เครื่องหมายอาร์เอพีดีที่เกี่ยวข้องกับความไวต่อไวรัส BmNPV ในหนอนไหม (*Bombyx mori* L.)

RAPD markers linked to BmNPV susceptibility in Silkworm (*Bombyx mori* L.)

มณฑิรา มณฑาทอง (Monthira Monthatong)[1*]
ธเนศ จันทร์เทศ (Thanes Chantes)[2]
นัดดา เกียรติโสภิษฐ์ (Nadda Kiatsopit)[3]

บทคัดย่อ

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) เป็นไวรัสสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคแกรสเซอรี่ (Grassery Disease) ในไหม (*Bombyx mori* Linn.) จากการปรับปรุงสายพันธุ์ไหมทำให้ได้ลูกผสมที่มีระดับความต้านทานต่อไวรัสแตกต่างกัน ซึ่งสามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอโดยวิธี RAPD จะช่วยให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นที่ระบุความแตกต่างของความสามารถนี้ ซึ่งเป็นแนวทางในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองของไหมต่อไวรัส การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากต่อมไหมส่วนท้าย (posterior silk glands) ของหนอนไหมวัยที่ 5 จำนวน 11 สายพันธุ์ มีระดับความต้านทานต่อไวรัส BmNPV ต่างกัน จากการทดลองพบ ไพรเมอร์ 8 เส้น จากจำนวนไพรเมอร์ทั้งหมด 25 เส้น ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหนอนไหมได้จำนวนชิ้นดีเอ็นเอรวม 157 ชิ้น เฉลี่ย 20 ชิ้น/ไพรเมอร์ และมีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของหนอนไหมจำนวน 56 ชิ้น นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์ 2 เส้น ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อหนอนไหมสายพันธุ์ที่ไวต่อไวรัส BmNPV จำนวน 2 ชิ้น มีขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ 1689 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ

Abstract

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) is the significant virus causing Grassery disease in silkworm (*Bombym mori* Linn.). Silkworm breeding has genetically established silkworm varieties for BmNPV resistance. In this research, the DNA markers linked to the ability in BmNPV resistance were identified by using the RAPD technique. DNA samples were extracted from posterior silk glands of the fifth instars of 11 silkworm varieties with different levels of BmNPV resistance. We obtained 8 primers among 25 primers that were able to amplify 157 DNA fragments, averaging 20 DNA fragments/primer. A total of 56 fragments

[1]*อาจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น*
[2]*ผู้อำนวยการ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ขอนแก่น จ.ขอนแก่น*
[3]*นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น*
[*]*Corresponding author, e-mail: monmon@kku.ac.th*

showed polymorphism among silkworm varieties. Interestingly, there were two fragments, size 1689 bp and 900 bp, that were specific to BmNPV susceptible silkworms.

คำสำคัญ: หนอนไหม, BmNPV, โรคแกรสเซอรี่, RAPD
Keywords: Silkworm, BmNPV, Grassery disease, RAPD

บทนำ

ประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศผู้ผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์ไหมที่มีชื่อเสียง ซึ่งได้รับการยอมรับจากตลาดโลก ทำให้มีการผลิตและจำหน่ายผลผลิตที่ได้จากไหมออกนอกประเทศเป็นจำนวนมาก การเลี้ยงไหมเป็นอาชีพเสริมที่ทำรายได้สูงให้แก่เกษตรกร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเส้นใยไหมยังคงไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด อันเนื่องมาจากปัญหาการระบาดของโรค โดยหนึ่งในโรคที่เป็นปัญหาสำคัญสำหรับการเลี้ยงไหม คือ โรคแกรสเซอรี่ (Grassery Disease) ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) (มาลี, 2536) ไวรัส BmNPV จัดอยู่ในวงศ์บาคิวโลไวริดี้ (Baculoviridae) มีอนุภาคเป็นท่อนตรงอยู่ภายในผลึกโปรตีนที่เรียกว่า polyhedron (Acharya et al., 2002) เมื่อหนอนไหมติดเชื้อจะมีการหลั่ง hemolymph ที่ปนเปื้อนด้วยอนุภาคไวรัสจำนวนมาก ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอย่างรวดเร็ว แต่อาการของโรคจะแสดงออกในไหมวัยแก่ คือไหมระยะที่ 4 และ 5 ตามการเปลี่ยนแปลงทางสรีระของไหม (สมหญิง, 2546) ทำให้ไม่สามารถรักษาได้ทันการณ์และก่อให้เกิดความเสียหายทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย

การปรับปรุงสายพันธุ์ไหมให้ต้านทานต่อโรคมีมาเป็นระยะเวลานาน ในปี พ.ศ. 2521 สถาบันหม่อนไหมกวงดอง ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ได้ทำการคัดเลือกแม่พันธุ์ที่มีลักษณะพันธุกรรมที่สามารถ ต้านทานต่อ Nuclear polyhedrosis virus (NPV) และ Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV) ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับความต้านทานไวรัสก่อโรคในไหมสายพันธุ์ต่างๆ (มัลลิกา และคณะ, 2540) และได้ศึกษาความรุนแรงของเชื้อ Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) ในหนอนไหมสายพันธุ์หนองคาย 4, เขียวสกล, UDA, SKN1, UDA x หนองคาย 4, SKN1 x เขียวสกล โดยให้หนอนไหมวัยที่ 3 กินเชื้อไวรัสที่ติดไปกับใบหม่อน ในอัตราความเข้มข้นของเชื้อ 10^2, 10^4, 10^6 และ 10^8 ผลึก/มล. พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเชื้อที่หนอนไหมได้รับเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไหมก็จะเพิ่มขึ้นด้วย จากการวิเคราะห์ค่า LC_{50} พบว่าสายพันธุ์ไหมที่ต้านทานต่อเชื้อ NPV คือ UDA x หนองคาย 4 และ SKN1 x เขียวสกล ส่วนสายพันธุ์ที่อ่อนแอที่สุด คือ สายพันธุ์เขียวสกล และ SKN1 x เขียวสกล

กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2546) ศึกษาสายพันธุ์ไหมที่ต้านทานต่อเชื้อ NPV ในหนอนไหม 10 สายพันธุ์ คือ นครราชสีมาลูกผสม 1, K1, K9, นครราชสีมา 60-1 (K13), นครราชสีมา60-2 (K6), K8, K18, หนองคาย 4, นางลาย และนางเหลือง โดยใช้เชื้อ NPV ในอัตรา 1.01 x 107 ผลึก/มล. สรุปว่า สายพันธุ์นางลาย และ K1 มีความต้านทานโรคทุกฤดูกาล และในปีเดียวกันได้ทำการเปรียบเทียบความต้านทานของไหมไทยลูกผสมต่อเชื้อ NPV โดยใช้ไหมสายพันธุ์ SP1 x SP2, SP1 x SB7, C4 x โนนฤาษี, UB1 x โนนฤาษี, อุบลราชธานี 60-35 และ UDA x นค.4 โดยให้หนอนไหมวัย 3 กินเชื้อไวรัสที่ติดไปกับใบหม่อนในอัตราความเข้มข้นของเชื้อ 102, 104, 106, 108 ผลึก/มล. จากการวิเคราะห์ค่า LC_{50} พบว่าแต่ละสายพันธุ์ให้ค่า LC_{50} เฉลี่ย 10^6 ผลึก/มล. ขึ้นไป ยกเว้นสายพันธุ์ C4 x โนนฤาษี ที่ให้ค่า LC_{50} 6.53 x 10^5 สายพันธุ์ที่ต้านทานที่สุด คือ อุบลราชธานี 60-35 รองลงมา คือ SP1 x SB7 และ UB1 x โนนฤาษี

ส่วนการศึกษาสายพันธุ์ไหมต้านทานเชื้อ NPV ในหนอนไหมสายพันธุ์ฟักออกตลอดปี 4 สายพันธุ์ คือ ชย.1, ชย.2, ชย.3 และ นางลาย โดยให้เชื้อในอัตราความเข้มข้น 10^7 ผลึก/มล. ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ ผลการทดลองเดือนเมษายน 2543 สายพันธุ์ไหมที่ต้านทานสูงสุด ได้แก่ ชย.3 และ ชย.1 การทดสอบเดือนมิถุนายน 2543 ได้แก่ นางลาย, ชย.3 และ ชย.2 การทดสอบเดือนสิงหาคม 2543 ได้แก่ ชย.1, ชย.2 และ นางลาย การทดสอบเดือนตุลาคม 2543 ได้แก่ นางลาย และ ชย.3

จากการศึกษาการตรวจสอบหาระดับความต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่ของหนอนไหมสายพันธุ์ไทย โดยใช้หนอนไหม จำนวน 19-31 สายพันธุ์ ทดสอบกับเชื้อ BmNPV ที่ระดับความเข้มข้น 106 ผลึก/มล. พบว่า ไหมสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ NPV ในระดับสูง (แข็งแรง) มีจำนวน 11 สายพันธุ์ไหม ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ NPV ในระดับปานกลาง มีจำนวน 10 สายพันธุ์ และไหมที่มีความต้านทานต่อเชื้อ NPV ในระดับต่ำ (อ่อนแอ) มีจำนวน 8 สายพันธุ์ จึงคัดเลือก ไหมสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ NPV ในระดับสูง (แข็งแรง) จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่ กวนวัน, โชคอำนวย 1, นางไหม, สำโรง, หนองคาย 1 (นค.1), หนองคาย 2 (นค.2), หนองคาย 3 (นค.3), หนองคาย 4 (นค.4), หนองคาย 5 (นค.5) และ หนองคาย 6 (นค.6) มาทดสอบหาสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ NPV ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เพื่อหาสายพันธุ์ไหมที่มีความแข็งแรงสูงสุด โดยทดสอบกับเชื้อ NPV ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10^6, 10^7 และ 10^8 ผลึก/มล. พบว่า สายพันธุ์ หนองคาย 4 และ หนองคาย 6 มีความแข็งแรงสูงสุด (บุษรา และคณะ, 2546)

การใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ได้เข้ามามีบทบาทเกี่ยวข้องในการปรับปรุงพันธุ์พืชและสัตว์เป็นจำนวนมาก รวมทั้งใช้วินิจฉัยการติดเชื้อจากไวรัสและจุลินทรีย์อื่นๆอย่างกว้างขวาง ในหนอนไหม ได้มีการใช้ เทคนิค PCR ตรวจสอบการติดเชื้อ BmNPV โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีนที่สร้าง polyhedron ของ ไวรัสในกลุ่ม NPV (Ikuno et al., 2004) ส่วนเทคนิค RAPD-PCR ได้ถูกนำมาใช้ในการจำแนกไหมสายพันธุ์พื้นเมืองของไทย 38 พันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ 24 คู่ ในการจำแนกสายพันธุ์ไหมพื้นเมือง 38 พันธุ์ พบว่าสามารถแบ่งพันธุ์ไหมพื้นเมืองไทยได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (อมรรัตน์ และคณะ, 2543)

งานวิจัยครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค RAPD ในการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของหนอนไหมที่เกี่ยวข้องกับความต้านทาน/ความไวต่อไวรัส BmNPVโดยใช้ไหมสายพันธุ์ต่างๆ ที่นิยมในการเพาะเลี้ยงของเกษตรกร ผลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นพื้นฐานนำไปสู่การหายีนเป้าหมายของกลไกการรับเชื้อ BmNPV และกลไกการตอบสนองเมื่อไหมติดเชื้อ BmNPV ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ไหมให้ต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมสายพันธุ์ไหม

รวบรวมไข่ไหมจำนวน 11 สายพันธุ์ จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี และศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ จำแนกกลุ่มตามความสามารถในการต้านทานต่อไวรัส BmNPV อ้างอิงจาก บุษรา และคณะ (2546) ดังนี้ สายพันธุ์ที่ต้านทานไวรัส BmNPV ระดับสูง มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ โชคอำนวย 01, นางไหม, หนองคาย 03 และ หนองคาย 04 สายพันธุ์ที่ต้านทานไวรัส BmNPV ระดับปานกลาง มีจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ นางเหลือง, ชัยภูมิ 01, กากี และ ศรีสะเกษ 01 และสายพันธุ์ที่ไวต่อไวรัส BmNPV จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ นางลาย, นางน้อย ศรีสะเกษ 01 และ ชัยภูมิ 02

2. การเลี้ยงไหม

นำไข่ไหมที่ได้มากที่ห้องปฏิบัติการควบคุมสภาพแวดล้อม โดยมีอุณหภูมิ 25°C ความชื้นสัมพัทธ์ 75-80% และแสงสว่าง 16-18 ชั่วโมง จนกระทั่งฟักออกเป็นตัวไหม เลี้ยงต่อด้วยใบหม่อนโดยให้

ปริมาณอาหารเพิ่มขึ้นตามอายุของหนอนไหมเลี้ยงจนถึงประมาณวันที่ 2-3 ของระยะหนอนไหมวัย 5 แล้วนำมาผ่าเอาต่อมไหมส่วนท้าย (posterior silk gland) เก็บใน 0.7 N NaCl ที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอ

บดต่อมไหมส่วนท้ายใน lysis buffer 300 µl (ประกอบด้วย 0.1M Tris-HCl, 0.05M EDTA, 0.1M NaCl, 0.5% SDS และ 2% CTAB) และเติม 20 mg/ml RNase A 3 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติม 20 mg/ml proteinase K และบ่มที่อุณหภูมิ 55°C 60 นาที เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) 600 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที แยกสารละลายส่วนบน นำไปสกัดซ้ำด้วย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25: 24: 1) 500 µl อีกครั้ง และแยกสารละลายส่วนบน นำไปสกัดซ้ำด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) 500 µl ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนบนนำไปตกตะกอนด้วย absolute ethanol ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol 300 µl 1-2 ครั้ง คว่ำหลอดทิ้งไว้จนแห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer 100 µl ตรวจสอบคุณภาพโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm และ 260 nm ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์(Spectrophotometer) (รุ่น Ultrospec 1100 Pro บริษัท Amersham Bioscience) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 °C

4. RAPD-PCR

นำดีเอ็นเอของหนอนไหมที่สกัดได้ทั้ง 11 สายพันธุ์ มาทดสอบหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมที่ใช้เป็นต้นแบบในปฏิกิริยา RAPD โดยเลือกไพรเมอร์ 1 เส้น จากนั้นตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 80 เส้น โดยส่วนประกอบในปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 15 µl ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 2.5 mM MgCl2, 200µM dNTPs, 2µM primer, 0.5 Unit Taq DNA polymerase (Promega, USA) และ genomic DNA 30 ng ใช้เครื่อง PCR thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ Pre-denaturation 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation 94°C 1 นาที annealing 37°C 1 นาที extension 72°C 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ final extension 72°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ ทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis บน 1.5% agarose gel ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker

5. การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR

การคำนวณหาขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอโดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอตัวอย่างเปรียบเทียบกับระยะทางการเคลื่อนที่ของชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐานมาตรฐาน และใช้โปรแกรม Photocap ช่วยในการคำนวณหาขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอด้วย จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากแต่ละตัวอย่าง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรม

ผลการวิจัย

1. การสกัดดีเอ็นเอ

พบดีเอ็นเอมีขนาดโมเลกุลมากกว่า 47.79 kb เมื่อวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าหนอนไหมสายพันธุ์นางเหลือง นางลาย นางน้อยศรีสะเกษ 1 โชคอำนวย 1 หนองคาย 04 และกากี มีปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 28.68 ng/µl ส่วนหนอนไหมสายพันธุ์นางไหม ศรีสะเกษ 1 ชัยภูมิ 1 ชัยภูมิ 2 และ หนองคาย 03 มีปริมาณ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 11.996 ng/µl (รูปที่ 1) และจากการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของดีเอ็นเอสามารถหาค่าความบริสุทธิ์ได้ โดยอัตราส่วนของ A_{260} : A_{280} มีค่า ระหว่าง 1.7-2.0 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์มาก

2. การทดสอบไพรเมอร์

การหาปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยาอาร์เอพีดี พบว่าเท่ากับ 30 ng การตรวจสอบไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนไหม พบว่าจากการใช้ไพรเมอร์จำนวน 80 เส้น มีไพรเมอร์ 25 เส้น ที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอ แต่มีเพียง 8 เส้นได้แก่ ไพรเมอร์ A-03, A-04, A-08, A-09, A-10, A-11, A-19, และ B-17 (ตารางที่ 1) ที่ให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก และสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จากทุกตัวอย่าง

3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา RAPD-PCR

จากการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอหนอนไหมจากไพรเมอร์แต่ละเส้น พบว่ามีจำนวนชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 11-34 ชิ้น รวมจำนวน 157 ชิ้น เฉลี่ย 20 ชิ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 227-2139 คู่เบส และพบชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์จำนวน 56 ชิ้น เฉลี่ย 7 ชิ้น/ไพรเมอร์ โดยไพรเมอร์ A-03 มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 9 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 33.33% ไพรเมอร์ A-04มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 8 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 44.44% ไพรเมอร์ A-08 มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 5 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 38.46% ไพรเมอร์ A-09 และ A-11 มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 3 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 27.27 และ 17.65% ตามลำดับ ไพรเมอร์ A-10 มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 7 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 38.88% ไพรเมอร์ A-19มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 17 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 50% และไพรเมอร์ B-17 มีชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมจำนวน 4 ชิ้น มีเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 21.05% นอกจากนี้ยังพบไพรเมอร์จำนวน 2 เส้น คือ ไพรเมอร์ A-03 และ A-09 (รูปที่ 2) ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในหนอนไหมสายพันธุ์ที่ไวต่อเชื้อไวรัส BmNPV ระดับต่ำจำนวน 1 ชิ้นทั้งสองไพรเมอร์ รวมจำนวน 2 ชิ้น และมีขนาดโมเลกุล 1689 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ

วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

ในการวิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับหนอนไหมสายพันธุ์ต่างๆที่มีความต้านทาน/ความไวต่อเชื้อไวรัส BmNPV ในระดับที่แตกต่างกันด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า จากการการเลี้ยงไหม 11 สายพันธุ์ ได้แก่ โชคอำนวย 01, นางไหม, หนองคาย 03, หนองคาย 04, นางเหลือง, ชัยภูมิ01, กากี, ศรีสะเกษ 01, นางลาย, นางน้อยศรีสะเกษ 01 และ ชัยภูมิ 02 ใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงตั้งแต่การกกไข่จนกระทั่งเข้าสู่ช่วงอายุวันที่ 2-3 ของระยะหนอนวัย 5 ใช้เวลา 1 เดือน โดยเลี้ยงในเดือนธันวาคม 2548 เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากต่อมไหมส่วนท้ายจากทุกสายพันธุ์ พบว่าได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพสูง และ มีปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ระหว่าง 28.68- 11.996 ng/μl เมื่อทดสอบหาปริมาณของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการเป็นแม่แบบของปฏิกิริยา PCR พบปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมเท่ากับ 30 ng และเมื่อตรวจสอบหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ พบว่ามีไพรเมอร์จำนวน 8 เส้น จาก 25 ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของหนอนไหมได้ และแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอหนอนไหมจากไพรเมอร์แต่ละเส้นมีจำนวนชิ้นดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 11-34 ชิ้น รวมจำนวน 157 ชิ้น เฉลี่ย 20 ชิ้น/ไพรเมอร์ และมีขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 227-2,139 คู่เบส และจากการวิเคราะห์พบไพรเมอร์จำนวน 2 เส้น คือ ไพรเมอร์ A-03 และ A-09 เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏเฉพาะในหนอนไหมสายพันธุ์ที่ไวต่อเชื้อ BmNPV ได้จำนวน 2 ชิ้น มีขนาดโมเลกุลของชิ้นดีเอ็นเอ 1,689 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ โดยแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบนี้เกิดจากความแตกต่างทางพันธุกรรมของหนอนไหมกลุ่มนี้กับหนอนไหมกลุ่มอื่น ทำให้

