPA07G350-27-1 (LDL receptor member LR3), UBC101C-1,000-D-3 (esterase), UBC119A-650-F-5 (*CYP330A1*), OPA18G-600-4-1 (ubiquitin-like-7), OPA01G-415-1 (leucine zipper protein 5), และ OPA02G-450-2 (sequence of unknown gene) ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่าไม่มีความแตกต่างในระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในกลุ่มของกุ้งที่สัมผัสคลอร์ไพรีฟอสที่ความเข้มข้น 0-27.24 µg/l ภายใน 96 ชั่วโมง การค้นหา full length cDNA ด้วยเทคนิค RACE-PCR ทำให้ได้ full length cDNA ของ 3 ยีน ประกอบด้วย carboxylesterase (1,746 bp ORF คิดเป็น 582 amino acid), cytochrome P450 (1,530 bp ORF คิดเป็น 510 amino acids), และ glutathione-s-transferase (654 bp ORF คิดเป็น 218 amino acids) ซึ่งเป็นการพบครั้งแรกในกุ้งกุลาดำ ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงข้อมูลพื้นฐานสำหรับความเป็นพิษของคลอร์ไพรีฟอสต่อกุ้งกุลาดำและศักยภาพของการใช้ระดับของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในการใช้เป็นเครื่องหมายทางชีวภาพต่อการได้รับคลอร์ไพรีฟอส

ลายมือชื่อนิสิต.....ทัศนีย์ เอี่ยมกมล.....

สาขาวิชา..สหสาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม..ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4689668720 : MAJOR ENVIRONMENTAL MANAGEMENT
KEY WORD: PENEAUS MONODON / CHLORPYRIFOS / TOXICITY
TASSANEE EAMKAMON : MOLECULAR RESPONSES AND THE TOXICITY OF CHLORPYRIFOS IN GIANT TIGER SHRIMP. THESIS ADVISOR : PROFESSOR PIAMSAK MENASVETA, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : NARONGSAK PUANGLARP, Ph.D., 210 pp.

To examine the effects of chlorpyrifos to *P. monodon*, acute toxicity, inhibition of acetylcholinesterase activity, genotoxicity, and molecular responses of the exposed shrimps to chlorpyrifos were studied. Using static system, the LC_{50} values after 24 to 96 h of exposure were between 52.43 and 20.74 µg/l. Acetylcholinesterase activities observed in shrimp exposed to the lethal concentration of 68.1 and 681 µg/l of chlorpyrifos were 1.7 and 3.3 times lower than that of control shrimp after 30 min exposure ($N=5$, $P<0.05$). The enzyme activity in shrimp exposed to the sub-lethal concentration at 0.681 µg/l of chlorpyrifos was 1.9 times lower than that of control shrimp after 72 h exposure ($N=5$, $P<0.05$). The sensitive reduction of AChE activity at the sub-lethal concentration was 30 times lower than 96 h LC_{50} value, indicating the potential use as biomarker of chlorpyrifos exposure. The *in vitro* testing for genotoxicity using single-cell gel electrophoresis revealed significant increase of the DNA tail length and tail moments detected from the haemocytes exposed to 0.034 and 0.170 µg/l of chlorpyrifos in comparison with that of control group within 1 h ($N = 3$, $P<0.05$) and the evidences were still detected after 6 h exposure to 0.170 µg/l of chlorpyrifos. Screening for candidate genes of the shrimp induced by chlorpyrifos exposure using mRNA DDRT-PCR revealed forty-four differential displayed transcripts. BLAST result identified 22 transcripts (16 up-regulated and 6 down-regulated) as known genes and 22 transcripts as unknown genes and genes similar to hypothetical proteins found in other species (8 up-regulated and 14 down-regulated). Expression analysis of well-characterized genes including cytochrome P450, beta glucuronidase, heat shock protein 70, heat shock protein 90, vitellogenin, and glutathione-s-transferase as well as genes obtained from mRNA DDRT-PCR, including OPA07G350-27-1 (LDL receptor member LR3), UBC101C-1,000-D-3 (esterase), UBC119A-650-F-5 (*CYP330A1*), OPA18G-600-4-1 (ubiquitin-like-7), OPA01G-415-1 (leucine zipper protein 5), and OPA02G-450-2 (sequence of unknown gene) were carried out using semi-quantitative RT-PCR. The results showed no significant difference in expression level among group of shrimp exposed to 0-27.24 µg/l chlorpyrifos within 96 h. Using RACE-PCR, full length cDNA of carboxylesterase (1,746 bp ORF encoding 582 amino acids), cytochrome P450 (1,530 bp ORF encoding 510 amino acids), and glutathione-s-transferase (654 bp ORF encoding 218 amino acids) were firstly reported. The results from this study provided basic information for toxicity of chlorpyrifos to *P. monodon* and revealed the potential use of acetylcholinesterase activities as biomarker for detecting the pesticide exposure.

Student's signature..Tassanee Eamkamon.....

Field of study..Environmental Management..Advisor's signature.....

Academic year .....2006..... Co-advisor's signature.....Narongsak Puanglarp.....

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my deepest sense of gratitude to my advisor, Professor Dr. Piamsak Menasveta and my co-advisor, Dr. Narongsak Puanglarp for their guidance, encouragement, valuable suggestion and supports throughout my study

My gratitude is also extended to Dr. Manaskorn Rachakornkij, Assistant Professor Dr. Kumthorn Thirakhupt, Dr. Sirawut Klinbunga, Dr. Ekawan Luepromchai, and Dr. Tawan Limpiyakorn for serving as thesis committee, for their recommendations and also useful suggestions.

I wish to acknowledge to National Research Center for Environmental and Hazardous Waste Management, Center of Excellence for Marine Biotechnology (CEMB), National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) for my financial support.

Thanks are also expressed to all my friends, colleagues, and everyone in CEMB, Chulalongkorn University for friendships and helps.

Finally, I would like to express my deepest gratitude to my family for their love, care, and encouragement extended throughout my study.

CONTENTS

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES