



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานการวิจัย

การพัฒนาแลกติกแอซิดแบบที่เรียเป็นอาหารโปรไบโอติกสำหรับกระตุ้น
ภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงาม

โดย

รศ.ดร. จันทรประภา อิมจงใจรัก

ดร. ปิติ อำพายัพ

ดร. วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี

2563



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานการวิจัย

การพัฒนาแลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นอาหารโปรไบโอติกสำหรับกระตุ้น

ภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงาม

โดย

รศ.ดร. จันทร์ประภา อิมจงใจรัก

ดร. ปิติ อัมพายัพ

ดร. วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี

2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีงบประมาณ 2561(CU_GR_61_010_23_003) ผู้วิจัยขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

บทคัดย่อ

ปลากัดไทย *Betta splendens* เป็นหนึ่งในปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมในระดับโลก ในงานวิจัยนี้ศึกษาการใช้โปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* strain SGLAB01 และ *Lactococcus lactis* strain SGLAB02 ที่แยกได้จากลำไส้กุ้ง ในการผสมในอาหารปลากัดสวยงาม และศึกษาผลของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงาม จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดจากลำไส้ปลากัดสวยงาม พบว่าโปรไบโอติกทั้ง 2 ชนิด ที่ผสมลงในอาหารปลาสามารถรอดชีวิตและยึดเกาะกับลำไส้ของปลากัดสวยงามได้ นอกจากนี้ เมื่อศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina พบว่าได้ทรานสคริปโตมขนาด 4.46 Gb ประกอบด้วย 71,775 unigenes โดย 37,694 unigenes เป็นยีนใน 44 KEGG pathway ซึ่งรวมถึง pathway ของระบบภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ จากข้อมูลทรานสคริปโตมยังทำให้ค้นพบยีนของเพปไทด์ต้านจุลชีพจำนวน 5 ยีน จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนหลังจากการให้อาหารที่ผสมโปรไบโอติก พบว่าปลากัดที่ได้กินอาหารผสมโปรไบโอติกมีการแสดงออกของยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ Piscidin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกสามารถกระตุ้นยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลากัดได้ งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการใช้โปรไบโอติกในอาหารปลากัด และการศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย ข้อมูลที่ได้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาในด้านเทคโนโลยีชีวภาพของอาหารปลาสวยงามในอนาคต

Abstract

Siamese fighting fish (*Betta splendens*) is one of the popular ornamental fish in the global trade. The effect of the two probiotic lactic acid bacteria, the *Lactobacillus plantarum* strain SGLAB01 and the *Lactococcus lactis* strain SGLAB02, isolated from shrimp gut, on immune parameter of Siamese fighting fish, were evaluated in this study. Analysis of viable colony count showed that the two probiotic LABs, administered via oral route as feed supplement, could adhere in the fish gut. Moreover, to generate a de novo transcriptome for betta fish, Illumina sequencing produced a total of 4.46 Gb clean reads, which were assembled into 71,775 unigenes. 37,694 unigenes were mapped to 44 KEGG pathways including the immune system pathway. The five antimicrobial peptide gene were successfully identified. The effect of probiotics supplementation on modulation of the fish immunity was investigated in vivo, and the results showed that administration of the two probiotics significantly increased the relative mRNA expression of Piscidin antimicrobial peptide, suggested that administration of these probiotics could modulate the immunity in betta fish. This study provides the probiotic supplementation method and transcriptome data including antimicrobial peptides of betta fish, which were essential for further research of feed biotechnology of ornamental fish in the near future.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
บทนำ	1
วิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัย	7
สรุปผลการวิจัย	14
เอกสารอ้างอิง	15
ภาคผนวก	17

บทที่ 1

บทนำ

โปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria; LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียชนิดแกรมบวกที่มีบทบาทสำคัญในเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารทั้งในมนุษย์และสัตว์ โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถแยกได้จากธรรมชาติหลายแหล่ง เช่น จากลำไส้ของสิ่งมีชีวิต จากพืช หรือผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทต่าง ๆ และยังจัดเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรค และเพิ่มภูมิคุ้มกันของร่างกาย นอกจากนี้ ในปัจจุบันพบว่ามีการวิจัยเพื่อพัฒนาแลคติกแอซิดแบคทีเรียไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพิ่มมากขึ้น ผลิตภัณฑ์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียจึงอาจเป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารในอนาคต

การเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม (ornamental fishes) เช่น ปลากัดสวยงาม ปลาทอง และปลาหางนกยูง จัดเป็นธุรกิจที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบันทั้งในประเทศไทย และในหลายประเทศทั่วโลก ในประเทศไทยธุรกิจปลาสวยงามเป็นธุรกิจที่เกิดจากฐานความหลากหลายของทรัพยากรธรรมชาติในประเทศ โดยในช่วงปี พ.ศ. 2549 – 2553 พบว่าธุรกิจปลาสวยงามในประเทศไทยได้มีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 500 ถึง 600 ล้านบาทต่อปี โดยประเทศไทยจัดอยู่ในประเทศอันดับต้น ๆ ที่มีการส่งออกปลาสวยงามของโลก อย่างไรก็ตาม ปัญหาของธุรกิจปลาสวยงามของไทยในปัจจุบัน คือ ยังไม่สามารถช่วงชิงความได้เปรียบ และก้าวขึ้นมาเป็นผู้นำในตลาดโลกได้ เนื่องจากยังขาดความเชื่อมโยงแบบบูรณาการทั้งระบบเนื่องจากการดำเนินการในลักษณะต่างคนต่างทำ เกษตรกรขาดการรวมกลุ่ม ขาดการจัดการฟาร์มให้ได้มาตรฐาน ขาดการพัฒนาทางด้านสายพันธุ์ และที่สำคัญ คือ ขาดการพัฒนาทางด้านการผลิตอาหาร ซึ่งอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยพื้นฐานที่มีความจำเป็นต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์ โดยสัตว์ต้องการบริโภคอาหารที่มีคุณภาพดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีความปลอดภัย และมีความเหมาะสมกับชนิดของสัตว์ ซึ่งจะส่งผลทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโต มีสุขภาพที่ดี สามารถต้านทานต่อความเครียด และการเกิดโรคได้ดี และเนื่องจากการเลี้ยงปลาสวยงามจะใช้พื้นที่แคบในตู้หรือขวด ทำให้สภาวะแวดล้อมมีอยู่อย่างจำกัด ส่งผลทำให้น้ำเน่าเสียได้ง่าย และอาจส่งผลต่อเนื่องทำให้ปลาสวยงามขาดแร่ธาตุที่จำเป็น

ต่าง ๆ ทำให้สุขภาพของปลาไม่ดี และป่วยเป็นโรคได้ง่าย ถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการพัฒนาอาหารสำเร็จรูปที่เหมาะสมกับปลาสวยงามหลายชนิด ทั้งในรูปแบบของอาหารเม็ดสำเร็จรูป หรืออาหารที่ผสมโปรไบโอติกเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันและสุขภาพ อย่างไรก็ตาม ธุรกิจอาหารสำหรับปลาสวยงามยังคงจำเป็นต้องมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้อาหารที่มีความเหมาะสมต่อปลาแต่ละชนิดมากยิ่งขึ้น

ปลากัดไทย เป็นสัตว์น้ำประจำชาติ และเป็นปลาที่เป็นเอกลักษณ์ของไทย ปลากัดไทยเป็นที่รู้จักของตลาดโลกในนาม Siamese fighting fish ได้รับความนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลก ปลากัดไทยเป็นปลาในสกุล *Betta* พบในประเทศไทยไม่น้อยกว่า 10 ชนิด (การุณ, 2554; Thongprajukaew et al., 2010a, 2010b; Thongprajukaew, 2013) สำหรับปลากัดที่นิยมเลี้ยงเพื่อส่งออกเป็นปลากัดสวยงาม คือ *Betta splendens* Regan, 1910 (การุณ, 2554; Thongprajukaew et al., 2010a, 2010b; Thongprajukaew, 2013) จากข้อมูลสถิติมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามในแต่ละปี พบว่าปลากัดเป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าการส่งออกสูงเป็นอันดับต้นๆ ของปลาสวยงามที่ส่งออกจากประเทศไทย (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2554) การตลาดในประเทศที่สวนจตุจักรพบว่ามีราคาตั้งแต่ 50 บาท ถึง 1,000 บาท ต่อตัว ขึ้นอยู่กับสี และชนิดของปลากัด ในขณะที่ปลากัดบางตัวซึ่งมีลักษณะพิเศษ และเป็นที่น่าสนใจมาก เช่น ปลากัดลายธงชาติไทย มีราคาสูงกว่า 50,000 บาท แต่จุดอ่อนสำคัญของการเพาะเลี้ยงปลากัด คือ ค่าใช้จ่ายทางด้านอาหารปลาที่มีราคาเพิ่มสูงขึ้น ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลากัด มักเลือกใช้อาหารที่มีชีวิต ซึ่งอาจเป็นพาหะทำให้เกิดโรคติดต่อในปลาได้ เช่น โรคเห็บ ราแบ่ง และโรคเกล็ดพอง ซึ่งหากทางฟาร์ม หรือผู้เลี้ยงปลาให้การรักษาไม่ทันจะส่งผลให้เกิดการตายเป็นจำนวนมาก (การุณ, 2554; Biokani et al., 2014) เกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงเกิดปัญหาการขาดทุนจากการเลี้ยงปลากัดสวยงาม ถึงแม้ความต้องการปลากัดสวยงามในตลาดโลกรวมทั้งการผลิตปลากัดเพื่อการค้ายังมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่มีกำลังซื้อสูง อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารสัตว์ตลอดจนข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยา และอนุพันธุศาสตร์ของปลากัดไทยยังมีการศึกษาอยู่อย่างจำกัด เช่น ไม่มีข้อมูลของยีนที่สำคัญของปลากัด ในขณะที่ปลาสวยงามอื่น ๆ เช่น ปลาทองมียีนที่รายงานไว้จำนวนมากทำให้การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลาทองไปได้ไกล โดยข้อมูลความรู้พื้นฐานนี้มี

ความสำคัญต่อการปรับปรุงคุณภาพของการผลิตปลากัดสวยงาม เช่น การย่อย และการกินอาหาร อาหารสังเคราะห์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่เหมาะสม การสร้างสี พันธุกรรม การผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงสี และรูปร่างของครีบ ระบบการเพาะเลี้ยงแบบหนาแน่น การสืบพันธุ์ และพัฒนาการ การแปลงเพศปลาเป็นเพศผู้ และด้านความหลากหลายทางชีวภาพ

การพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารสัตว์ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาวิจัยการนำโปรไบโอติกมาใช้ในการเลี้ยงปลาสวยงามหลายชนิด โดยโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพจะมีประโยชน์อย่างมากต่อการกระตุ้นสุขภาพ ระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อก่อโรค และยังเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีรายงานการใช้โปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามหลายชนิด โดยพบว่าส่วนใหญ่ได้ผลดี ทำให้ปลาแข็งแรงมากขึ้น และมีประโยชน์อย่างมากต่อการป้องกันการเกิดโรคของปลาสวยงาม จากงานวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันเชื้อก่อโรคในกุ้ง (Chomwong et al., 2016) อย่างไรก็ตามการศึกษาสุขภาพ และผลของโปรไบโอติกต่อปลากัดสวยงามยังคงมีความจำเป็นต้องทราบข้อมูลของกลุ่มยีนดั่งนั้นในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาการใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นโปรไบโอติกเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน รวมทั้งค้นหา และศึกษายีนทั้งหมดของปลากัดไทย โดยสมมติฐานของงานวิจัย คือ (1) การให้โปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียแก่ปลากัดสวยงามจะช่วยลดความเครียด เสริมสุขภาพ และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลากัดสวยงามได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ (2) การค้นหายีนด้วยเทคนิค RNA seq จะทำให้ทราบข้อมูลยีนทั้งหมดของปลากัดสวยงาม ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถพัฒนาอาหารผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปลอดภัย และมีประโยชน์ รวมทั้งได้ข้อมูลของยีนทั้งหมดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในปลากัดไทย เพื่อรองรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากัดสวยงามของไทย ทั้งทางด้านปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาอาหารปลาสวยงามได้มากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์โครงการ

1. ศึกษาการใช้อาหารผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพ และเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของปลากัดไทย
2. ค้นหาทั้งหมดในปลากัดไทย โดยใช้เทคนิค RNA-seq เพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลรองรับการพัฒนากาแฟเพาะเลี้ยงปลากัดสวยงามของไทย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

2.1. การเตรียมเชื้อโปรไบโอติกและผสมอาหารให้ปลากัด

2.1.1 การเตรียมหัวเชื้อโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรีย

เพิ่มจำนวนเชื้อโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรียสองสายพันธุ์ ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* SGLAB01 และ *Lactococcus lactis* SGLAB02 บนอาหาร MRS โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน และวิเคราะห์เซลล์ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ทำการเก็บเซลล์โดยให้มีจำนวนเชื้อ 7×10^9 cfu/ml ในรูปของหัวเชื้อ และเก็บไว้ที่ -80 °C

2.1.2 การตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากัด

ทำการศึกษาความคงทนของโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรียสองสายพันธุ์ในอาหารปลากัด โดยทำการผสมเชื้อโปรไบโอติก 5.0×10^8 cfu ต่ออาหาร 1 กรัม และขั้นตอนต่อมาได้นำไปแช่น้ำ 15 นาที และนำอาหารมาตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติก โดยการนับเชื้อโปรไบโอติกที่ยังคงอยู่ในอาหารเม็ดได้โดยวิเคราะห์จำนวนเชื้อโปรไบโอติกโดยใช้อาหาร MRS

2.1.3 การตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ปลากัด

ศึกษาความคงทนของโปรไบโอติกในลำไส้ปลากัด โดยให้ปลากัดกินอาหารที่ผสมโปรไบโอติกแลกดกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน และตามด้วยการให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 2 วัน และทำการเก็บลำไส้ปลากัดมาทดสอบด้วยการนับเชื้อโดยใช้อาหาร MRS

2.2. การค้นหาสิ่งทั้งหมด ในปลากัดสวยงาม โดยใช้เทคนิค RNA-seq

นำปลากัดมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วันเพื่อพักปลา ทำการเก็บตัวอย่างปลา มาสกัด RNA ด้วยชุด RNAiso plus (Takara) วัดความเข้มข้นของ RNA ด้วยเครื่อง Nano Drop 2000 (Thermo Scientific) แล้วทำการตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) หลังจากนั้น นำ RNA ไปทำการสกัด mRNA ด้วย TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina) ทำการสร้างห้องสมุด cDNA ด้วย SuperScript II reverse transcriptase kit (Invitrogen) และเพิ่มจำนวน cDNA ด้วย TruSeq PE Cluster kit (Illumina)

นำห้องสมุด cDNA ที่เตรียมได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq™ 4000 จากนั้น นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์โดยทำ *de novo* assembly ด้วยโปรแกรม Trinity จากนั้นนำ Unigene ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank

และ UniProtKB/SwissProt โดยใช้โปรแกรม Blast ทำนายหน้าที่ของ Unigene โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปต่างๆ จากฐานข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ Blast2GO, Gene Ontology database (GO), Clusters of Orthologous Groups (COG) และ Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)

2.3. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค RT-PCR

ค้นหายีนในระบบภูมิคุ้มกันโดยมุ่งเน้นศึกษาเพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ในปลาปัก แล้วนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในลำไส้ของปลาปัก โดยสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อนำมาสร้าง cDNA และวิเคราะห์ด้วย RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้ จากนั้นเลือกยีนในกลุ่มนี้มาตรวจการแสดงออกของยีนในลำไส้ปลาปักภายหลังจากให้กินอาหารเม็ดที่ผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่กินอาหารปกติเป็นเวลา 16 วัน

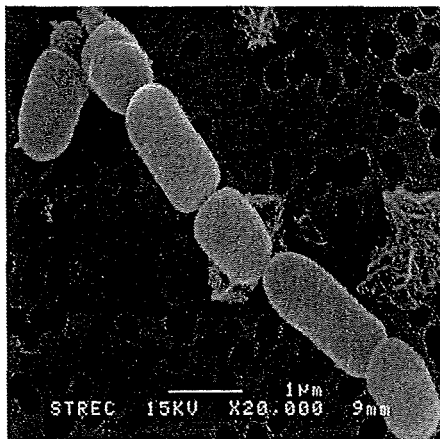
บทที่ 3

ผลการวิจัย

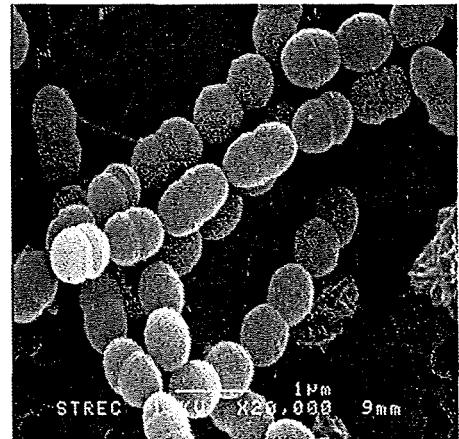
3.1 การเตรียมเชื้อโปรไบโอติกและผสมอาหารให้ปลากัด

3.1.1 การเตรียมหัวเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียสองสายพันธุ์ ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* SGLAB01 และ *Lactococcus lactis* SGLAB02 บนอาหาร MRS โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 2 วัน และนำเซลล์โปรไบโอติกดังกล่าวมาวิเคราะห์ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM) ผลแสดงดังรูปที่ 1



Lactobacillus plantarum
SGLAB01

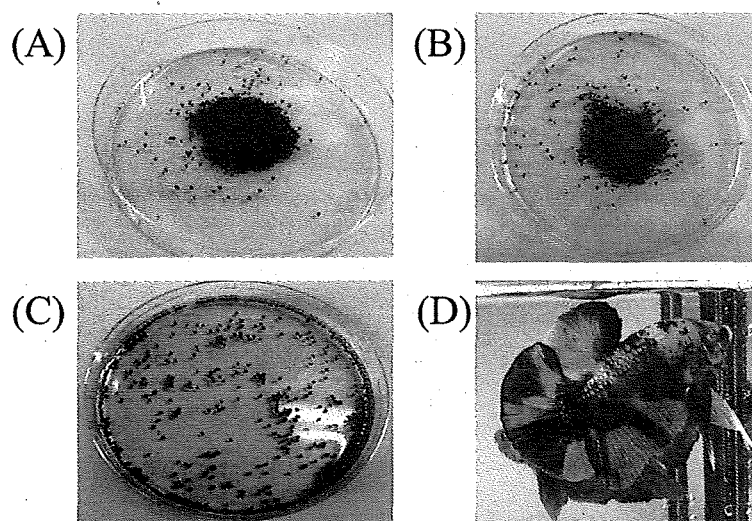


Lactococcus lactis
SGLAB02

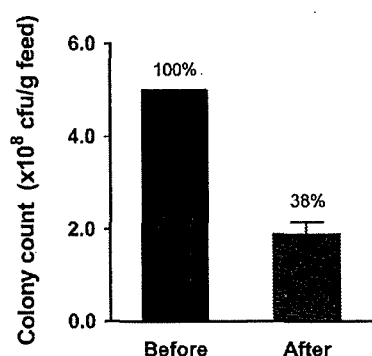
รูปที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* SGLAB01 และ *Lactococcus lactis* SGLAB02 วิเคราะห์ด้วย Scanning Electron Microscopy (SEM)

3.1.2 การตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากัด

จากการศึกษาความคงทนของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่ผสมลงในอาหารปลากัด โดยการนับเชื้อโปรไบโอติกที่ยังคงอยู่ในอาหารเม็ดได้ พบว่าอาหารปลาที่ถูกนำไปแช่น้ำ 15 นาที ยังคงมีเชื้อโปรไบโอติกคงอยู่ในอาหารเม็ดเฉลี่ยเท่ากับ 1.9×10^8 cfu ต่ออาหาร 1 กรัม (แสดงดังรูปที่ 3) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อโปรไบโอติกยังคงอยู่ในอาหารเม็ดปลากัดได้



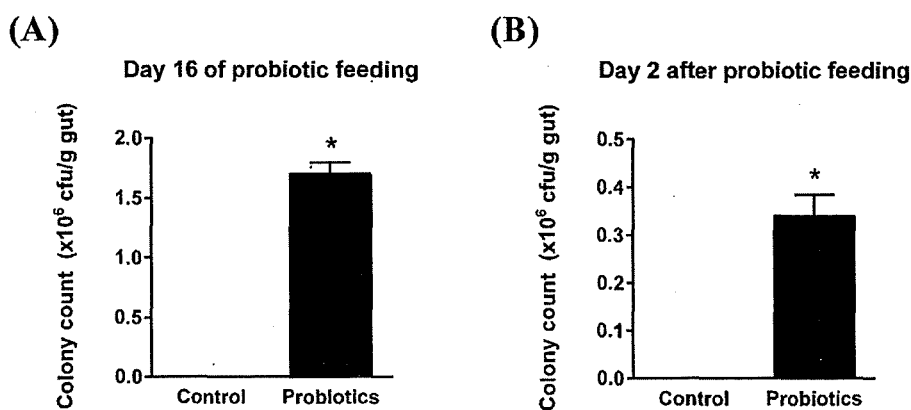
รูปที่ 2 อาหารปลากัดและปลากัดที่ใช้ในการทดลอง (A) อาหารปลากัดก่อนผสมโปรไบโอติก (B) อาหารปลากัดหลังผสมโปรไบโอติก (C) อาหารปลากัดหลังผสมโปรไบโอติกที่แช่น้ำเป็นเวลา 15 นาที และ (D) ปลากัดเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3 จำนวนเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากัด ตรวจนับจำนวนเชื้อโปรไบโอติกในอาหารเม็ดโดยใช้ MRS เปรียบเทียบจำนวนเชื้อระหว่างก่อนและหลังแช่อาหารในน้ำเป็นเวลา 15 นาที

3.1.3 การตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ปลากัด

จากการศึกษาความคงทนของโปรไบโอติกในลำไส้ ผลจากการทดลองให้ปลากัดกินอาหารที่ผสมโปรไบโอติก แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน และตามด้วยการให้อาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 2 วัน และทำการเก็บลำไส้ปลามาทดสอบด้วยการนับเชื้อโดยใช้อาหาร MRS พบว่าปลาที่กินอาหารปกติ (ไม่ผสมโปรไบโอติก) ไม่พบเชื้อเจริญบนอาหาร MRS ในขณะที่ปลาที่ให้กินอาหารที่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 16 วัน มีเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS เฉลี่ยเท่ากับ 1.7×10^6 cfu ต่อ ลำไส้ปลากัด 1 กรัม และมีเชื้อในลำไส้ปลากัดที่ให้กินอาหารไม่ผสมเชื้อต่อเป็นเวลา 2 วัน มีเชื้อเฉลี่ยเท่ากับ 3.4×10^5 cfu ต่อ ลำไส้ปลากัด 1 กรัม (แสดงดังรูปที่ 4) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียยังมีชีวิตและคงทนอยู่ในลำไส้ของปลากัดได้

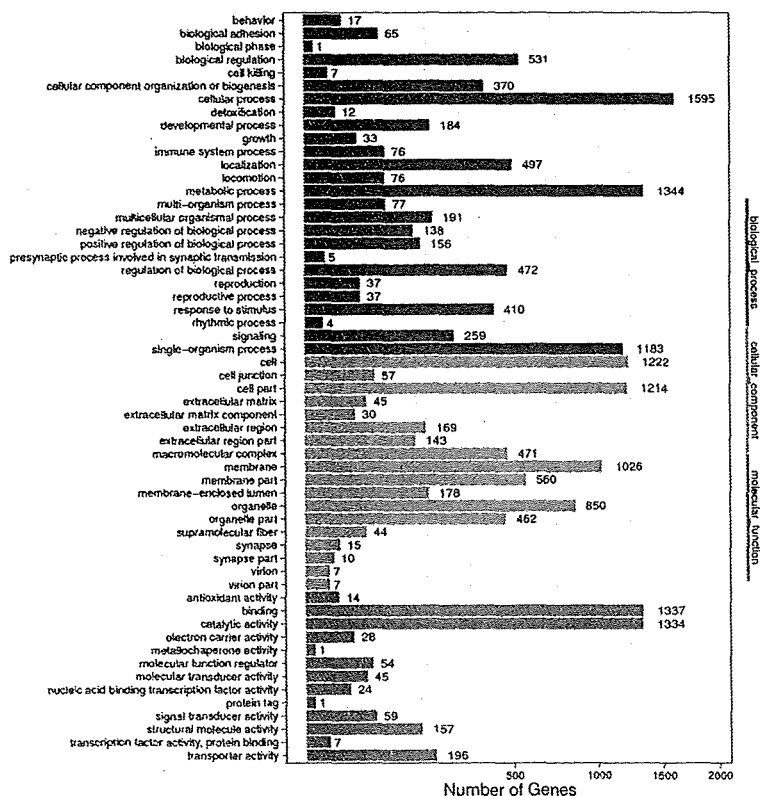


รูปที่ 4 จำนวนเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ปลา กัด (A) จำนวนเชื้อในลำไส้ปลาที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน และ (B) จำนวนเชื้อในลำไส้ปลาที่กินอาหารผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน ตามด้วยอาหารปกติที่ไม่ผสมโปรไบโอติกเป็นเวลา 2 วัน เปรียบเทียบผลกับกลุ่มควบคุมที่กินอาหารปกติ (ไม่ผสมโปรไบโอติก)

3.2. การค้นหายีนทั้งหมด ในปลากัดสวยงาม โดยใช้เทคนิค RNA-seq

ผลจากการวิเคราะห์ยีนในปลากัดโดยใช้เทคนิค RNA-seq ด้วยระบบ Illumina Hisec sequencing พบว่าสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้รวมทั้งหมด 4.46 Gb bases และเมื่อทำการ assemble sequence พบว่ามีจำนวนยีน 71,775 Unigenes มีความยาวรวม 79,513,602 bp ยีนมีความยาวเฉลี่ย 1,107 bp และมี GC content เท่ากับ 49.79 % เมื่อทำการวิเคราะห์ Unigenes เพื่อค้นหาหน้าที่ของยีนกับฐานข้อมูลจำนวน 7 ฐานข้อมูล ค้นพบว่ามียีนที่มีความเหมือนกับฐานข้อมูลต่างๆ ดังนี้ เหมือนกับฐานข้อมูล NR (non-redundant protein sequence database) จำนวน 45,316 ยีน (NR: 63.14%), ฐานข้อมูล NT (nucleotide sequence database) จำนวน 47,287 ยีน (NT: 65.88%), ฐานข้อมูล Swisspro (UniProtKB/Swiss-Prot) จำนวน 39,105 ยีน (Swissprot: 54.48%), ฐานข้อมูล COG (Cluste of Orthologous Groups of proteins) จำนวน 16,492 ยีน (COG: 22.98%), ฐานข้อมูล KEGC (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) จำนวน 37,694 ยีน (KEGG: 52.52%) ฐานข้อมูล GO (Gene Ontology) จำนวน 4,506 ยีน (GO: 6.28%) และฐานข้อมูล Interpr จำนวน 35,374 ยีน (Interpro: 49.28%) โดยผลจากการวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GC

(Gene Ontology) ค้นพบว่าสามารถแบ่งยีนตามหน้าที่ได้เป็น 3 กลุ่มหลัก ประกอบด้วย (1) Biological process (2) Cellular component (3) Molecular function ซึ่งในส่วนของ Biological process จะประกอบด้วยยีนใน immune system process จำนวน 76 ยีนที่ค้นพบ ผลแสดงดังรูปที่ 5

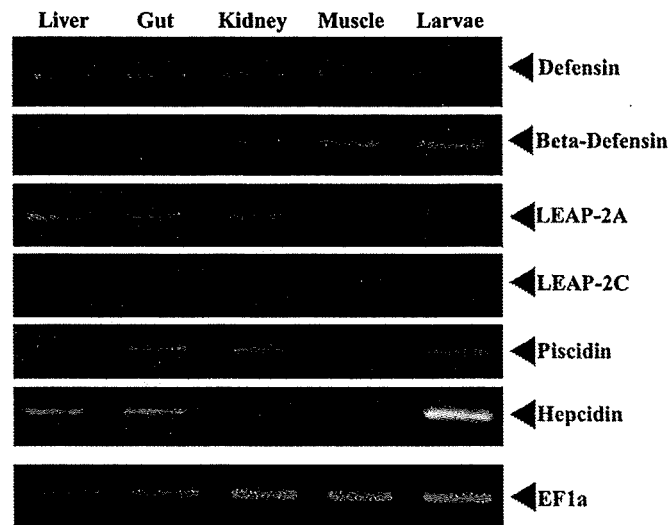


รูปที่ 5 การกระจายตัวของยีนทั้งหมดในปลากัดสวยงามที่ค้นพบโดยใช้เทคนิค RNA-seq จำแนกยีนตามหน้าที่โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GO (Gene Ontology) แกน X แสดงจำนวนยีน แกน Y แสดงหน้าที่ของกลุ่มยีน

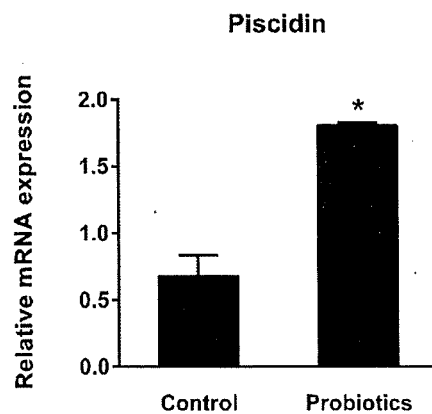
3.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการค้นหายีนในระบบภูมิคุ้มกันโดยมุ่งเน้นศึกษา เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ในปลา กัด ค้นพบยีนของเพปไทด์ต้านจุลชีพ จำนวนทั้งหมด 6 ยีน ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานการค้นพบในปลา กัด ประกอบด้วย (1) Defensin (2) Beta-Defensin (3) liver-expressed antimicrobial peptide-2A (LEAP-2A) (4) liver-expressed antimicrobial peptide-2C (LEAP-2C) (5) Piscidin และ (6) hepcidin-like antimicrobial peptide ผลแสดงดังรูปที่ 6 เมื่อทำการตรวจการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลา กัด โดยวิเคราะห์ด้วย RT-PCR พบว่าจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อต่างๆของปลา กัด จำนวนทั้งหมด 6 ยีน มียีนที่แสดงออกในลำไส้ของปลา กัด จำนวน 5 ยีน ประกอบด้วยยีน Defensin, LEAP-2A, LEAP-2C, Piscidin และ hepcidin

เมื่อเลือกยีนกลุ่มนี้มาตรวจการแสดงออกของยีนในลำไส้ปลา กัด ภายหลังที่ให้กินอาหารที่ผสมโปรไบโอติก ในขั้นแรกได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน เพปไทด์ต้านจุลชีพ Piscidin ในลำไส้ปลา กัด ที่ให้กินอาหารเม็ดที่ผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน และกลุ่มที่กินอาหารปกติเป็นเวลา 16 วันเป็นกลุ่มควบคุม ผลจากการตรวจการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR พบว่าปลา กัดที่ได้กินอาหารผสมโปรไบโอติกมีการแสดงออกของยีน Piscidin เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม ผลแสดงดังรูปที่ 7 ผลเบื้องต้นชี้ให้เห็นว่าโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถกระตุ้นยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลา กัดได้



รูปที่ 6 การแสดงออกของยีนเพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide) ในปลากัด ในเนื้อเยื่อตับ (Liver) ลำไส้ (Gut) ไต (Kidney) กล้ามเนื้อ (Muscle) และลูกปลา (Larvae) ประกอบด้วยยีน (1) Defensin (2) Beta-Defensin (3) liver-expressed antimicrobial peptide-2A (LEAP-2A) (4) liver-expressed antimicrobial peptide-2C (LEAP-2C) (5) Piscidin และ (6) hepcidin-like antimicrobial peptide ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิเคราะห์ด้วย RT-PCR และใช้ EF1- α เป็นยีนควบคุม



รูปที่ 7 การแสดงออกของยีน Piscidin ในลำไส้ปลากัดที่ให้กินอาหารเม็ดที่ผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นเวลา 16 วัน กลุ่มควบคุมคือปลากัดที่ให้กินอาหารปกติเป็นเวลา 16 วัน ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยวิเคราะห์ด้วย RT-PCR และใช้ β -actin เป็นยีนควบคุม

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย

สรุปผลการดำเนินงานครั้งนี้ได้ดำเนินการตามแผนที่วางไว้ โดยงานวิจัยนี้ได้มีผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ จำนวน 1 บทความ และเสนอผลงานในการประชุมวิชาการระดับชาติในรูปแบบ Proceedings จำนวน 1 บทความ โดยมีรายละเอียดของงานวิจัยดังนี้ การเตรียมเชื้อโปรไบโอติกและผสมอาหารให้ปลากัด ได้ทำการเตรียมหัวเชื้อโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารปลากัด และตรวจสอบความคงทนของโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ปลากัด ผลการศึกษาพบว่าวิธีการที่ใช้เตรียมอาหารที่มีเชื้อโปรไบโอติกผสมมีประสิทธิภาพ โดยพบว่าโปรไบโอติกยังคงอยู่ในอาหารเม็ดปลากัด และคงทนอยู่ในลำไส้ของปลากัดได้ และปลาไม่อัตรการรอด 100% ภายหลังจากกินโปรไบโอติกที่ความเข้มข้นของเชื้อ 5.0×10^8 cfu ต่ออาหาร 1 กรัม ในส่วนของการศึกษายีนในปลากัด ได้ทำการค้นหายีนทั้งหมดในปลากัดสวยงามโดยใช้เทคนิค RNA-seq ด้วยระบบ Illumina Hiseq sequencing และทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในระบบภูมิคุ้มกันเพปไทด์ด้านจุลชีพ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยผลการวิเคราะห์พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งหมด 4.46 Gb bases และมีจำนวนยีน 71,775 Unigenes และปลาที่ได้กินอาหารผสมโปรไบโอติกสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนเพปไทด์ด้านจุลชีพ Piscidin ซึ่งเป็นยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะทำให้สามารถได้อาหารผสมโปรไบโอติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ปลอดภัยและมีประโยชน์ และข้อมูลของยีนทั้งหมดที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อนในปลากัดไทย เพื่อรองรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากัดสวยงามของไทย ทั้งทางด้านปรับปรุงพันธุ์และพัฒนาอาหารต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- การุณ ทองประจุแก้ว. (2554). การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้ เทคโนโลยีของเอนไซม์ย่อยอาหาร เพื่อการ เจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). ดุษฎีนิพนธ์ วิทยาศาสตร์ดุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 139 หน้า.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). การศึกษาเศรษฐกิจการผลิตการตลาดปลาสวยงาม. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์ เอกสารวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ กันยายน 2554.
- Biokani, S., Jamili, S., Amini, S., Sarkhosh, J. (2014). The Study of Different Foods on Spawning Efficiency of Siamese Fighting Fish (Species: *Betta splendens*, Family: Belontiidae). Marine Science. 4(2): 33–37.
- Chomwong, S., Amparyup, P., Charoensapsri, W., Tassanakajon, A. (2016). Isolation and investigation of the immunomodulatory functions of lactic acid bacteria from shrimp gut. Proceeding of the 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Natural Resources & Bio-Based Innovative Products. Chiang Mai University, Chiang Mai. pp. 514–529.
- Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Vakili, F. (2015). The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & Shellfish Immunology. 42: 533–538.
- Hosseini, M., Miandare, H.K., Hoseinifar, S.H., Yarahmadi, P. (2016). Dietary *Lactobacillus acidophilus* modulated skin mucus protein profile, immune and appetite genes expression in gold fish (*Carassius auratus gibelio*). Fish & Shellfish Immunology. 59: 149–154.
- Monvises, A., Nuangsaeng, B., Sriwattanarothai, N., Panijpan, P. (2009). The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. ScienceAsia 35: 8–16.

- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K. (2010a). Characterization and expression levels of protease enzymes at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 44(3): 411–423.
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Engkagul, A., Rungruangsak-Torrissen, K. (2010b). Temperature and pH characteristics of amylase and lipase at different developmental stages of Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 44(2): 210–219.
- Thongprajukaew, K., Kovitvadhi, U., Kovitvadhi, S., Somsueb, P., Rungruangsak-Torrissen, K. (2011). Effects of different modified diets on growth, digestive enzyme activities and muscle compositions in juvenile Siamese fighting fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *Aquaculture*. 322–323: 1–9.
- Thongprajukaew, K. (2013). Biology of Siamese Fighting Fish (*Betta splendens* Regan, 1910). *KKU Sci. J.* 41(1): 1-15
- Wang, Y.B., Li, J.R., Lin, J. (2008). Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook *Aquaculture*. 281: 1–4.
- Zhang, C.N., Zhang, J.L., Guan, W.C., Zhang, X.F., Guan, S.H., Zeng, Q.H., Cheng, G.F., Cui, W. (2017). Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* huanghe var. *Fish & Shellfish Immunology*. 68: 84–91.

ภาคผนวก

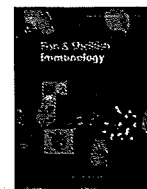
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

Amparyup, P., Charoensapsri, W., Samaluka, N., Chumtong, P., Yocawibun, P. and Imjongjirak, C. Transcriptome Analysis Identifies Immune-Related Genes and Antimicrobial Peptides in Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *Fish and Shellfish Immunology*. (in press).

Impact Factor (2018) = 3.298 : Journal quartile score (Q) = Q1

การเสนอผลงานในการประชุมระดับชาติ

Charoensapsri, W., Yocawibun, P., N., Chumtong, P., Imjongjirak, C. and Amparyup, P.
Transcriptome Analysis and Characterization of the Antiviral Myxovirus-
Resistance (Mx) Gene of Siamese Fighting Fish *Betta splendens*). 58th Kasetsart
University Annual Conference. February, 5-7, 2020, Bangkok, Thailand.



Full length article

Transcriptome analysis identifies immune-related genes and antimicrobial peptides in Siamese fighting fish (*Betta splendens*)

Piti Amparyup^{a,b,*}, Walaiporn Charoensapsri^{a,b}, Nusree Samaluka^c, Parichat Chumtong^{a,b}, Patchari Yocawibun^{a,b}, Chanprapa Imjongjirak^{d,**}

^a Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand

^b Center of Excellence for Marine Biotechnology, Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

^c Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok, 10330, Thailand

^d Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 254 Phayathai Road, Bangkok, 10330, Thailand

ARTICLE INFO

Keywords

Transcriptome
Betta fish
Antimicrobial peptide
Immunity

ABSTRACT

Siamese fighting fish (*Betta splendens*) is one of the most widely cultivated ornamental fish in global trade. However, transcriptomic data, which can reveal valuable genetic data for disease control and prevention, are extremely limited for this species. In this study, whole-body transcriptome sequencing of juvenile betta fish generated 4.457 GB of clean data and a total of 71,775 unigenes using the Illumina HiSeq4000 platform. These unigenes were functionally classified using 7 functional databases, yielding 45,316 NR (63.14%), 47,287 NT (65.88%), 39,105 Swiss-Prot (54.48%), 16,492 COG (22.98%), 37,694 KEGG (52.52%), 4,506 GO (6.28%), and 35,374 Interpro (49.28%) annotated unigenes. Furthermore, we also detected 13,834 SSRs distributed on 10,636 unigenes and 49,589 predicted CDSs. Based on KEGG analysis, five innate immune pathways (997 unigenes) were reported, including the NOD-like receptor signaling pathway, complement and coagulation cascades, toll-like receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway and cytosolic DNA-sensing pathway. Moreover, four antimicrobial peptide (AMP) families (hepcidin, piscidin, LEAP-2, and defensins) from the betta fish transcriptome were also identified. Additionally, cDNA and genomic DNA of two β -defensins was successfully isolated from four betta fish species. RT-PCR analysis showed that *BsBD1* transcripts were most abundant in the muscle and kidney and *BsBD2* transcripts were most abundant in the gill. The genomic organization showed that the *BD1* and *BD2* genes consisted of three exons and two introns according to the GT-AG rule. Most importantly, this is the first report of the betta fish whole-body transcriptome obtained by high-throughput sequencing. Our transcriptomic data and the discovery of betta fish AMPs should promote a better understanding of molecular immunology for disease prevention for further ornamental fish aquaculture.

1. Introduction

Siamese fighting fish (*Betta splendens*) is one of the most popular aquarium fish in the world. In Thailand, *B. splendens* is a very important ornamental species due to its high economic value from global exports in aquarium fish markets. To date, Siamese fighting fish trade is a developing worldwide industry. More than 50% of betta fish originate from Asian countries, including Thailand. Among the several *Betta* species, the most well-known is *B. splendens* (often known as Siamese fighting fish) [1,2]. The expansion of the ornamental fish industry worldwide has caused widespread pathogenic infection, which is a major concern for the sustainable development of betta fish farming.

However, despite its commercial importance, little is known about the molecular biology and immune defense of *B. splendens*. Therefore, studying the transcriptomes of this species is necessary to better understand their mole-

cular biology and immunity. Available transcriptomic information could lead to a better understanding of the molecular mechanisms required for betta fish to improve their health and to control diseases in this species. In recent years, increasing occurrences of diseases in betta fish, such as mycobacteriosis, skin nodule syndrome and big belly syndrome, have been reported [3-7]. Approaches to minimize disease losses are mainly based on the use of chemical and antibiotic agents; however, indiscriminate antibiotic use has led to the emergence of the growing problem of microbial resistance. Thus, studying the genes involved in the betta fish immune system will help to better understand the innate immune response in this fish and to prevent pathogenic microorganism invasion.

The innate immune system plays an important role in defense against pathogens in fish that live in microorganism-rich aquatic conditions. Antimicrobial peptides (AMPs) are crucial effector molecules that can play a vital

* Corresponding author. Marine Biotechnology Research Team, Integrative Aquaculture Biotechnology Research Group, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Road, Klong 1, Klong Luang, Pathumthani, 12120, Thailand.

** Corresponding author.

E-mail addresses: piti.amp@biotec.or.th (P. Amparyup); chanprapa.i@chula.ac.th (C. Imjongjirak)

role in the innate immune response and are present in most living organisms [8]. The first step to discover the key innate immune system of betta fish is to acquire knowledge of its transcriptome. High-throughput technology for RNA sequencing (transcriptome) analysis has been widely used for the discovery of novel genes in several species of fish [9]. The transcriptomes of immune genes have been analyzed in several fish to understand their innate immune mechanisms [10]. To date, more than 90 AMPs in fish have been reported [11]. According to their structural conformation, AMPs are classified into five major groups: defensin, cathelicidin, hepcidin, histone-derived peptides and piscidin. A growing number of AMPs have continuously been identified in fishes [12–14]. However, until now, the molecular immune system of betta fish has not been evaluated. In the present study, we report the transcriptome and characterization of antimicrobial peptides in betta fish. We analyzed the transcriptome profile and identified the main components of pathways related to the immune system. Based on the transcriptome analysis, we discovered five innate immune pathways (NOD-like receptor signaling pathway, complement and coagulation cascades, toll-like receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway, and cytosolic DNA-sensing pathway) and four putative AMP families (hepcidin, piscidin, LEAP-2, and defensins) in betta fish. We analyzed the cDNA and genomic organization of two β -defensins, the important AMPs in the innate immune system, from four species of betta fish. Our work can provide important information about the transcriptome and the innate immune genes in betta fish. Identification of AMPs in betta fish will serve as an important tool to protect ornamental fish aquaculture and will be the basis for the development of novel AMP agents.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and preparation for transcriptome analysis

Cultured Siamese fighting fish, *B. splendens*, with a good swimming ability and no clinical signs of infection (one-month-old juvenile fish with a bodyweight of 0.3 g and body length of 0.5 cm) were purchased from a commercial betta fish farm in Samut Prakan Province, Thailand. Fish were acclimatized in the laboratory for two weeks before experimental manipulation. Fish were fed twice daily with commercial pellet feed, and their feces were siphoned off before feeding. To prepare the samples for transcriptome analysis, three individual betta fish were randomly collected. These RNA-Seq samples were immediately snap-frozen and preserved in liquid nitrogen until RNA extraction. For tissue distribution analysis, the kidney, spleen, liver, gill, gut, and muscle were separately dissected from five individual betta fish (adult fish, 4 months old) with a bodyweight of 1.9 g and body length of 3.8 cm and immediately frozen by liquid nitrogen for tissue distribution analysis.

2.2. RNA isolation, library preparation, and sequencing

RNA sequencing (RNA-Seq) was performed to investigate and determine the transcriptome profile of betta fish *B. splendens*. Frozen betta fish samples were removed from the liquid nitrogen storage tank and finely ground in the presence of liquid nitrogen. Total RNA was extracted from the whole fish body samples using TRIzol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's protocol. Total RNA from each tissue sample was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. The total RNA purity was determined using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA concentration and integrity were analyzed using a RNA 6000 Nano Kit and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., USA). Illumina cDNA libraries were constructed from a 1.0 μ g RNA sample following the manufacturer's protocol (Illumina, San Diego, CA, USA). The transcriptome libraries were subsequently sequenced on the Illumina HiSeq4000 platform (Illumina, San Diego, CA, USA), and 150-bp paired-end reads were generated at BGI, Inc. (China).

2.3. De novo assembly and functional annotation

The raw reads obtained using the Illumina HiSeq4000 platform were treated using BGI, Inc. (China) software to remove technical sequences, including adapters, unknown bases, and low-quality bases ($Q < 15$). The clean data were subsequently *de novo* assembled into contigs and unigenes using the Trinity software (version: v2.0.6) and Tgicl (version: v2.0.6). Functional annotation was based on BLAST searches with the e-value threshold set at $1e^{-5}$ against several nucleotide and protein databases, including NCBI nonredundant protein sequence (NR), NCBI nonredundant nucleotide sequence (NT), Swiss-Prot, InterPro, Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG). The segment of unigenes that best mapped to the functional databases in a priority order of NR, Swiss-Prot, KEGG, and COG were selected as CDS. CDS of unigenes that could not be aligned with any databases mentioned above were further predicted with the ESTScan software (version: v3.0.2) using the Blast-predicted CDS as a model. Unigenes were screened for SSRs (Simple Sequence Repeats) using the MISA software (version: v1.0).

2.4. Discovery of immune-related genes and antimicrobial peptides

To analyze betta fish innate immunity according to KEGG transcriptome analysis, five innate immune pathways were analyzed: the NOD-like receptor signaling pathway, complement and coagulation cascades, toll-like receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway, and cytosolic DNA-sensing pathway.

We attempted to identify new members of betta fish (*B. splendens*) antimicrobial peptides (AMPs) from the assembled transcriptome. Potential nucleotide sequences of AMPs from the betta fish transcriptome were searched using fish AMP databases. The cDNA sequences and deduced amino acid sequences of the betta fish AMPs were analyzed using the ExPASy program (<https://www.expasy.org>). The protein structural domains of the AMPs were predicted using the SMART model (<http://smart.embl-heidelberg.de>). The predicted AMPs were further verified by the BLASTP search program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.5. Identification of β -defensins in betta fish

To characterize the transcripts and genomic organization of β -defensins (β -defensin1 and β -defensin2) from four betta fish species in Thailand, including *Betta splendens*, *B. mahachaiensis*, *B. imbellis* and *B. smaragdina*, total RNA was isolated from whole-body juvenile fish samples from each of these species using Trizol™ Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Betta fish genomic DNA was extracted using the phenol-chloroform extraction method. Fish species were confirmed by a DNA barcoding approach based on the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene (COI) gene sequence.

The full-length ORF and genomic DNA sequences of β -defensin1 and β -defensin2 of *B. splendens* (*BsBD1* and *BsBD2*) were determined using the primers *BsBD1F* and *BsBD1R* for the *BsBD1* gene and *BsBD2F* and *BsBD2R* for the *BsBD2* gene, according to the sequences obtained in this study (Table 1). To identify *BsBD1* and *BsBD2* in other betta fish species, including *B. mahachaiensis*, *B. imbellis*, and *B. smaragdina*, the primers *BsBD1F* (or *BsBD2F*) and *BsBD1R* (or *BsBD2R*) were used to amplify the full ORF and genomic DNA sequences according to the full-length ORF cDNA of *BsBD1* and *BsBD2*. The primers were used to amplify betta fish cDNA and genomic DNA with Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. The PCR parameters were 98 °C for 30 s, followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 3 min, and 72 °C for 5 min. The amplification products were loaded onto a 1.5% agarose gel and visualized under UV light after staining with ethidium bromide solution. The expected band was cut and extracted from the agarose gel using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHERY-

Table 1
Nucleotide sequences of the primers used.

Primer name	Sequence (5'-3')	Purpose
BsBD1F	TGGAGAAATGTATCAGAAGTGATG	Full-length ORF cDNA and genomic DNA
BsBD1R	TGGTTCGTGCGCCATGTCT	Full-length ORF cDNA, genomic DNA and RT-PCR
BsBD2F	CCCAAACATGAAGGGCCTGA	Full-length ORF cDNA, genomic DNA and RT-PCR
BsBD2R	AGAGGGCTGGTTGAGGAAC	Full-length ORF cDNA, genomic DNA and RT-PCR
BsBD1Frt	TGGTTGTGTGGTGCTTGTGG	RT-PCR
BsActinF	AGGCTGTGCTGCCCTGTAT	RT-PCR
BsActinR	GAAGGAGTAGCCACGCTCTG	RT-PCR

NAGEL GmbH & Co. KG, Germany). The purified DNA fragments of the two β -defensins from four species of betta fish were cloned into the pGEM@-T Easy Vector (Promega) for sequencing (U2Bio Co., Ltd.).

2.6. Bioinformatic analysis

The nucleotide and predicted amino acid sequences of the BD1 and BD2 genes from four betta fish species were analyzed using the ExPASy program. The similarity of BD1 and BD2 to other fish species was analyzed using the BLASTP program. The putative signal peptides of BD1 and BD2 was predicted using the SignalP 3.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). A conserved domain search was performed using the SMART program (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). Multiple sequence alignments were performed using the Clustal Omega program.

2.7. Tissue-specific expression analysis of β -defensin1 and β -defensin2 from *B. splendens*

To establish the basal levels of the two β -defensin transcripts (*BsBD1* and *BsBD2*) in separate tissues, mRNAs were analyzed in different organs from betta fish by semiquantitative RT-PCR. Six tissues (spleen, kidney, liver, gut, gill, and muscle) were aseptically sampled from five healthy fish under normal conditions and used for total RNA extraction. Two micrograms of total RNA from the six tissues were used for cDNA synthesis with the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). The expression levels of *BsBD1* and *BsBD2* were analyzed using semiquantitative RT-PCR with β -actin (*BsActinF* and *BsActinR*) as an internal control. PCR analysis (94 °C for 1 min, 25 or 28 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s, followed by 72 °C for 5 min) was performed using specific primers (*BsBD1Frt* and *BsBD1R* for *BsBD1* and *BsBD2F* and *BsBD2R* for *BsBD2*). Eight microliters of the PCR products were analyzed on a 1.8% agarose gel.

3. Results and discussion

3.1. Illumina sequencing and de novo assembly

RNA-Seq on the Illumina HiSeq 4000 sequencing platform was used to sequence the cDNA library constructed from the whole body of juvenile betta fish *B. splendens*. Sequence analysis and assembly were subsequently performed, and de novo transcriptomic data of betta fish was obtained. An overview of the betta fish transcriptome is presented in Table 2. A total of 47.51 million raw paired-end reads were produced from juvenile betta fish. After read filtering by removing low-quality reads, adaptor sequences and ambiguous reads, 44.57 million clean reads with Q20 and Q30 (the proportion of nucleotides with a read quality value larger than 20 or 30, respectively) values of 98.94% and 96.54%, respectively (Table 2) were acquired. Using the Trinity de novo assembly software [15], the obtained clean reads were assembled into 92,890 transcripts with a total length of 90,489,910 bp, a mean length of 974 bp, an N50 length of 2,129 bp, and a GC content of 49.73% (Table 3).

Table 2
Summary statistics of the transcriptome sequencing of *B. splendens*.

Statistic	Raw Read	Clean Read
Total Reads	47,512,594	44,574,046
Total Bases (bp)	4,751,259,400	4,457,404,600
GC content (%)	50.20	50.22
Q20 (%)	97.94	98.94
Q30 (%)	94.79	96.54

Table 3
Summary statistics of the transcriptome assembly of *B. splendens*.

Feature	Transcripts	Unigenes
Total Number	92,890	71,775
Total Length (bp)	90,489,910	79,513,602
Mean Length (bp)	974	1,107
GC content (%)	49.73	49.79
N50 (bp)	2,129	2,225
N70 (bp)	1,155	1,279
N90 (bp)	325	386

The abundance of the assembled transcripts was then removed by clustering with the Tgicl software, and 71,775 unigenes with a mean length of 1,107 bp and an N50 length of 2,225 bp were obtained (Table 3). The total length of the unigenes was 79,513,602 bp. The GC content of the unigenes was 49.79% (Table 3). The length distribution of the unigenes is shown in Fig. 1A.

3.2. Sequence annotation

For unigene functional annotation of the betta fish transcriptome, all the unigenes were searched against 7 functional databases (NR, NT, GO, COG, KEGG, Swiss-Prot and InterPro). The results showed that 53,406 unigenes (74.41% of total unigenes) could be annotated with at least one functional database (Fig. 1B). Of the unigenes, 45,316 (63.14%), 47,287 (65.88%), 39,105 (54.48%), 16,492 (22.98%), 37,694 (52.52%), 4,506 (6.28%), and 35,374 (49.28%) had hits in the NR, NT, Swiss-Prot, COG, KEGG, GO and InterPro databases, respectively (Fig. 1B). The 14,401 unigenes that occupied 20.06% of all annotated genes coexisted among 5 functional databases (NR, Swiss-Prot, COG, KEGG, and Interpro) (Fig. 1C). Based on NT- and NR-annotation analyses, only 63.14% and 65.88% of the unigenes, respectively, were similar to the reference sequences in the NCBI databases.

Top-hit species distribution analysis of the unigenes of Siamese fighting fish (*B. splendens*) with NR-annotation showed that 61.68% of all the annotated transcripts had high sequence similarity against four fish species, namely, large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) (26.46%), bi-color damselfish (*Stegastes partitus*) (25.96%), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (6.09%) and Burton's mouth brooder (*Haplochromis burtoni*) (3.17%) (Fig. 1D).

To analyze the coding DNA sequences (CDSs) after functional annotation, all of the assembled unigenes were determined. We detected 45,067 CDSs (90.88% of all CDSs) from the annotated unigenes. For the unannotated unigenes, ESTScan was used to predict the CDS, and 4,522 CDSs were obtained. The unigene CDS prediction summary is shown in Table 4, and the distribution of the CDS length is presented in Fig. 1E. Moreover, we also detected 13,834 SSRs distributed on 10,636 unigenes. The SSR size summary is shown in Fig. 1F and Table S1.

Transcriptome sequencing has also provided a new avenue for generating abundant sequence information for putative genes in several organisms, including fish [9,10]. Transcriptome analysis has recently been applied to several ornamental fish species, such as guppy, *Poecilia reticulata* [16]; Asian arowana, *Scleropages formosus* [17]; and red crucian carp, *Carassius auratus*, red var [18]. Our results also suggested that the transcriptomic data of the betta fish were effectively assembled and annotated. Moreover, our results suggested

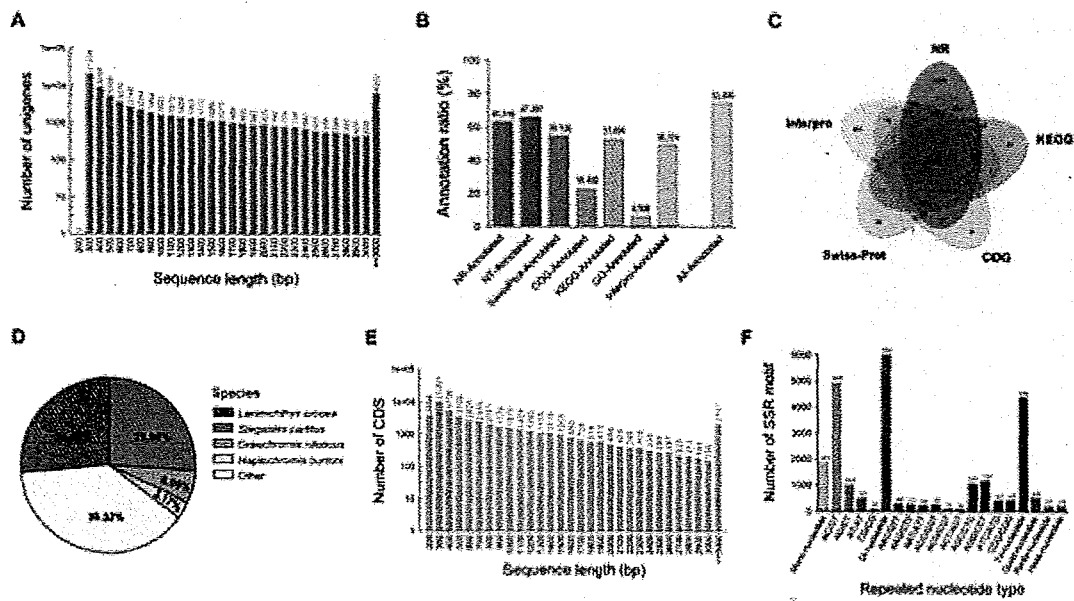


Fig. 1. *De novo* assembly and unigene functional annotation, CDS prediction and SSR detection of the *Betta splendens* transcriptome. (A) Sequence length distribution of the assembled unigenes generated from the whole body of the juvenile betta fish using the Illumina HiSeq4000 platform. (B) Functional annotation of the assembled unigenes. All the assembled unigenes were annotated and functionally classified using seven public databases: Nonredundant protein sequence database (NR), nucleotide sequence database (NT), UniProtKB/Swiss-Prot (Swiss-Prot), Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Gene Ontology (GO), and InterPro. (C) Overlap of the NR-, Swiss-Prot-, COG-, KEGG-, and InterPro-annotated unigenes. (D) The BLAST top hit species distribution of the NR-annotated unigenes. (E) Coding sequence (CDS) length distribution of the assembled unigenes. (F) Simple sequence repeat (SSR) size distribution of the assembled unigenes.

Table 4
Summary statistics of the unigene CDS prediction of *B. splendens* transcriptome.

Feature	Blast	ESTScan	Overall
Total Number	45,067	4,522	49,589
Total Length (bp)	43,964,439	1,306,563	45,271,002
Average Length (bp)	975	288	912
GC content (%)	54.49	52.80	54.44
N50 (bp)	1,587	285	1,539
N70 (bp)	987	237	930
N90 (bp)	408	207	360

that RNA-Seq might provide information on novel genes in betta fish and also indicate that the throughput and sequencing quality was good enough for further downstream characterization.

3.3. Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG) classification

The COG database was used to phylogenetically classify the predicted proteins based on their orthologous relationships from completely sequenced transcriptomes. Of the 71,775 total unigenes, 16,492 unigenes (22.98%) were clustered into 25 COG functional categories (Fig. 2). The general function prediction category comprised the largest group (5,485, 33.26%), followed by replication, recombination and repair (2,579, 15.64%), translation, ribosomal structure and biogenesis (2,535, 15.37%), transcription (2,324, 14.09%), cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (1,981, 12.01%), signal transduction mechanisms (1,912, 11.59%), posttranslational modification, protein turnover and chaperones (1,683, 10.20%), and carbohydrate transport and metabolism (1,535, 9.31%) (Fig. 3). A total of 1,511 unigenes (9.16%) were assigned to the function unknown classification, suggesting that several unique genes are also present in the betta fish transcriptome. Additionally, 133 (0.81%) unigenes were assigned to defense mechanisms. Two COG categories, extracellular structures and nuclear structure, had the fewest sequences (15 and 7 unigenes, respectively).

3.4. Gene Ontology (GO) classification

To classify the predicted functions of the unigenes, Gene Ontology (GO) assignments were used. Based on sequence homology, 4,506 unigenes were categorized into 59 functional groups in three GO assignment categories: biological process (3,194, 70.88%), molecular function (3,562, 79.05%) and cellular component (2,760, 61.25%) (Fig. 3). For the biological process category, which consists of 26 functional classes, cellular process (2,544, 56.46%), single-organism process (2,047, 45.43%) and metabolic process (2,046, 45.41%) were dominant. Additionally, 110 transcripts were annotated as immune system process (110, 2.44%). For cellular component, which consists of 19 functional classes, cell (1,831, 40.63%) and cell part (1,818, 40.35%) were identified as the most common annotations, while membrane (1,342, 29.78%), organelle (1,146, 25.43%) and membrane part (1,044, 23.17%) were the next most abundant. Among molecular functions, which consists of 14 functional classes, binding and catalytic activity accounted for the major proportion, with 2,337 (51.86%) and 1,721 (38.19%) unigenes, respectively.

3.5. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) classification

KEGG pathway analysis was performed for all the unigenes as an alternative approach for the functional categorization and annotation of the unigenes involved in metabolic pathways, including cellular processes, environmental information processing, genetic information processing, human diseases, metabolism, and organismal systems. KEGG analysis of the unigenes showed that 37,694 unigenes were assigned to 44 KEGG metabolic pathways that were summarized in six main categories. The pathways with the most annotated genes were human diseases (18,578; 49.29%), followed by organismal systems (16,352; 43.38%), environmental information processing (9,902; 26.27%), metabolism (9,768; 25.91%), cellular processes (7,941; 21.07%), and genetic information processing (4,431; 11.76%). Additionally, signal transduction (7,166; 19.01%) in the environmental information processing pathway, cancers: overview (3,888; 10.31%) in the human diseases pathway, global and overview maps (3,762; 9.98%) in the metabolism pathway, immune system (3,175; 8.42%) in organismal systems, and endocrine system (3,090; 8.20%) in organ-

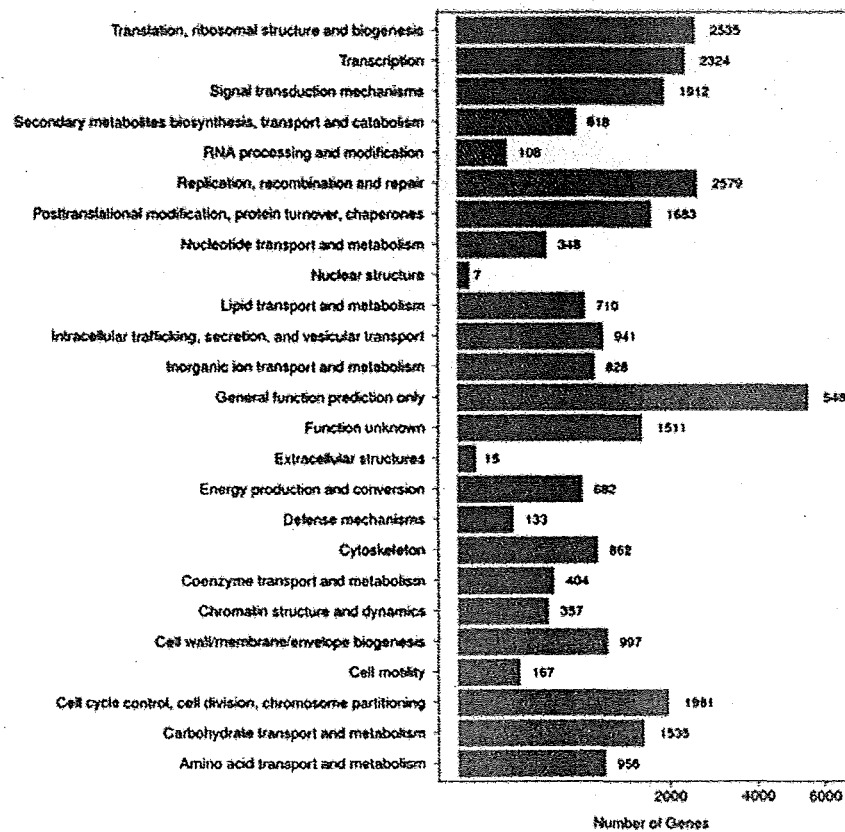


Fig. 2. COG functional classification of the *B. splendens* transcriptome. All the assembled unigenes were aligned to the COG database using the BLAST program. A total of 16,492 unigenes were annotated and classified into 25 COG functional categories. The X-axis represents the number of unigenes. The Y-axis represents the COG functional category. Numbers represent the total number of unigenes in each category.

ismal systems were the top five categories with higher proportions (Fig. 4 and Table S2).

In recent years, the advantage of transcriptomics technologies has increasingly been applied to discover many genes, including immune-related genes in several fish [9,10]. However, this study includes the first reported whole transcriptome generated from the whole bodies of juvenile betta fish, which provides highly valuable gene information for this species, thus promoting ornamental aquaculture. Recently, the first reference genome assembly of Siamese fighting fish has been reported [19]. A total *de novo* assembled 465.24 Mb genome for *B. splendens*, covering 99.93% of the estimated genome size, was obtained. The genome data will provide an important basis for future research in *B. splendens* [19]. More recently, a *de novo* transcriptomic resource for identifying sex-biased genes potentially involved in aggressive behavior modulation has been reported in Siamese fighting fish [20]. A total of 69,836 assembled unigenes have been generated from multiple-tissues, including the brain, heart, muscle, liver, kidney, gut, spleen, gill and gonad (testis or ovary) of one-year-old mature *B. splendens*. Of these, 35,751 unigenes have been annotated in at least one functional database, and 12,751 simple sequence repeats distributed in 9,617 unigenes have been detected for the EST-SSR marker development [20].

3.6. Analysis of innate immune molecules in betta fish

To date, the immune system of betta fish is still largely unknown. We first selected genes from 16 KEGG immune-related pathways. The annotated unigenes and immune-related genes in each KEGG immune pathway are presented in Fig. 5 and Table S3, respectively. The KEGG pathway annotations allowed us to obtain the comprehensive immune characteristics of betta fish.

As a result, a total of 3,175 transcripts involved in 16 immune pathways were found in the present study, such as hematopoietic cell lineage, platelet activation, Toll-like receptor signaling pathway, NOD-like receptor signaling pathway, B-cell receptor signaling pathway and RIG-I-like receptor signaling pathway (Fig. 5). We next focused on innate immune pathways to better understand the immune response of betta fish. We identified 997 unigenes involved in five innate immunity pathways (Fig. 5). The NOD-like receptor signaling pathway (36 genes) was the pathway enriched for the most expressed innate-immune genes, followed by the complement and coagulation cascades (52 genes), toll-like receptor signaling pathway (55 genes), RIG-I-like receptor signaling pathway (41 genes) and cytosolic DNA-sensing pathway (20 genes). To date, several innate immune genes have been extensively studied in a range of teleost species, especially in aquaculture fish species [21–24]. In this study, we focused on the pathways involved in the innate immune response, which provides the crucial first line of host defense against pathogen infections. The discovery of immune-related genes involved in innate immune pathways is useful for understanding the immune mechanism of the betta fish.

3.7. Discovery of antimicrobial peptides in betta fish

Among the innate immunity factors, antimicrobial peptides (AMPs) are the key factor that play an important role in innate immunity. Generally, AMPs are small cationic peptides that are widely distributed in bacteria, protists, fungi, plants, and animals [11,25–29]. In fish, a large number of AMPs have been identified and characterized, including defensins, cathelicidins, hepcidins, piscidins and LEAP-2 (liver-expressed antimicrobial peptide 2) [30,31]. However, no AMP data are available in betta fish to date. In this study, we used a high-throughput RNA-Seq approach to analyze AMP transcripts from betta fish,

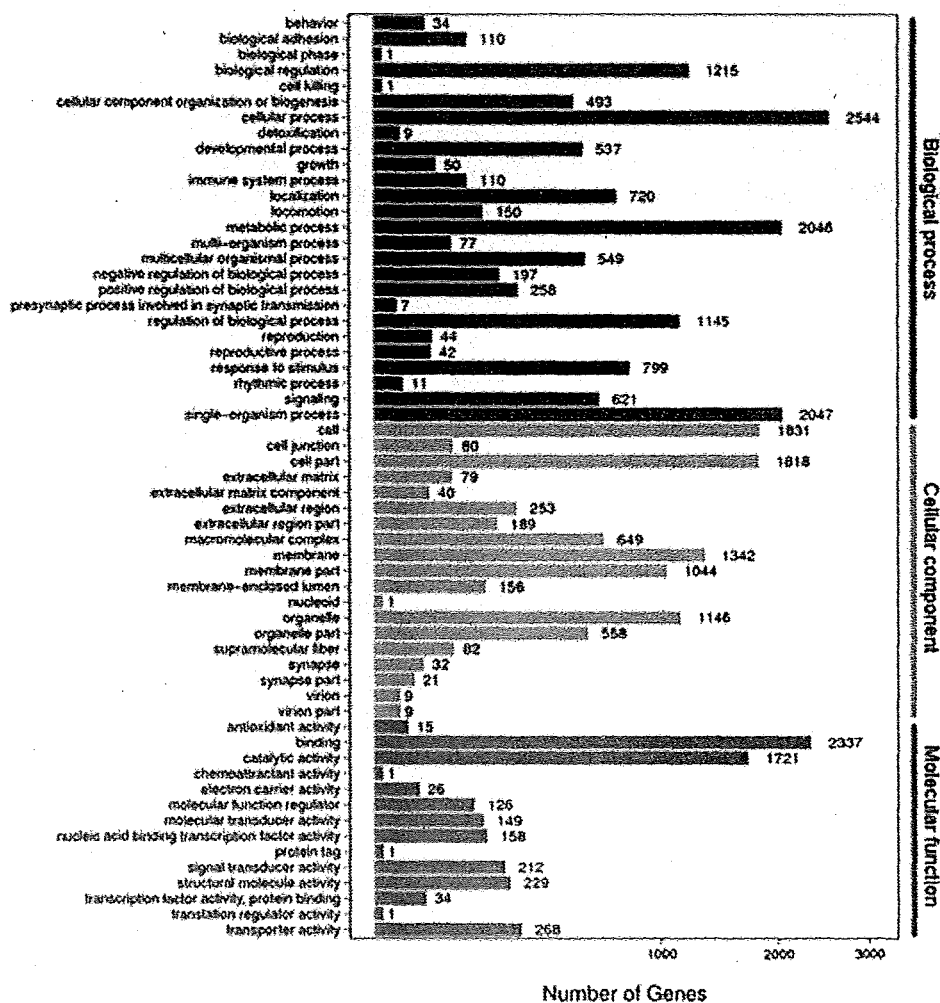


Fig. 3. GO functional classification of *B. splendens* transcriptome, GO annotation was obtained using Blast2GO software with NR annotation. A total of 4,506 unigenes were annotated and grouped into three major categories of GO terms: biological process (Deep blue), cellular component (Green), and molecular function (Red). The Y-axis represents the GO sub-category. Numbers represent the number of unigenes in each sub-category. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

and four major families of AMPs (hepcidins, piscidin, LEAP-2, and β -defensins) were identified.