ไพรเมอร์ทั้ง 2 เส้นเพิ่มผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ตรงบริเวณนี้ขึ้นในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอสายพันธุ์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไวต่อ BmNPV เท่านั้น ซึ่งเป็นเอกลักษณ์ในระดับพันธุกรรมของหนอนไหมกลุ่มนี้ แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 แถบนี้จึงมีแนวโน้มที่เป็นตัวแทนของเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับความอ่อนแอต่อโรคแกสเซอรี่ ซึ่งต้องศึกษาต่อไปว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้มีความสัมพันธ์กับยีนใดบ้าง และนอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ไปใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ของสายพันธุ์ไหม

เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนไหมที่ได้จากไพรเมอร์จำนวน 8 เส้น พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนไหมให้ชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จำนวน 56 ชิ้น เฉลี่ย 7 ชิ้น/ไพรเมอร์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์หนอนไหมอยู่ระหว่าง 21.05-50% เฉลี่ย 34% โดยไพรเมอร์ A-19 ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไหมสูงที่สุด 50% แสดงว่าไพรเมอร์ A-19 สามารถตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างหนอนไหมได้สูงสุด การที่ไหมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สังเกตได้จากแถบดีเอ็นเอซึ่งเป็นผลิตผลจากปฏิกิริยาอาร์เอพีดีนี้ ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ไหมหรือการตรวจสอบ เอกลักษณ์ของแต่ละสายพันธุ์ได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนพัฒนาและส่งเสริมวิชาการคณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี พ.ศ. 2549 และ ทุนสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี IRPUS ประจำปี 2548 รหัสโครงการ R14803012 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานีและศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ สำหรับความอนุเคราะห์ตัวอย่างไหม

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **30 ปี วิชาการหม่อนไหมไทย.** ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

บุษรา ระวินู, สุชาติ จุลพูล, มัลลิกา แก้ววิเศษ และสิทธิชัย บุญมั่น. 2546. **รายงานผลงานวิชาการหม่อนไหมปี 2546.** สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 98-112.

มัลลิกา แก้ววิเศษ, อมรรัตน์ พรหมบุญ และ อุไร สุวรรณวงศ์. 2540. ผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการหม่อนไหม ประจำปี 2539. **ข่าวศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี** 9(1-2): 24.

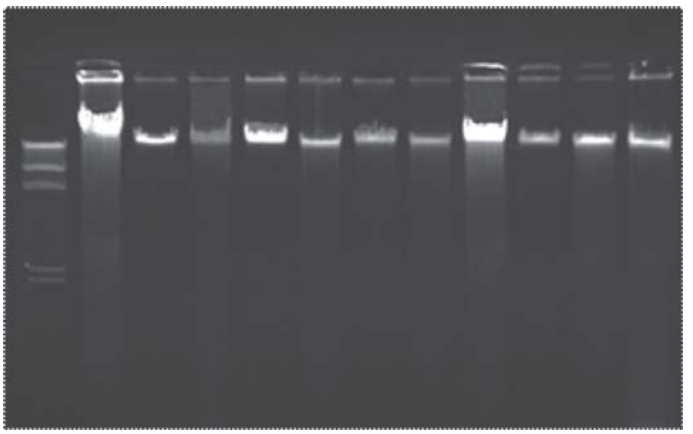
มาลี ตั้งระเบียบ. 2536. **การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อนิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีสไวรัส สาเหตุโรคแกรสเซอรี่ของหนอนไหมในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ขอนแก่น: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมหญิง ชูประยูร. 2546. **ไหม: ราชินีแห่งเส้นใย.** โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์, กรุงเทพฯ.

อมรรัตน์ พรหมบุญ. 2543. **รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการจำแนกสายพันธุ์ไหมพื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุล.**

Acharya, A.; Sriram, S.; Sehrawat, S.; Rahman, M.; Sehgal, D. and Gopinathan, K. P. 2002. *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus: Molecular Biology and Biotechnological Application for Large-scale Synthesis of Recombinant Protein. **Current Science** 83(4): 455-465.