Hepcidin is an important molecule in the innate immune system and iron regulation in several animals, including mammals, birds, reptiles, amphibians, and fishes [32,33]. The gene for the antimicrobial peptide hepcidin in fish encodes a preproprotein that is divided into three parts, including a signal peptide, a propeptide and a mature peptide (a cysteine-rich domain) [34–41]. Mature hepcidin exhibits broad-spectrum antimicrobial activities against viruses, bacteria, fungi, and parasites [30,42–51]. In this study, we found that betta fish hepcidin (*BsHEP*) encodes a prepropeptide containing a signal peptide, a prodomain, and a mature peptide with 8 conserved cysteine residues (Fig. 6). *BsHEP* shares high amino acid identity with other fish hepcidins (Table S4). The highly conserved hepcidins of betta fish and other fish species suggest that their biological roles (antimicrobial activity and iron-regulatory function) are also conserved in fish.

Piscidins exhibit broad-spectrum antimicrobial activity against bacteria fungi, parasites, and viruses [30,49,52–56]. The piscidin peptide consists of three major regions: a signal peptide, a mature peptide, and a C-terminal prodomain [57,58]. To date, piscidins have been identified in several species of fish [52,56,58–65]. In the present study, a piscidin (*BsPIS*) was detected in betta fish (Fig. 6). Analysis of the predicted piscidin of betta fish showed that *BsPIS* shares 54% and 49% identity with fish piscidins (Table S4). These re-

sults suggested that betta fish piscidin may play a role in the innate immune defense of fish.

LEAP-2 plays an important role in the innate immunity of fish. The LEAP-2 peptide is composed of a signal peptide, a pro-domain, and a mature peptide, with four conserved cysteine residues that form two disulfide bonds. To date, LEAP-2 has been identified in many fish species [66–71]. In this study, LEAP-2 of betta fish (*BsLEAP-2*) was highly conserved in the primary structure of the LEAP-2 family (Fig. 6), and the *BsLEAP-2* showed high sequence identity with LEAP-2 sequences from fish (Table S4).

Defensins, well-studied AMPs in animals, are cationic AMPs with six conserved cysteines [72] and have antimicrobial activity against many bacteria, fungi, and viruses. Based on the arrangement of cysteine residues, three main subfamilies of defensins (α -, β - and θ -defensins) have been classified in vertebrates [73,74]. However, only β -defensins have been reported in diverse species of fish [75–78]. In vertebrates, defensin genes are multigene families. In zebrafish, three types of β -defensin genes have been reported [75]. In the present study, we discovered two defensins (*BsBD1* and *BsBD2*) encoding defensin-like peptides similar to β -defensin1 and β -defensin2 from Atlantic salmon *Salmo salar*, respectively (Fig. 6; Table S4). Both *BsBD1* and *BsBD2* are predicted to possess all the expected features of β -defensin members, including the characteristic six cysteines forming three disulfide bridges (Fig. 6). Similar to other β -defensins, in which the peptide sequences are highly vari-

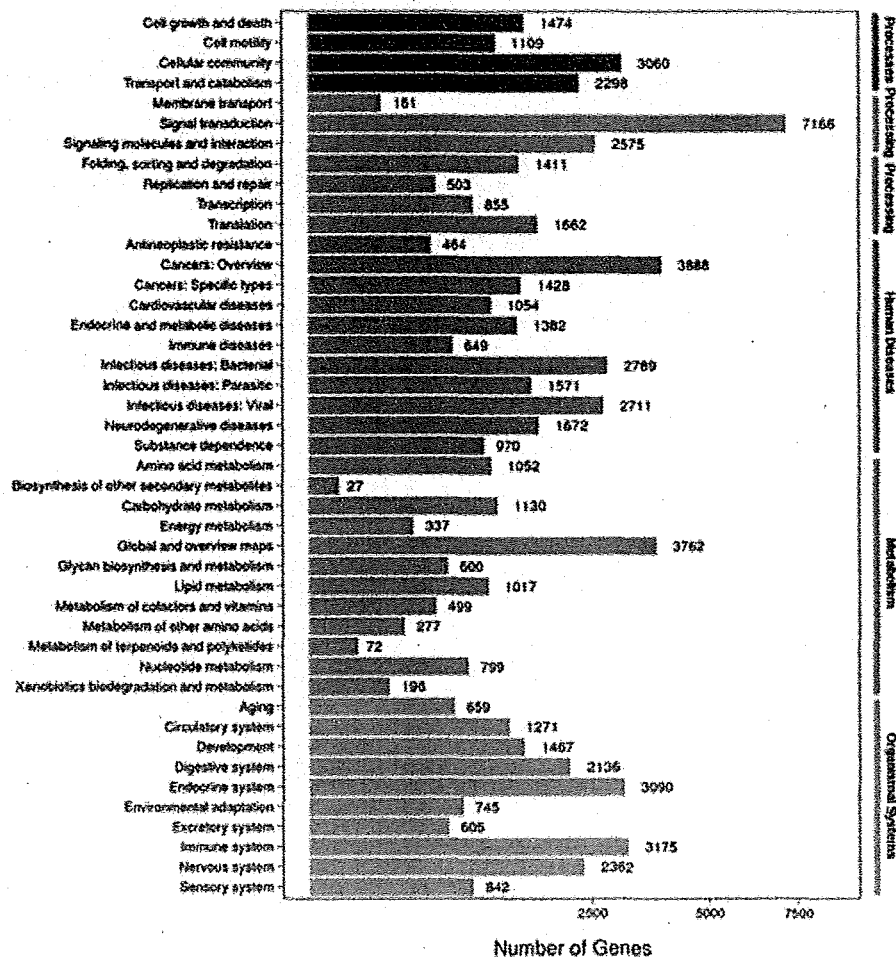


Fig. 4. KEGG functional classification of *B. splendens* transcriptome. All the unigenes were aligned to the KEGG database using the BLAST program. A total of 37,694 unigenes were annotated and clustered into six major KEGG metabolic categories: cellular processes (Deep blue), environmental information processing (Green), genetic information processing (Brown), human diseases (Purple), metabolism (Blue), and organismal systems (Orange). The X-axis represents the number of unigenes. The Y-axis represents the KEGG functional category. Numbers represent the number of unigenes in each category. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

able in each defensin family, we observed that *BsBD1* shares only 27% and 45% amino acid sequence identity and similarity with *BsBD2*.

Identification and characterization of fish AMPs has been one of the most effective and promising activities to discover new antimicrobials for aquaculture applications. Moreover, these novel AMP genes (hepcidin, piscidin, LEAP-2, and defensins) are regarded as important immune molecules in innate immunity and will serve as an important resource for future functional characterization attempts.

3.8. Identification of β -defensin AMPs in Siamese fighting fish: *Betta splendens*, *B. Mahachaiensis*, *B. Imbellis* and *B. Smaragdina*

To better understand the role of β -defensin in betta fish, it is necessary to further study the molecular characterization, gene expression profile and genomic organization of β -defensins in betta fish and related species. To characterize the β -defensin homologs in betta fish, RT-PCR analysis was employed using specific PCR primers for *BsBD1* and *BsBD2* designed based on transcriptomic data from *B. splendens*. The results indicated that mRNA of *BsBD1* and *BsBD2* contain open reading frames (ORFs) of 198 and 192 bp, encoding 65 and 63 amino acids (aa), respectively (Fig. S1). Both *BsBD1* and *BsBD2* peptides had identical amino acid coding sequences to their counterparts annotated from the betta fish transcriptome. Thus, we confirmed the existence of two defensin genes (*BsBD1* and *BsBD2*) in betta fish.

Additionally, we also successfully isolated cDNA sequences encoding 65 and 63 amino acids of BD1 and BD2, respectively, from three other closely related betta fish species, including *B. mahachaiensis*, *B. imbellis* and *B. smaragdina*, using RT-PCR analysis. The deduced amino acid sequences of BD1 and BD2 from *B. mahachaiensis* (*BmBD1* and *BmBD2*), *B. imbellis* (*BiBD1* and *BiBD2*) and *B. smaragdina* (*BsmBD1* and *BsmBD2*) were identical to those of *BsBD1* and *BsBD2*, respectively (Fig. 7; Table S4). The predicted cleavage sites of the signal peptides of betta fish BD1 and BD2 were found to be located between A24 and S25 for BD1 and G20 and N21 for BD2. The mature peptides of betta fish BD1 (37 aa) and BD2 (35 aa) have an estimated molecular weight of 3.94 and 4.19 kDa and a theoretical isoelectric point (pI) of 8.30 and 9.38, respectively.

To date, β -defensins have been identified in many fish species [75–87]. However, fish β -defensins can be divided into two subgroups, including the DB-1 group and another group (DB-2 and 3), based on an analysis of homology comparison and the phylogenetic tree [73,75]. In this study, BLASTP analysis showed that the amino acid sequence of betta fish BD1 and BD2 shared high sequence identity with several β -defensins in fish species. Betta fish BD1 and BD2 shared sequence identities with β -defensin1 (74%) from Atlantic salmon *Salmo salar* (BBE43043) and β -defensin2 (56%) from zebrafish *Danio rerio* (NP_001075023), respectively. Multiple alignment of betta fish β -defensin peptides with β -defensin1 and 2 peptides from several species of fish showed that betta fish β -defensins are relatively conserved during animal evolution (Fig. 7). In particular, the signature motif of the six-cysteine conser-

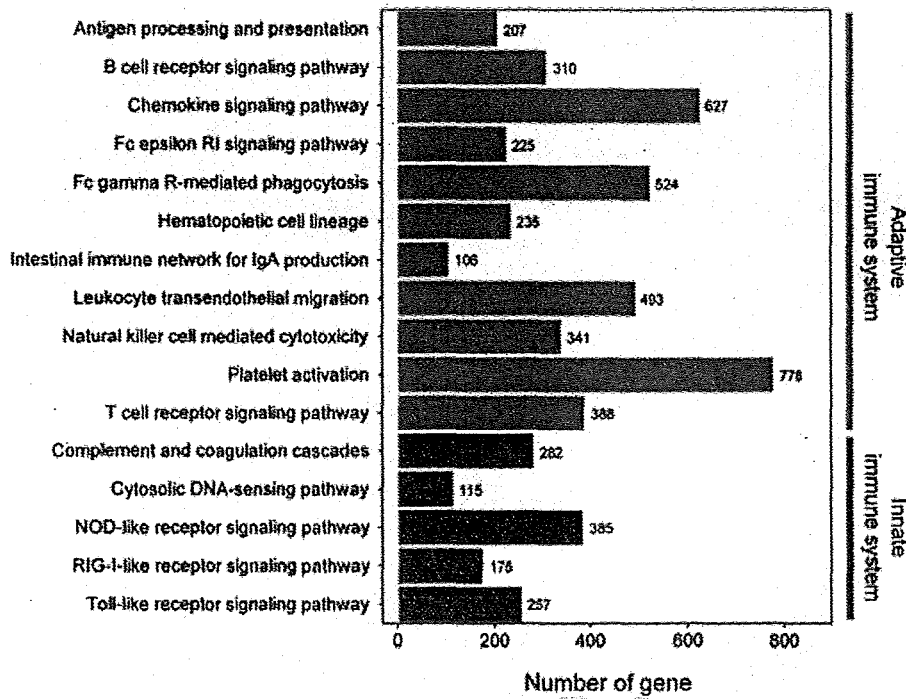


Fig. 5. Immune system pathways in the *B. splendens* transcriptome. A total of 3,175 annotated unigenes were grouped into the innate immune system (purple) and adaptive immune system (blue) according to KEGG analysis. The X-axis represents the number of unigenes. The Y-axis represents the KEGG immune pathway. Numbers represent the number of unigenes in each pathway. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

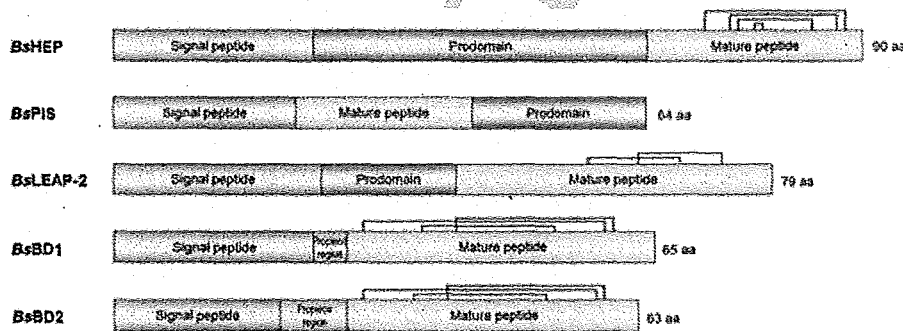


Fig. 6. Domain architecture of antimicrobial peptides (AMPs) discovered in beta fish *B. splendens*. HEP, Hecpudin; PIS, Piscidin; LEAP-2, Liver-expressed antimicrobial peptide 2; BD1, β -defensin1; BD2, β -defensin2. The putative signal peptide domains are indicated by red color. Prodomains are colored in blue. Propiece regions are colored in green. Mature peptides are colored in yellow. Connecting black lines indicate disulfide bridges. The number of amino acids in each beta fish AMP is indicated. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

sus sequence that allows the formation of six disulfide bridges, which play important roles in protein folding and AMP activity of β -defensins, is highly conserved.

Analysis of genomic organization using PCR analysis showed that beta fish BD1 and BD2 have the same genomic organization within the coding region: three exons and two introns, as shown in Fig. 8. The signal peptides of beta fish BD1 and BD2 are located in the first exon and the N-terminal part of the second exon, respectively. The propiece region is located in the second exon. The defensin-like domain is located in the second and the last exon. The intron has a consensus splice junction following the GT-AG rule. The first introns of beta fish BD1s (*BsBD1*, *BmBD1*, *BiBD1*, and *BsmBD1*) are 98, 83, 86 and 86 bp, respectively, and the second intron has 100 bp. For beta fish BD2s, the first intron has 157 nucleotides and the second intron has 92 nucleotides, except for the first intron of *BsmBD2* (156 bp). Like other fish, beta fish β -defensin genes have the same exon-intron genomic organization, with two introns and three exons within the coding region. A phase 1 intron is located in the coding region of the signal peptide, while a phase 2 intron is located in the coding region of the mature peptide [75]. This report on β -defensin from beta fish re-

veals significant conservation of the genomic organization and protein structure in fish species.

3.9. Expression profiles of *BsBD1* and *BsBD2* in beta fish

To investigate the tissue distribution of β -defensins, expression profiles of *BsBD1* and *BsBD2* were analyzed by semiquantitative RT-PCR. The result showed that the *BsBD1* transcript was detected in the muscle, kidney, liver, gill, and gut. The highest mRNA levels of *BsBD1* were detected in the muscle and kidney, respectively, which were higher than those in the liver, gill, and gut. *BsBD2* was high in the gill, but poorly distributed in kidney and muscle (Fig. 9). Additionally, mRNA levels of *BsBD1* and *BsBD2* were also detected in the whole-body fish tissue from one-month-old beta fish. Previous studies in healthy zebrafish also showed that *zfdB-1* and *zfdB-3* are expressed in a wide range of tissues (gill, gonad, gut, kidney, liver, muscle, skin, and spleen), while *zfdB-2* is weakly expressed only in the gut [75]. The high expression in different tissues of two β -defensins (*BsBD1* and *BsBD2*) might indicate different/diverse activities of these AMPs in the innate immune system of beta fish.

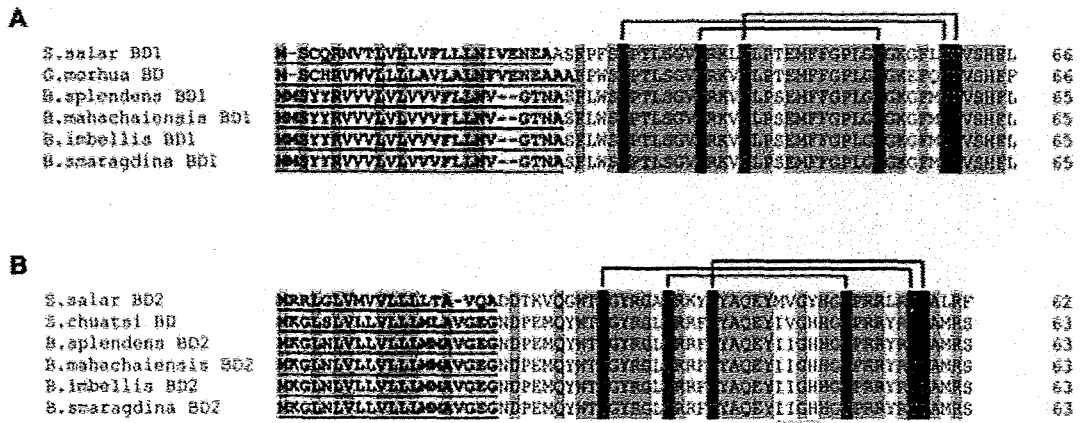


Fig. 7. Amino acid sequence alignments showing the homology of (A) β -defensin1 (BD1) and (B) β -defensin2 (BD2) in four betta fish species in Thailand and other fish species. Betta fish: *Betta splendens*, *B. mahachaiensis*, *B. imbellis* and *B. smaragdina*; Atlantic salmon: *Salmo salar*; Atlantic cod: *Gadus morhua*; mandarin fish: *Siniperca chuatsi*. The signal peptide is underlined. Identical residues are shaded in grey. The evolutionarily conserved cysteine residues forming intramolecular disulfide bridges are highlighted in black. Connecting black lines indicate disulfide bridges.

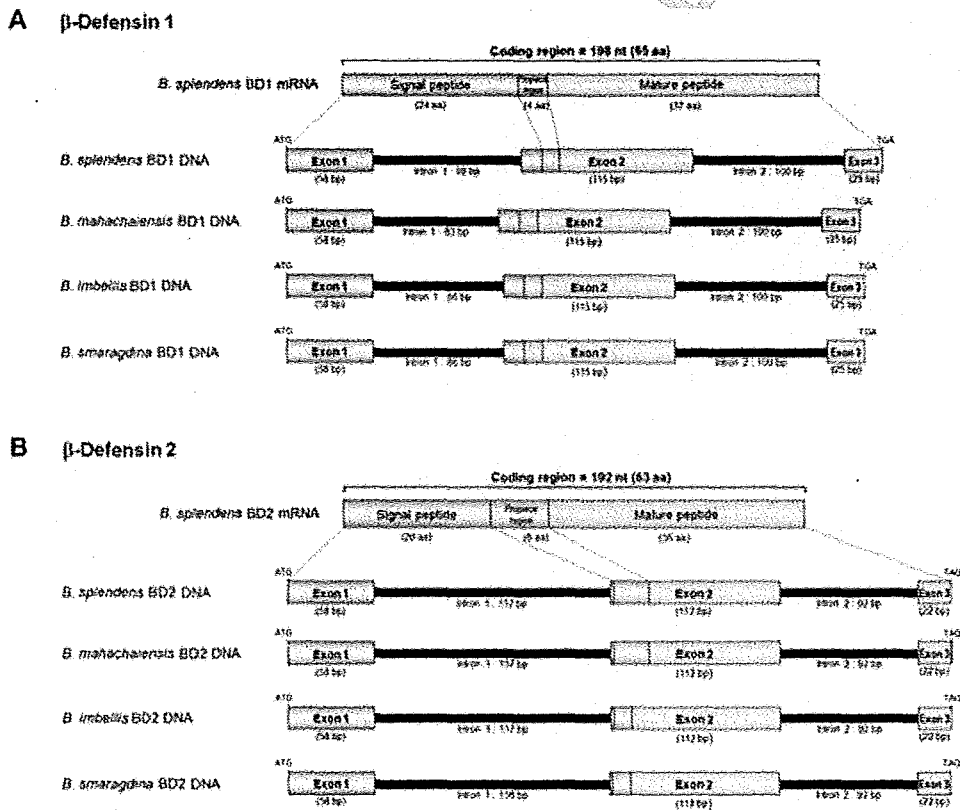


Fig. 8. Genomic organization of (A) β -defensin1 (BD1) and (B) β -defensin2 (BD2) genes in four betta fish species in Thailand. The complete ORF of β -defensin genes containing three exons and flanking introns is shown. Red color indicates the putative signal peptide. Green color indicates the propeptide region. Yellow color indicates the mature peptide. Noncoding regions (introns) are indicated by black lines. The size of exons and introns are shown in base pairs. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

4. Conclusion

This is the first study to examine the basal transcriptome from the whole body of Siamese fighting fish *B. splendens* using the Illumina technology platform. We obtained a *de novo* transcriptome of betta fish consisting of 71,775 unigenes with an average length of 1,107 bp and an N50 of 2,225 bp. Through functional annotation of the assembled unigenes, many important genes related to innate immune pathways, including the NOD-like receptor signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, RIG-I-like receptor signaling pathway, cytosolic DNA-sensing pathway, and coagulation and complement cas-

cade, were identified. Additionally, this study is the first to analyze four families of AMPs (hepcidins, piscidins, LEAP-2, and defensins) in betta fish. Nevertheless, further studies using additional molecular approaches are necessary to verify the functions of these AMPs in betta fish. Moreover, two defensin genes (BD1 and BD2) were further identified in four other species of betta fish from Thailand. The cDNA and genomic organization of both defensins were highly conserved. The transcriptomic data produced by this study will provide a solid basis for further investigation of the molecular mechanism of the innate immune system in betta fish and extend to the development of disease prevention for ornamental fish aquaculture.

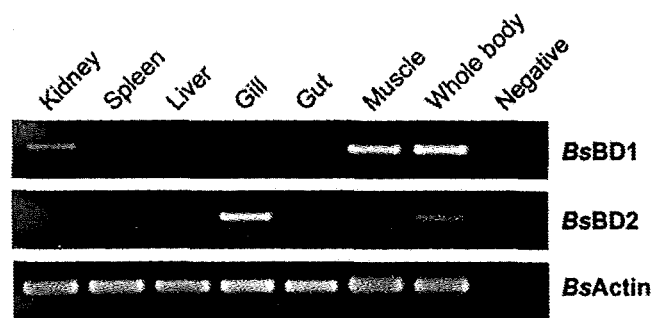


Fig. 9. Tissue-specific expression of β -defensin1 (BD1) and β -defensin2 (BD2) in betta fish *B. splendens*. Expression of BsBD1 and BsBD2 from the kidney, spleen, liver, gill, gut, and muscle and whole body of betta fish were determined by RT-PCR using the primer pair specific for each gene. β -actin was used as an internal control. Data shown is representative of three independent trials.

CRediT authorship contribution statement

Piti Amparyup: Formal analysis, Writing - original draft. **Walaiporn Charoensapsri**: Formal analysis, Writing - original draft. **Nusree Samaluka**: Formal analysis, Writing - original draft. **Parichat Chumtong**: Formal analysis, Writing - original draft. **Patchari Yocawibun**: Formal analysis, Writing - original draft. **Chanprapa Imjongjirak**: Formal analysis, Writing - original draft.

Acknowledgments

This Research was funded by Chulalongkorn University (CU-GR_61_010_23_003) awarded to Chanprapa Imjongjirak.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.02.030>.

References

- P.M.C. Faria, D.V. Crepaldi, E.A. Teixeira, L.P. Ribeiro, A.B. Souza, D.C. Carvalho, D.C. Melo, E.O.S. Saliba, Breeding, handling and reproduction of the *Betta splendens* -Regan 1910, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 30 (2006) 134–149.
- A. Monvises, B. Nuangsaeng, N. Sriwattanarothai, B. Panijpan, The Siamese fighting fish: well-known generally but little-known scientifically, *Sci. Asia* 35 (2009) 8–16.
- S. Gómez, Prevalence of microscopic tubercular lesions in freshwater ornamental fish exhibiting clinical signs of non-specific chronic disease, *Dis. Aquat. Org.* 80 (2) (2008) 167–171.
- R.G. Zanoni, D. Florio, M.L. Fioravanti, M. Rossi, M. Prearo, Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy, *J. Fish. Dis.* 31 (6) (2008) 433–441.
- L. Novotny, R. Halouzka, L. Matlova, O. Vavra, L. Bartosova, M. Slany, I. Pavlik, Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria, *J. Fish. Dis.* 33 (12) (2010) 947–955.
- Ş. Kayış, F. Balta, R. Serezli, A. Er, Parasites on different ornamental fish species in Turkey, *J. FisheriesSciences.com.* 7 (2) (2013) 114–120.
- H.T. Dong, S. Senapin, K. Phiwisaiya, C. Techatanakitarnan, K. Dokladda, P. Ruengwongsa, B. Panijpan, Histopathology and culturable bacteria associated with “big belly” and “skin nodule” syndromes in ornamental Siamese fighting fish, *Betta splendens*, *Microb. Pathog.* 122 (2018) 46–52.
- R.E. Hancock, H.G. Sahl, Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies, *Nat. Biotechnol.* 24 (12) (2006) 1551–1557.
- X. Qian, Y. Ba, Q. Zhuang, G. Zhong, RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics, *OMICS* 18 (2) (2014) 98–110.
- A. Sudhagar, G. Kumar, M. El-Matbouli, Transcriptome analysis based on RNA-Seq in understanding pathogenic mechanisms of diseases and the immune system of fish: a Comprehensive Review, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (1) (2018) 245.
- G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, *Nucleic Acids Res.* 37 (suppl.1) (2009) D933–D937.
- S. Muncaster, K. Kraakman, O. Gibbons, K. Mensink, M. Forlenza, G. Jacobson, S. Bird, Antimicrobial peptides within the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*), *Dev. Comp. Immunol.* 80 (2018) 67–80.
- Y. Yi, X. You, C. Bian, S. Chen, Z. Lv, L. Qiu, Q. Shi, High-throughput identification of antimicrobial peptides from amphibious mudskippers, *Mar. Drugs* 15 (11) (2017) 364.
- J. Zhu, H. Wang, J. Wang, X. Wang, S. Peng, Y. Geng, K. Wang, P. Ouyang, Z. Li, X. Huang, D. Chen, Identification and characterization of a β -defensin gene involved in the immune defense response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, *Mol. Immunol.* 85 (2017) 256–264.
- M.G. Grabherr, B.J. Haas, M. Yassour, J.Z. Levin, D.A. Thompson, I. Amit, X. Adiconis, L. Fan, R. Raychowdhury, Q. Zeng, Z. Chen, E. Muceli, N. Hacohen, A. Gnirke, N. Rhind, F. di Palma, B.W. Birren, C. Nusbaum, K. Lindblad-Toh, N. Friedman, A. Regev, Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome, *Nat. Biotechnol.* 29 (7) (2011) 644–652.
- B.A. Fraser, C.J. Weadick, I. Janowitz, F.H. Rodd, K.A. Hughes, Sequencing and characterization of the guppy (*Poecilia reticulata*) transcriptome, *BMC Genom.* 12 (2011) 202.
- X.Y. Shen, H.Y. Kwan, N.M. Thevasagayam, S.R. Prakki, I.S. Kuznetsova, S.Y. Ngho, Z. Lim, F. Feng, A. Chang, L. Orbán, The first transcriptome and genetic linkage map for Asian arowana, *Mol. Ecol. Resour.* 14 (3) (2014) 622–635.
- Y. Zhang, J. Liu, L. Peng, L. Ren, H. Zhang, L. Zou, W. Liu, Y. Xiao, Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.), *Fish Physiol. Biochem.* 43 (5) (2017) 1387–1398.
- G. Fan, J. Chan, K. Ma, B. Yang, H. Zhang, X. Yang, C. Shi, H. Chun-Hin Law, Z. Ren, Q. Xu, Q. Liu, J. Wang, W. Chen, L. Shao, D. Gonçalves, A. Ramos, S.D. Cardoso, M. Guo, J. Cai, X. Xu, J. Wang, H. Yang, X. Liu, Y. Wang, Chromosome-level reference genome of the Siamese fighting fish *Betta splendens*, a model species for the study of aggression, *GigaScience* 7 (11) (2018) gty087.
- W. Yang, Y. Wang, C. Zhu, G. Li, H. Huang, H. Chen, *De novo* transcriptomic characterization of *Betta splendens* for identifying sex-biased genes potentially involved in aggressive behavior modulation and EST-SSR marker development, *bioRxiv* (2018), doi:10.1101/355354.355354.
- T. Kawai, S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat. Immunol.* 11 (5) (2010) 373–384.
- D. Pietretti, G.F. Wiegertjes, Ligand specificities of Toll-like receptors in fish: indications from infection studies, *Dev. Comp. Immunol.* 43 (2) (2014) 205–222.
- C. Wu, D. Zhang, M. Kan, Z. Lv, A. Zhu, Y. Su, D. Zhou, J. Zhang, Z. Zhang, M. Xu, L. Jiañg, B. Guo, T. Wang, C. Chi, Y. Mao, J. Zhou, X. Yu, H. Wang, X. Weng, J.G. Jin, J. Ye, L. He, Y. Liu, The draft genome of the large yellow croaker reveals well-developed innate immunity, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5227.
- J. Zhang, X. Kong, C. Zhou, L. Li, G. Nie, X. Li, Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways, *Fish Shellfish Immunol.* 41 (2) (2014) 380–388.
- R.M. Eppard, H.J. Vogel, Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action, *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1–2) (1999) 11–28.
- A. Tossi, L. Sandri, Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides, *Curr. Pharmaceut. Des.* 8 (9) (2002) 743–761.
- M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389–395.
- A. Tassanakajon, P. Amparyup, K. Sombonwiwat, P. Supungul, Cationic antimicrobial peptides in penaeid shrimp, *Mar. Biotechnol.* 12 (5) (2010) 487–505.
- V.J. Smith, E.A. Dyrnyda, Antimicrobial proteins: from old proteins, new tricks, *Mol. Immunol.* 68 (2 Pt B) (2015) 383–398.
- B.A. Katzenback, Antimicrobial peptides as mediators of innate immunity in teleosts, *Biology* 4 (4) (2015) 607–639.
- U. Shabir, S. Ali, A.R. Magray, B.A. Ganai, P. Firdous, T. Hassan, R. Nazir, Fish antimicrobial peptides (AMP's) as essential and promising molecular therapeutic agents: a review, *Microb. Pathog.* 114 (2018) 50–56.
- H. Drakesmith, A.M. Prentice, Hepsidin and the iron-infection axis, *Science* 338 (6108) (2012) 768–772.
- M. Boumaiza, S. Abidi, Hepsidin cDNA evolution in vertebrates, *Vitam. Hormoon* 110 (2019) 1–16.
- H. Shike, X. Lauth, M.E. Westerman, V.E. Ostland, J.M. Carlberg, J.C. Van Olst, C. Shimizu, P. Bulet, J.C. Burns, Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge, *Eur. J. Biochem.* 269 (8) (2002) 2232–2237.
- S.E. Douglas, J.W. Gallant, R.S. Liebscher, A. Dacanay, S.C. Tsoi, Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish, *Dev. Comp. Immunol.* 27 (6–7) (2003) 589–601.
- S.L. Chen, M.Y. Xu, X.S. Ji, G.C. Yu, Y. Liu, Cloning, characterization, and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream (*Chrysophrys major*), *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (4) (2005) 1608–1612.
- P.N. Rodrigues, S. Vázquez-Dorado, J.V. Neves, J.M. Wilson, Dual function of fish hepcidin: response to experimental iron overload and bacterial infection in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Dev. Comp. Immunol.* 30 (12) (2006) 1156–1167.
- S.L. Chen, W. Li, L. Meng, Z.X. Sha, Z.J. Wang, G.C. Ren, Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (*Scophthalmus maximus*), *Fish Shellfish Immunol.* 22 (3) (2007) 172–181.
- M. Yang, K.J. Wang, J.H. Chen, H.D. Qu, S.J. Li, Genomic organization and tissue-specific expression analysis of hepcidin-like genes from black porgy (*Acanthopagrus schlegelii* B), *Fish Shellfish Immunol.* 23 (5) (2007) 1060–1071.
- T. Xu, Y. Sun, G. Shi, R. Wang, Miiyu croaker hepcidin gene and comparative analyses reveal evidence for positive selection, *PLoS One* 7 (4) (2012) e35449.
- H. Li, F. Zhang, H. Guo, Y. Zhu, J. Yuan, G. Yang, L. An, Molecular characterization of hepcidin gene in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and its expression pattern responding to bacterial challenge, *Fish Shellfish Immunol.* 35 (3) (2013) 1030–1038.
- J.V. Neves, C. Caldas, I. Vieira, M.F. Ramos, P.N. Rodrigues, Multiple hepcidins in a teleost fish, *Dicentrarchus labrax*: different hepcidins for different roles, *J. Immunol.* 195 (6) (2015) 2696–2709.
- I. Hirono, J.Y. Hwang, Y. Ono, T. Kurobe, T. Ohira, R. Nozaki, T. Aoki, Two different types of hepcidins from the Japanese flounder *Paralichthys olivacea*, *FEBS J.* 272 (20) (2005) 5257–5264.
- X. Lauth, J.J. Babon, J.A. Stannard, S. Singh, V. Nizet, J.M. Carlberg, V.E. Ostland, M.W. Pennington, R.S. Norton, M.E. Westerman, Bass hepcidin synthesis, solution structure, antimicrobial activities and synergism, and *in vivo* hepatic response to bacterial infections, *J. Biol. Chem.* 280 (10) (2005) 9272–9282.
- K.J. Wang, J.J. Cai, L. Cai, H.D. Qu, M. Yang, M. Zhang, Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide, *Biomed Res Int* (2009) 626–646.