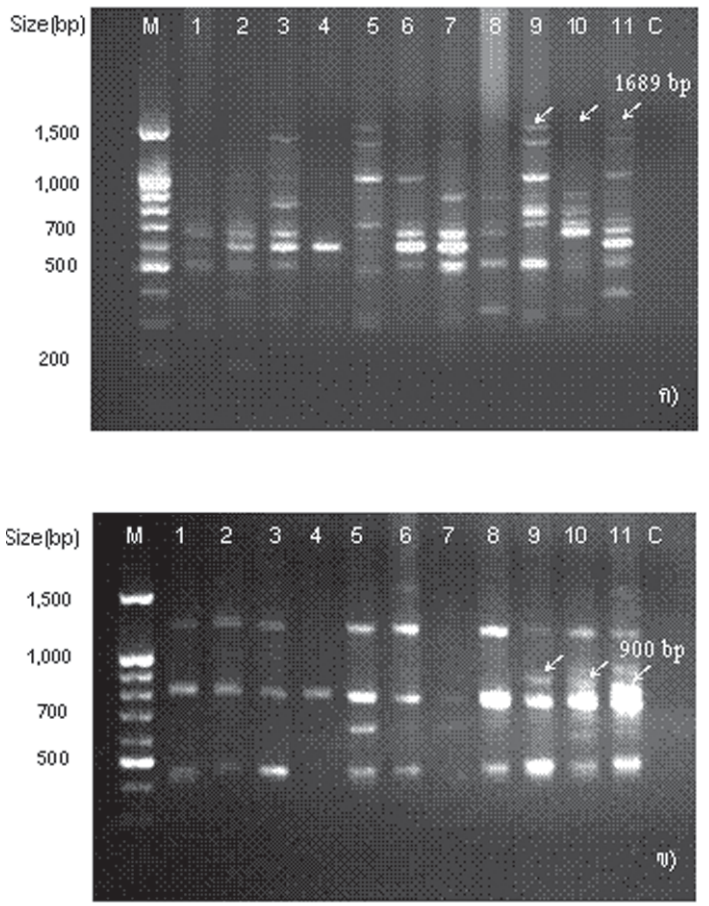
Ikuno, A. A.; Margatho, L. F. F.; Harakava, R.; Akamatsu, M. A.; Martins, E. M. F.; Porto, A. J. and Ferreira, V. C. A. 2004. Direct Application of the New PCR Protocol for Evaluation and Monitoring of Bombyx mori Infection by Nucleopolyhedrovirus. **Arquivo Instituto Biológico, São Paulo** 71(3): 309-315.



รูปที่ 1. ผลการสกัดดีเอ็นเอจากต่อมไหมส่วนท้ายของหนอนไหมวัย 5 จำนวน 11 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบผลบน 0.8 % agarose gel M=λ *Hind* III marker, 1=นางเหลือง, 2=นางลาย, 3= นางไหม, 4=นางน้อยศรีสะเกษ01 5=ศรีสะเกษ01, 6=ชัยภูมิ01, 7 = ชัยภูมิ02, 8=โชคอำนวย01, 9=หนองคาย03, 10=หนองคาย04 และ 11=กากี

ตารางที่ 1. ไพรเมอร์และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเออย่างสม่ำเสมอ

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'➔3')
1	A-03	AGTCAGCCAC
2	A-04	AATCGGGCTG
3	A-08	GTGACGTAGG
4	A-09	GGGTAACGCC
5	A-10	GTGATCGCAG
6	A-11	CAATCGCCGT
7	A-19	CAAACGTCGG
8	B-17	AGGGAACGAG



รูปที่ 2. ก) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนไหมจากการใช้ไพรเมอร์ A- 03
ข) ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของหนอนไหมจากไพรเมอร์ A- 09
M = 100 bp DNA marker C = Negative control
ช่องที่ 1- 4 สายพันธุ์ที่มีความต้านทาน BmNPV สูง ได้แก่ โชคอำนวย01 นางไหม หนองคาย03 และ หนองคาย04 ตามลำดับ
ช่องที่ 5-8 สายพันธุ์ที่มีความต้านทาน BmNPV ปานกลาง ได้แก่ นางเหลือง ชัยภูมิ01 กากี และศรีสะเกษ01 ตามลำดับ
ช่องที่ 9-11 สายพันธุ์ที่ไวต่อ BmNPV ได้แก่ นางลาย นางน้อยศรีสะเกษ01 และชัยภูมิ02 ตามลำดับ