- pression pattern responded to bacterial challenge and *in vitro* antimicrobial activity, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 158 (2) (2011) 155–163.
- [47] H. Qu, B. Chen, H. Peng, K. Wang, Molecular cloning, recombinant expression, and antimicrobial activity of EC-hepcidin3, a new four-cysteine hepcidin isoform from *Epinephelus coioides*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77 (1) (2013) 103–110.
- [48] W. Lin, S. Liu, L. Hu, S. Zhang, Characterization and bioactivity of hepcidin-2 in zebrafish: dependence of antibacterial activity upon disulfide bridges, *Peptides* 57 (2014) 26–42.
- [49] J.A. Masso-Silva, G. Diamond, Antimicrobial peptides from fish, *Pharmaceuticals* 7 (3) (2014) 265–310.
- [50] Y. Tao, D.M. Zhao, Y. Wen, Expression, purification and antibacterial activity of the channel catfish hepcidin mature peptide, *Protein Expr. Purif* 94 (2014) 73–78.
- [51] J. Zhang, L.P. Yu, M.F. Li, L. Sun, Turbot (*Scophthalmus maximus*) hepcidin-1 and hepcidin-2 possess antimicrobial activity and promote resistance against bacterial and viral infection, *Fish Shellfish Immunol.* 38 (1) (2014) 127–134.
- [52] U. Silphaduang, E.J. Noga, Peptide antibiotics in mast cells of fish, *Nature* 414 (2001) 268–269.
- [53] V.G. Chinchar, L. Bryan, U. Silphaduang, E. Noga, D. Wade, L. Rollins-Smith, Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial peptides, *Virology* 323 (2) (2004) 268–275.
- [54] A. Colomi, A. Ullal, G. Heinisch, E.J. Noga, Activity of the antimicrobial polypeptide piscidin 2 against fish ectoparasites, *J. Fish. Dis.* 31 (6) (2008) 423–432.
- [55] W.S. Sung, J. Lee, D.G. Lee, Fungicidal effect and the mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 371 (3) (2008) 551–555.
- [56] N. Umasuthan, M.S. Mothshiri, W.S. Thulasitha, B.H. Nam, J. Lee, Molecular, genomic, and expressional delineation of a piscidin from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) with evidence for the potent antimicrobial activities of Of-Pis1 peptide, *Fish Shellfish Immunol.* 48 (2016) 154–168.
- [57] X. Lauth, H. Shike, J.C. Burns, M.E. Westerman, V.E. Ostland, J.M. Carlberg, J.C. Van Olst, V. Nizet, S.W. Taylor, C. Shimizu, P. Bulet, Discovery and characterization of two isoforms of moronecidin, a novel antimicrobial peptide from hybrid striped bass, *J. Biol. Chem.* 277 (7) (2002) 5030–5039.
- [58] B.J. Sun, H.X. Xie, Y. Song, P. Nie, Gene structure of an antimicrobial peptide from Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Basilewsky), suggests that moronecidins and pleurocidins belong in one family: the piscidins, *J. Fish. Dis.* 30 (6) (2007) 335–343.
- [59] E.J. Noga, U. Silphaduang, N.G. Park, J.K. Seo, J. Stephenson, S. Kozlowski, Piscidin 4, a novel member of the piscidin family of antimicrobial peptides, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 152 (4) (2009) 299–305.
- [60] J.M. Fernandes, J. Ruangsri, V. Kiron, Atlantic cod piscidin and its diversification through positive selection, *PLoS One* 5 (3) (2010) e9501.
- [61] S.A. Salger, K.R. Cassady, B.J. Reading, E.J. Noga, A diverse family of host-defense peptides (Piscidins) exhibit specialized anti-bacterial and anti-protozoal activities in fishes, *PLoS One* 11 (8) (2016) e0159423.
- [62] K.C. Peng, S.H. Lee, A.L. Hour, C.Y. Pan, L.H. Lee, J.Y. Chen, Five different piscidins from Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: analysis of their expressions and biological functions, *PLoS One* 7 (11) (2012) e50263.
- [63] J. Ruangsri, S.A. Salger, C.M. Caipang, V. Kiron, J.M. Fernandes, Differential expression and biological activity of two piscidin paralogues and a novel splice variant in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 32 (3) (2012) 396–406.
- [64] W.C. Lin, H.Y. Chang, J.Y. Chen, Electrotransfer of the tilapia piscidin 3 and tilapia piscidin 4 genes into skeletal muscle enhances the antibacterial and immunomodulatory functions of *Oreochromis niloticus*, *Fish Shellfish Immunol.* 50 (2016) 200–209.
- [65] S.A. Salger, B.J. Reading, D.A. Baltzegar, C.V. Sullivan, E.J. Noga, Molecular characterization of two isoforms of piscidin 4 from the hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*), *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1) (2011) 420–424.
- [66] Y.A. Zhang, J. Zou, C.I. Chang, C.J. Secombes, Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 101 (3–4) (2004) 259–269.
- [67] B. Bao, E. Peatman, P. Xu, P. Li, H. Zeng, C. He, Z. Liu, The catfish liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene is expressed in a wide range of tissues and developmentally regulated, *Mol. Immunol.* 43 (4) (2006) 367–377.
- [68] H.X. Li, X.J. Lu, C.H. Li, J. Chen, Molecular characterization and functional analysis of two distinct liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), *Fish Shellfish Immunol.* 38 (2) (2014) 330–339.
- [69] T. Liu, Y. Gao, R. Wang, T. Xu, Characterization, evolution and functional analysis of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) gene in miiuy croaker, *Fish Shellfish Immunol.* 41 (2) (2014) 191–199.
- [70] G. Yang, H. Guo, H. Li, S. Shan, X. Zhang, J.H. Rombout, L. An, Molecular characterization of LEAP-2 cDNA in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and the differential expression upon a *Vibrio anguillarum* stimulus; indications for a significant immune role in skin, *Fish Shellfish Immunol.* 37 (1) (2014) 22–29.
- [71] H.X. Li, X.J. Lu, C.H. Li, J. Chen, Molecular characterization of the liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) in a teleost fish, *Plecoglossus altivelis*: antimicrobial activity and molecular mechanism, *Mol. Immunol.* 65 (2) (2015) 406–415.
- [72] T. Ganz, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (9) (2003) 710–720.
- [73] D. Yang, A. Biragyn, D.M. Hoover, J. Lubkowski, J.J. Oppenheim, Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense, *Annu. Rev. Immunol.* 22 (2004) 181–215.
- [74] M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nat. Immunol.* 6 (6) (2005) 551–557.
- [75] J. Zou, C. Mercier, A. Koussounadis, C. Secombes, Discovery of multiple beta-defensin like homologues in teleost fish, *Mol. Immunol.* 44 (4) (2007) 638–647.
- [76] A. Falco, V. Chicó, L. Marroquí, L. Perez, J.M. Coll, A. Estepa, Expression and antiviral activity of a β -defensin-like peptide identified in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) EST sequences, *Mol. Immunol.* 45 (3) (2008) 757–765.
- [77] E. Casadei, T. Wang, J. Zou, J.L. González Vecino, S. Wadsworth, C.J. Secombes, Characterization of three novel β -defensin antimicrobial peptides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Mol. Immunol.* 46 (2009) 3358–3366.
- [78] J.G. Zhao, L. Zhou, J.Y. Jin, Z. Zhao, J. Lan, Y.B. Zhang, Q.Y. Zhang, J.F. Gui, Antimicrobial activity-specific to Gram-negative bacteria and immune modulation-mediated NF- κ B and Sp1 of a medaka β -defensin, *Dev. Comp. Immunol.* 33 (4) (2009) 624–637.
- [79] B.H. Nam, J.Y. Moon, Y.O. Kim, H.J. Kong, W.J. Kim, S.J. Lee, K.K. Kim, Multiple β -defensin isoforms identified in early developmental stages of the teleost *Paralichthys olivacea*, *Fish Shellfish Immunol.* 28 (2) (2010) 267–274.
- [80] M. Marei, M. Adamek, S.F. Gonzalez, P. Frost, J.H. Rombout, G.F. Wiegertjes, H.F. Savelkoul, D. Steinhagen, Molecular cloning and expression of two β -defensin and two mucin genes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and their up-regulation after β -glucan feeding, *Fish Shellfish Immunol.* 32 (3) (2012) 494–501.
- [81] H. Li, H. Guo, S. Shan, C. Qi, L. An, G. Yang, Characterization and expression pattern of a novel β -defensin in common carp (*Cyprinus carpio* L.): implications for its role in mucosal immunity, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (3) (2014) 430–437.
- [82] T. Liang, D.D. Wang, G.R. Zhang, K.J. Wei, W.M. Wang, G.W. Zou, Molecular cloning and expression analysis of two β -defensin genes in the blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 166 (1) (2013) 91–98.
- [83] A. Cuesta, J. Meseguer, M. Esteban, Molecular and functional characterization of the gilthead seabream β -defensin demonstrate its chemotactic and antimicrobial activity, *Mol. Immunol.* 48 (12–13) (2011) 1432–1438.
- [84] J.Y. Jin, L. Zhou, Y. Wang, Z. Li, J.G. Zhao, Q.Y. Zhang, J.F. Gui, Antibacterial and antiviral roles of a fish β -defensin expressed both in pituitary and testis, *PLoS One* 5 (12) (2010) e12883.
- [85] J. Ruangsri, Y. Kitani, V. Kiron, J. Lokesh, M.F. Brinchmann, B.O. Karlson, J.M. Fernandes, A novel beta-defensin antimicrobial peptide in Atlantic cod with stimulatory effect on phagocytic activity, *PLoS One* 8 (4) (2013) e62302.
- [86] J.J. Dong, F. Wu, X. Ye, C.F. Sun, Y.Y. Tian, M.X. Lu, R. Zhang, Z.H. Chen, β -defensin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): sequence, tissue expression, and anti-bacterial activity of synthetic peptides, *Gene* 566 (1) (2015) 23–31.
- [87] Y. Chen, H. Zhao, X. Zhang, H. Luo, X. Xue, Z. Li, B. Yao, Identification, expression and bioactivity of *Paramisgurnus dabryanus* β -defensin that might be involved in immune defense against bacterial infection, *Fish Shellfish Immunol.* 35 (2) (2013) 399–406.

KU

KASETSART
UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอรับรองว่าผลงานวิจัย

เรื่อง

ทรานสคริปโตมและการวิเคราะห์ยีนมิกโซไวรัส์ซิสแทนซ์ในปลากัดไทย *Betta splendens*

โดย

วลัยพร เจริญทรัพย์ศรี พัชรี โยควิบูล ปาริชาติ ชุมทอง จันทรประภา อิ่มจงใจรัก และปิติ อ่ำพ่ายพ

ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

สาขาวิทยาศาสตร์

นำเสนอภาคโปสเตอร์ ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 58

ระหว่างวันที่ 5-7 กุมภาพันธ์ 2563



(รองศาสตราจารย์ ดร.ศรปราชญ์ ชโนศวรยางกูร)

รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิจัย

ทรานสคริปโตมและการวิเคราะห์ยีนมิกโซไวรัสรีซิสแทนซ์ในปลากัดไทย *Betta splendens*
Transcriptome Analysis and Characterization of the Antiviral Myxovirus-Resistance (Mx) Gene
of Siamese Fighting Fish *Betta splendens*

วัลัยพร เจริญทรัพย์ศรี^{1,2} พัชร โยควิบูล^{1,2} ปาริชาติ ชุมทอง^{1,2} จันทร์ประภา อิมจงใจรัก³ และ ปิติ อัมพARYUP^{1,2*}
Walaiporn Charoensapsri^{1,2}, Patchari Yocawibun^{1,2}, Parichat Chumtong^{1,2}, Chanprapa Imjongjirak³,
and Piti Amparyup^{1,2*}

บทคัดย่อ

ปลากัดไทย เป็นปลาสวยงามที่ได้รับความนิยมจากตลาดทั่วโลก งานวิจัยนี้มุ่งเน้นศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *Betta splendens* จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Illumina พบว่าได้ทรานสคริปโตมขนาด 4.46 Gb ประกอบด้วย 71,775 unigenes จากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดอื่นพบยีนต้านไวรัส BsMxA ซึ่งมีความคล้ายกับโปรตีน Mx ที่มีรายงานในปลา *Anabas testudineus* มากที่สุด งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดทั้งตัวและยีน BsMxA เป็นครั้งแรกในปลากัดไทย ข้อมูลที่ได้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยปลากัดไทยในอนาคต

ABSTRACT

Siamese fighting fish is one of the popular ornamental fish in the global trade. This study aimed to generate a *de novo* transcriptome for healthy betta fish (*Betta splendens*). Illumina sequencing produced a total of 4.46 Gb clean reads, which were assembled into 71,775 unigenes. Transcriptome was further analyzed based on similarity searches with the known immune-related genes from several fish, and the antiviral BsMxA gene was identified. BsMxA exhibited highest sequence similarity to Mx protein of fish *Anabas testudineus*. This study provides the whole body transcriptome and data of BsMxA gene for the first time in betta fish, which was essential for further research of betta fish in the near future.

Key Words: Siamese fighting fish, Transcriptome, Immunity, Mx protein

*Corresponding author; e-mail address: piti.amp@biotec.or.th

¹ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

¹ National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani 12120

² ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

² Center of Excellence for Marine Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

³ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330

³ Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

คำนำ

ปลากัดไทย (Siamese fighting fish) เป็นสัตว์น้ำสวยงามที่มีเอกลักษณ์โดดเด่น และเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมากในตลาดต่างชาติ มีปริมาณการส่งออกต่อปีมากกว่า 20 ล้านตัว ด้วยมูลค่าการส่งออกในแต่ละปีสูงกว่าร้อยล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี สร้างงานและสร้างรายได้มหาศาลเข้าสู่ประเทศ โดยปลากัดไทย เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองสกุล *Betta* พบได้ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้พบประมาณ 55 ชนิด (Schindler and Schmidt, 2006) สำหรับประเทศไทยพบ 10 ชนิด (Monvises et al., 2009) โดยชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงเพื่อส่งออกเป็นปลากัดสวยงาม คือ *Betta splendens* Regan, 1910 (กาตูน, 2554) จุดเด่นของปลากัดไทย คือ ลักษณะของครีบลำตัวและครีบหางที่มีความหลากหลาย และสีสันทึบสวยงามสะดุดตา โดยปัจจัยสำคัญที่ช่วยเสริมจุดเด่นของปลากัดคืออาหารที่ใช้เลี้ยง แต่ด้วยข้อจำกัดค่าใช้จ่ายของอาหารปลาที่มีราคาสูง ทำให้เกษตรกรมักเลือกใช้อาหารมีชีวิตที่หาได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วไป เช่น ไรแดง ไล้เตียนน้ำ และลูกน้ำ ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อก่อโรค นำไปสู่ปัญหาโรคติดเชื้อในปลากัดและส่งผลทำให้ปลาทายเป็นจำนวนมาก ถึงแม้ความต้องการปลากัดสวยงามในตลาดโลกยังมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามข้อมูลความรู้พื้นฐานทางด้านอนุชีววิทยาของปลากัดซึ่งมีความสำคัญต่อการปรับปรุงและเพิ่มความต้านทานโรคในปลากัดสวยงามยังมีอย่างจำกัด

ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) ซึ่งมีการควบคุมผ่านวิถีการส่งสัญญาณของอินเตอร์เฟอรอนมีบทบาทสำคัญในการต้านเชื้อไวรัสในปลาและสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (Sadler and Williams, 2008; Zhang and Gui, 2012) มิกโซไวรัสรีซิสแทนซ์ (Myxovirus resistance; Mx) เป็นโมเลกุลต้านไวรัสที่ถูกกระตุ้นผ่านวิถีการส่งสัญญาณของอินเตอร์เฟอรอนและมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการจำลอง DNA (Replication) ของไวรัส (Haller and Kochs, 2002) โปรตีน Mx มีฤทธิ์ยับยั้งไวรัสได้ในช่วงกว้าง ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าโปรตีน MxA (MX1) มีฤทธิ์ยับยั้ง Influenza A virus และ Thogoto virus โปรตีน MxB (MX2) มีฤทธิ์ยับยั้ง HIV-1 Vesicular stomatitis virus และ Hantaan virus (Haller et al., 2015) สำหรับในปลาพบว่าโปรตีน Mx สามารถยับยั้งไวรัสได้หลายชนิด เช่น โปรตีน ASMx1 ของปลาแซลมอนแอตแลนติก *Salmo salar* มีฤทธิ์ยับยั้ง Infectious pancreatic necrosis virus และ Infectious salmon anaemia virus (Jensen and Robertsen, 2002; Kibenge et al., 2005) โปรตีน JFMx ของปลาลิ้นหมา *Paralichthys olivaceus* มีฤทธิ์ยับยั้ง Hiram rhabdovirus และ Viral hemorrhagic septicemia virus (Caipang et al., 2003) อย่างไรก็ตาม องค์ความรู้ของยีนทั้งหมดรวมทั้งยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้านเชื้อก่อโรคที่มีการแสดงออกในปลากัดไทยยังคงไม่แน่ชัด ในปัจจุบัน ความก้าวหน้าของเทคนิคทางด้านอนุชีววิทยาช่วยให้การศึกษาทรานสคริปโตมสามารถทำได้รวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาทรานสคริปโตมเพื่อวิเคราะห์ยีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกในปลากัดไทยในสภาวะปกติ และใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมเพื่อค้นหายีนในระบบภูมิคุ้มกันโดยการเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดอื่น

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

เลี้ยงปลากัดไทย *Betta splendens* ในบ่อพักเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง ยืนยันชนิดของปลากัด *B. splendens* ด้วยการทำให้เป็นเออาร์โค้ดโดยตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase subunit I (COI) (Table 1) เตรียมตัวอย่างปลากัดสำหรับวิเคราะห์ทรานสคริปโตมโดยเก็บแช่แข็งปลากัดทั้งตัว จำนวน 3 ตัว ในไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะนำไปสกัด RNA เตรียมตัวอย่างปลากัดสำหรับศึกษาการแสดงออกของยีนในแต่ละเนื้อเยื่อโดยแยกเก็บเนื้อเยื่อต่างๆ ได้แก่ ตับ ลำไส้ กล้ามเนื้อ ไต ม้าม และเหงือก จากปลากัด 5 ตัว แช่แข็งเนื้อเยื่อในไนโตรเจนเหลวจนกว่าจะนำไปสกัด RNA โดยดำเนินการวิจัยสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ และได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (รหัสโครงการ BT-Animal 46/2562)

การสกัด RNA การสร้างห้องสมุด cDNA และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

สกัด RNA จากตัวอย่างปลากัดโดยใช้ Tri Reagent[®] (Molecular Research Center) กำจัด DNA ที่เจือปนโดยย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega) สร้างห้องสมุด cDNA ตามวิธีของ Illumina และส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ RNA ทั้งหมดด้วยเครื่อง Illumina Hiseq 4000 (Illumina) กับบริษัท BGI, Inc. (ประเทศจีน) การวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมทางไบโออินฟอร์เมติกส์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเครื่อง Illumina Hiseq 4000 (Raw reads) มาผ่านขั้นตอนการตัดเบสคุณภาพต่ำและ Adaptor ออกด้วยซอฟต์แวร์จากบริษัท BGI, Inc. (ประเทศจีน) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละชิ้นของเส้น DNA (Clean reads) มาประกอบเรียงกันใหม่เป็น transcripts และ unigenes ด้วยวิธี *de novo* assembly โดยใช้โปรแกรม Trinity และ Tgicl วิเคราะห์หน้าที่ของยีนโดยการ BLAST กับฐานข้อมูลต่างๆ ได้แก่ NCBI non-redundant protein sequence (NR) NCBI non-redundant nucleotide sequence (NT) Swiss-Prot protein family (Pfam) Gene ontology (GO) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) และ Cluster of Orthologous Groups of proteins (COG)

การค้นหาและวิเคราะห์ยีน BsMxA

ค้นหาข้อมูลของยีน Mx ที่มีรายงานในปลาและสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เพื่อนำมาสืบค้นหายีน BsMxA ในฐานข้อมูลทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน BsMxA ด้วยโปรแกรม ExPASy (<https://www.expasy.org>) ทำนายโดเมนที่มีความสำคัญของโปรตีนด้วยโปรแกรม SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) ทำนายส่วนของเพปไทด์ส่งสัญญาณ (Signal peptide) ด้วยโปรแกรม SignalP 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) เปรียบเทียบความเหมือนกับยีนที่รายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และทำ Sequence alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal Omega

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน BsMxA ด้วยเทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

สกัด RNA จากตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ ลำไส้ กล้ามเนื้อ ไต ม้าม และเหงือก ด้วย Tri Reagent[®] (Molecular Research Center) กำจัด DNA ที่เจือปนโดยย่อยด้วยเอนไซม์ DNase I (Promega) สังเคราะห์ cDNA ด้วย

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *BsMxA* (Table 1) และใช้ *Beta-Actin* เป็นยีนควบคุม วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

Table 1 Nucleotide sequence of the primers used.

Primer	Sequence (5'-3')
COI-VF2_t1	CAACCAACCACAAAGACATTGGCAC
COI-FR1d_t1	ACCTCAGGGTGTCCGAARAAYCARAA
BsMxF	GGAAAATGTTCTGCACCTTGC
BsMxR	TTCTGTCACTCAGGCTGCTGCT
BsActinF	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT
BsActinR	GAAGGAGTAGCCACGCTCTG

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens*

จากการศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq 4000 พบว่าได้ raw reads ขนาด 4.75 Gb หลังจากทำการ clean data และตัดเบสที่มีคุณภาพต่ำและ Adaptor ออกแล้ว พบว่าได้ทรานสคริปโตมขนาด 4.46 Gb เมื่อนำข้อมูลแต่ละ read มาประกอบเข้าด้วยกันโดยวิธี *de novo assembly* ด้วยโปรแกรม Trinity ได้ transcript ทั้งหมด 92,890 transcripts เมื่อนำ transcripts มาทำการจัดรวมกลุ่มด้วยโปรแกรม Tgicl พบว่าได้ยีนทั้งหมด 71,775 unigenes มีความยาวรวม 79.51 Mb Unigene มีความยาวเฉลี่ย 1,107 bp มีค่า N50 เท่ากับ 2,225 bp และมี GC content เท่ากับ 49.79 % (Table 2)

Table 2 Summary of Illumina sequencing and *de novo* assembly of *Betta splendens* transcriptome.

Particulars	Numbers
No. of bases of raw reads (Gb)	4.75
No. of bases after processing (Gb)	4.46
Total transcripts	92,890
Total unigenes	71,775
Total length of unigenes (Mb)	79.51
Mean length of unigenes (bp)	1,107
N50 (bp)	2,225
GC content (%)	49.79

เมื่อวิเคราะห์หน้าที่ของยีน โดยนำ unigenes ทั้งหมดไป Blast กับฐานข้อมูล Nr Nt GO COG KEGG Swiss-Prot และ Interpro พบว่ามีความเหมือนกับยีนที่มีรายงานในแต่ละฐานข้อมูล เท่ากับ 63.14% 65.88%

6.28% 22.98% 52.52% 54.48% และ 49.28% ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลจากการวิเคราะห์หน้าที่ของยีนใน pathway ต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล KEGG พบว่า 37,694 unigenes เป็นยีนที่อยู่ใน 44 pathway (Figure 1) โดย pathway ที่พบ unigenes มากที่สุด ได้แก่ Signal transduction รองลงมาคือ Cancers: Overview Global and overview maps Immune system และ Endocrine system โดยคิดเป็น 9.98% 5.42% 5.24% 4.42% และ 4.30% ของ unigenes ที่พบทั้งหมดในทรานสคริปโตมของปลากัด *B. splendens* ตามลำดับ

การศึกษาทรานสคริปโตมทำให้ทราบยีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตที่สนใจ ในปลาสวยงามพบว่ามีรายงานการศึกษาทรานสคริปโตมในปลาหางนกยูง *Poecilia reticulata* ปลาอาโรวาน่า *Scleropages formosus* และปลาทอง *Carassius auratus*, red var. (Fraser et al., 2011; Shen et al., 2014; Zhang et al., 2017) สำหรับในปลากัดไทย *B. splendens* ถึงแม้จะมีรายงานข้อมูลจีโนม โดยจีโนมของปลากัดไทย มีขนาด 465.24 Mb (Fan et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลจีโนมเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการระบุชนิดของยีนที่มีการแสดงออกจริงในปลากัดได้ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัด *B. splendens* ผลจากการทดลอง ทำให้ทราบชนิดของยีนทั้งหมดที่มีการแสดงออกในปลากัดภายใต้สภาวะปกติ ผลจากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตม ยังมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการค้นหายีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลากัดในการทดลองต่อไป

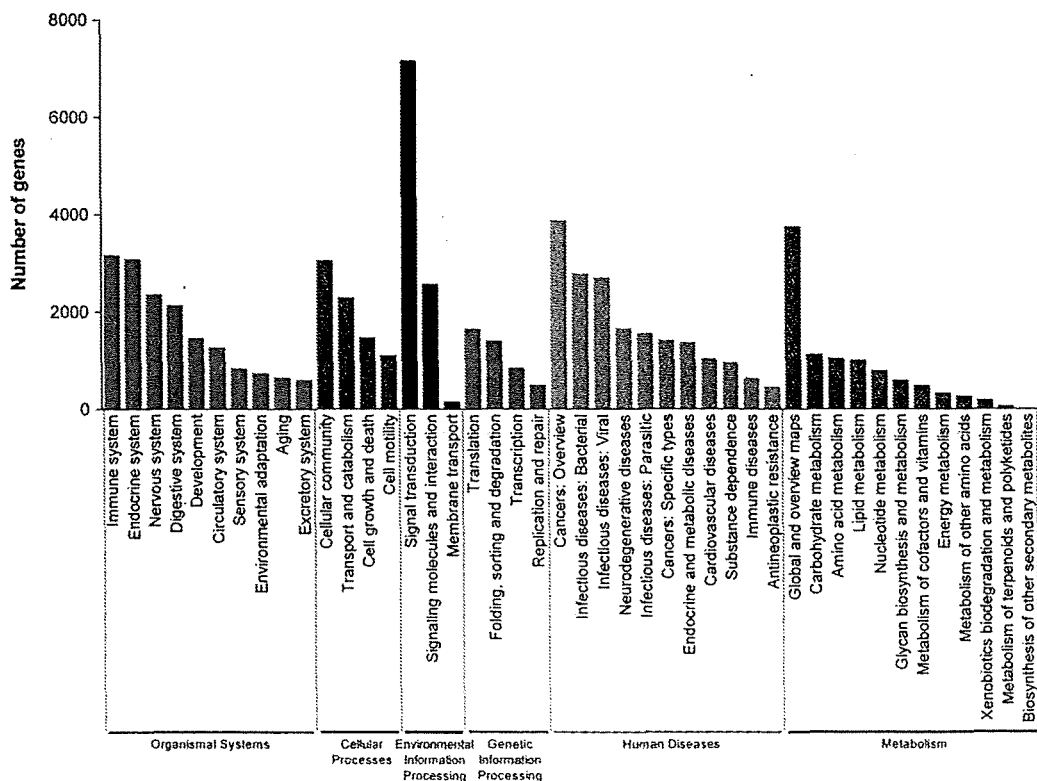


Figure 1 KEGG pathway enrichment analysis of from *Betta splendens* transcriptome. 37,694 unigenes were mapped onto 44 pathways of 6 main KEGG categories.

การค้นหาลักษณะสมบัติของยีนมิทโซไวรัสรีซิแทนท์ BsMxA ในปลากัดไทย *B. splendens*

จากการค้นหายีนในระบบภูมิคุ้มกันจากทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *B. splendens* พบยีน BsMxA ซึ่งมี open reading frame (ORF) ที่สามารถแปลรหัสได้เป็นโปรตีนขนาด 623 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุล 71.05 kDa และค่า isoelectric point (pI) เท่ากับ 5.59 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของ BsMxA กับโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BlastP พบว่า BsMxA คล้ายกับโปรตีน Mx ของปลาหมอค *Anabas testudineus* มากที่สุด (93%) รองลงมาคือโปรตีน Mx ของปลาสำลีน้ำลึก *Seriola dumerilli* (92%) โปรตีน Mx2 ของปลา rock bream *Oplegnathus fasciatus* (91%) โปรตีน Mx ของปลาสามาจิ *Seriola lalandi* (91%) โปรตีน Mx ของปลากะพงขาว *Lates calcarifer* (91%) และโปรตีน Mx3 ของปลากะพงแดง *Sparus aurata* (91%)

โปรตีน Mx จัดเป็นโปรตีนในกลุ่ม Dynamine-like large guanosine triphosphatases (GTPases) ประกอบด้วยโดเมนที่สำคัญ ได้แก่ GTPase domain Middle domain (MD) และ GTPase effector domain (GED) (Haller et al., 2015; Verhelst et al., 2013) จากการวิเคราะห์หาโดเมนที่สำคัญภายในโมเลกุลของ BsMxA พบว่าประกอบด้วย GTPase domain บริเวณปลายอะมิโน และ GTPase effector domain (GED) บริเวณปลายคาร์บอกซิล (Figure 2) เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนภายใน GTPase domain พบว่าประกอบด้วย GTP-binding motif จำนวน 3 motif ได้แก่ GDXXSGKS (GDQSSGKS) บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 40-47 DLPG บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 141-144 และ TKPD บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 210-213 และพบ dynamin signature LPRXXGXXTR (LPRGSGIVTR) บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 58-67 โดย dynamin signature เป็นบริเวณที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จับได้กับ Mg²⁺ ซึ่งจำเป็นสำหรับการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม GTPase (Song et al., 2004) นอกจากนี้ พบว่าภายในโปรตีน BsMxA มี N-linked glycosylation (NAT) 1 ตำแหน่ง บริเวณกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 534-536 ผลจากการวิเคราะห์ Sequence alignment (Figure 2) ยังแสดงให้เห็นว่าโปรตีน BsMxA ของปลากัดมีความคล้ายกับโปรตีน Mx ที่มีการรายงานในปลา

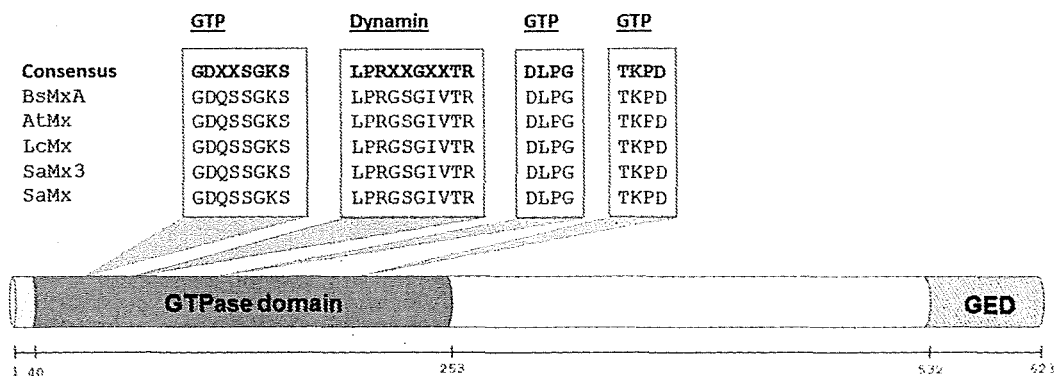


Figure 2 Domain organization of BsMxA protein of *Betta splendens* and alignment of domains important for the antiviral activity with other fish Mx proteins.

การศึกษาารูปแบบการแสดงออกของยีน *BsMxA* ในปลากัดไทย *B. splendens*

จากการศึกษาารูปแบบการแสดงออกของยีน *BsMxA* ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลากัดไทย *B. splendens* ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR และตรวจสอบผลด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ายีน *BsMxA* มีการแสดงออกมากที่สุดในกล้ามเนื้อ รองลงมา คือ เหงือก ม้าม ไต และ ลำไส้ ตามลำดับ (Figure 3)

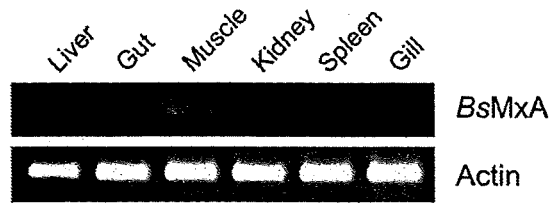


Figure 3 Tissue distribution analysis of *BsMxA* gene in betta fish *Betta splendens*. The mRNA expression of *BsMxA* was examined in the tissues of liver, gut, muscle, kidney, spleen and gill using semi-quantitative RT-PCR technique. Beta-actin was used as an internal control.

สรุป

งานวิจัยนี้ ประสบความสำเร็จในการศึกษาทรานสคริปโตมของปลากัดไทย *Betta splendens* ทั้งตัวในสภาวะปกติ โดยพบว่าได้ทรานสคริปโตมขนาด 4.46 Gb ประกอบด้วยยีนทั้งหมด 71,775 unigenes นอกจากนี้ผลจากการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลยีนในระบบภูมิคุ้มกันของปลาชนิดอื่น ทำให้ค้นพบยีนมิทโซไวรัสรีซัสแทนท์ *BsMxA* ซึ่งมีความคล้ายกับ Mx protein ที่มีรายงานในปลาหลายชนิด ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาวิจัยปลากัดไทยในเชิงลึกในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สัญญาเลขที่ CU-GR_61_010_23_003)

เอกสารอ้างอิง

- การุณ ทองประจุแก้ว. 2554. การพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้เทคโนโลยีของเอนไซม์ย่อยอาหารเพื่อการเจริญเติบโตอย่างมีคุณภาพของปลากัด (*Betta splendens* Regan, 1910). คุษฎีนิพนธ์วิทยาศาสตร์ คุษฎีบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 139 หน้า.
- Caipang, C. M., I. Hirono and T. Aoki. 2003. In vitro inhibition of fish rhabdoviruses by Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* Mx. *Virology* 317: 373-382.
- Fan, G., J. Chan, K. Ma, B. Yang, H. Zhang, X. Yang, C. Shi, H. Chun-Hin Law, Z. Ren, Q. Xu, Q. Liu, J. Wang, W. Chen, L. Shao, D. Gonçaves, A. Ramos, S. D. Cardoso, M. Guo, J. Cai, X. Xu, J. Wang,

- H. Yang, X. Liu and Y. Wang. 2018. Chromosome-level reference genome of the Siamese fighting fish *Betta splendens*, a model species for the study of aggression. *Gigascience* 7: gjy087.
- Fraser, B. A., C. J. Weadick, I. Janowitz, F.H. Rodd and K. A. Hughes. 2011. Sequencing and characterization of the guppy (*Poecilia reticulata*) transcriptome. *BMC Genomics* 12: 202.
- Haller, O. and G. Kochs. 2002. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 3: 710-717.
- Haller, O., P. Staeheli, M. Schwemmler and G. Kochs. 2015. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. *Trends in Microbiology* 23: 154-63.
- Jensen, I. and B. Robertsen. 2002. Effect of double-stranded RNA and interferon on the antiviral activity of Atlantic salmon cells against infectious salmon anemia virus and infectious pancreatic necrosis virus. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 221-241.
- Kibenge, M.J., K. Munir and F.S. Kibenge. 2005. Constitutive expression of Atlantic salmon Mx1 protein in CHSE-214 cells confers resistance to infectious salmon anaemia virus. *Virology Journal* 2: 75.
- Monvises, A., B. Nuangsaeng, N. Sriwattanarothai and B. Panijpan. 2009. The Siamese fighting fish: Well-known generally but little-known scientifically. *ScienceAsia* 35: 8-16.
- Sadler, A. J. and B. R. Williams. 2008. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology* 8: 559-568.
- Schindler, I. and J. Schmidt. 2006. Review of the mouthbrooding *Betta* (Teleostei, Osphronemidae) from Thailand, with descriptions of two new species. *Zeitschrift für Fischkunde* 8: 47-69.
- Shen, X. Y., H. Y. Kwan, N. M. Thevasagayam, S. R. Prakki, I. S. Kuznetsova, S. Y. Ngoh, Z. Lim, F. Feng, A. Chang and L. Orbán. 2014. The first transcriptome and genetic linkage map for Asian arowana. *Molecular ecology resources* 14: 622-635.
- Song, B. D., M. Leonard and S. L. Schmid. 2004. Dynamin GTPase domain mutants that differentially affect GTP binding, GTP hydrolysis, and clathrin-mediated endocytosis. *Journal of biological chemistry* 279: 40431-40436.
- Verhelst, J., P. Hulpiau and X. Saelens. 2013. Mx proteins: antiviral gatekeepers that restrain the uninvited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77: 551-566.
- Zhang, Y.B. and J. F. Gui. 2012. Molecular regulation of interferon antiviral response in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 38: 193-202.
- Zhang, Y., J. Liu, L. Peng, L. Ren, H. Zhang, L. Zou, W. Liu and Y. Xiao. 2017. Comparative transcriptome analysis of molecular mechanism underlying gray-to-red body color formation in red crucian carp (*Carassius auratus*, red var.). *Fish physiology and biochemistry* 43: 1387-1398.