

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานกรรมการการศึกษา (สกอ.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยโครงการ “ ศึกษาการติดเชื่อแกรสเซอร์ในหนองใหม่พันธุ์ไทยพื้นเมือง ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อโดยวิธีพีซีอาร์ ” และขอขอบคุณศูนย์นวัตกรรมใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่สำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

ดร. สิริภค สุระพร

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ MRG5280227

ชื่อโครงการ ศึกษาการติดเชื้อแกรสเซอร์หนอนไหมพันธุ์ไทยพื้นเมืองภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ

โดยวิธีพีซีอาร์

ชื่อนักวิจัยและสถาบัน ดร.ศิริภัก สุระพร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ต.ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150.

Email address : siripuk_s@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

โรคแกรสเซอร์ของหนอนไหม *Bombyx mori* เกิดจาก Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) ก่อความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมเลี้ยงไหมมากที่สุด ศึกษาการถ่ายทอดโรคและตรวจหาโรคแกรสเซอร์ได้ในระยะเริ่มต้น ตั้งแต่หนอนไหมได้รับเชื้อจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการระบาดของโรคดังกล่าวทำการเลี้ยงไหมพันธุ์นางลายด้วยอาหารเทียมสูตร CU-MSU1 ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ 1 รุ่น ทำการให้ BmNPV ที่ความเข้มข้น 10^5 PIBs/ml กับหนอนไหมรุ่นที่ 2 แล้วหนอนไหมที่รอดตายพัฒนาเป็นรุ่นที่ 3 มาตรวจหา BmNPV โดยนำเนื้อเยื่อหนอนไหม 0.5 กรัม จาก ไช้ หนอนวัย 1-5 ดักแด่ และฝีเสื้อ จากไหมรุ่นที่ 3 มาสกัดดีเอ็นเอ ศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ โดยตรวจหา BmNPV ในหนอนไหมรุ่นที่ 3 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์จากลำดับเบสของ BmNPV จาก GenBank Accession No. X58442, FR-5' CCAAACGTATGACGCAAATTAATTTT-3' และ RP-3'TTGTTAAATTGGGCCACCACTTTGT-3' ทำการวิเคราะห์ผลการตรวจ BmNPV-DNA โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลการวิจัยพบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์นี้สามารถนำมาตรวจโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหม และตรวจพบ BmNPV ในหนอนไหมวัย 2 และ 4 ดักแด่ และฝีเสื้อ แต่ไม่พบเชื้อไวรัส ในระยะไช้ไหม ระยะหนอนวัย 1 วัย 3 และ วัย 5

Keywords : หนอนไหม นิวเคลียร์โพลีอีโตรซิสไวรัส การถ่ายทอดโรค อาหารเทียม

Abstract

Project code: MRG5280227

Project title : Investigation of Nuclear Polyhedrosis Virus infection in Thai Silkworm, *Bombyx mori* under aseptic rearing by PCR method.

Investigator: Dr. Siripuk Suraporn, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kamreang subdistrict, Kantravichai district, Mahasarakham Province, 44150.

Email address : siripuk_s@yahoo.com

ระยะเวลาโครงการ 2 ปี

Grassery disease caused by Nuclear Polyhedrosis Virus is the most important disease of silkworm, *Bombyx mori* (BmNPV). Study on transmission and early detection of this disease will help in saving time and labor of the sericulturists and prevent spreading of the disease in silkworm colony. The artificial diet (CU-MSU1) was used for silkworm, Nang lai by using aseptic technique in 3 generations. BmNPV-DNA was extracted from 0.5 g of silkworm tissue from egg stage, 1–5th stage larva, pupa and moth were used for PCR detection. BmNPV-DNA was extracted by minipreparation method. The primers were designed from computer program softwares and GenBank database based on nucleotides sequence of BmNPV-DNA (Accession No. X58442). The primers synthesized was FP, 5'-CCAAACGCATATGACGCAAATTAATTTT-3' and RP, 5'-TTGTTAAA TTGGGCCACCACTTTGT-3'. The BmNPV-DNA was analysed by using 0.7% agarose gel electrophoresis. The results showed that the primers were sensitive and specific to only grassery detection. PCR detection can detect BmNPV silkworm larvae in 2nd and 4th larva stage but not be found in egg stage, 1st 3rd and 5th larva stage.

Keywords : *Bommyx mori*, Nuclear Polyhedrosis Virus, Transmission, Artificial diet

บทนำ

หนอนไหม (Silkworm) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Bombyx mori* อยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Bombycidae เป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis insect) แบ่งออกเป็น 4 ระยะได้แก่ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และผีเสื้อ ซึ่งมีเพียงระยะตัวหนอนเท่านั้นที่กินอาหาร เมื่อถึงวัย 5 สารอาหารโดยเฉพาะโปรตีนเกือบทั้งหมดจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารที่จะชักใยทำรังหรือเส้นไหมนั่นเอง และถือเป็นเส้นใยที่มีคุณค่ามหาศาล (สถาบันวิจัยหม่อนไหม 2540) นอกจากการนำเส้นไหมไปใช้ประโยชน์ทางด้านแพรรักษ์แล้ว ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ไหมในด้านอื่นๆ อีกมากมายเช่น การนำหนอนไหมและดักแด้มาทำเครื่องสำอาง ในทางการแพทย์ กรดอะมิโนที่พบใน ไผโบรอินคือ ไกลซีน จะช่วยให้คลอเลสเทอรอล และระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ นอกจากนี้ไผโบรอินจากไหมยังมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นเครื่องมือเพื่อตรวจจับสารแอนติบอดี ซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรคมะเร็งและโรคเอดส์ได้ และนอกจากนี้ดักแด้ไหมยังสามารถนำไปเป็นแมลงอาศัยของเชื้อรา *Cordyceps* sp (สิริภักดิ์ และวันวิสาข์ 2552) ซึ่งราชชนิดนี้มีประโยชน์ในการผลิตยารักษาโรคเอดส์ได้ (ยอดหทัย และคณะ 2545)

การศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆของไหม รังไหม ดักแด้ไหม การนำไหมไปประยุกต์ใช้ในด้านการทำเครื่องสำอางโดยใช้กาไหมที่เรียกว่า เซรีซิน (sericin)ซึ่งได้จากเปลือกรังไหม และโปรตีนชนิดไผโบรอิน (fibroin) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไหมไทยพื้นเมืองพบว่ามีปริมาณเซรีซิน ที่สูงมากเมื่อเทียบกับไหมสายพันธุ์ต่างประเทศญี่ปุ่น (Kawakuchi, 1996) ดังนั้นไหมไทยพันธุ์พื้นเมืองจึงมีข้อได้เปรียบในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้ตามวัตถุประสงค์อื่นๆได้ดี เพื่อนำไปสู่การดำเนินงานศึกษาค้นคว้าวิจัยและพัฒนาประโยชน์จากไหม จะได้กระทำอย่างจริงจัง เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของไหมให้สูงขึ้นมากกว่าการนำไปทอเป็นผ้าไหมเพียงอย่างเดียว กอปรกับการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมได้ถือปฏิบัติกันอย่างหนาแน่นในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะจังหวัดมหาสารคาม (พรรณภา และชาญชัย 2540)

ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ปัญหาโรคของหนอนไหมและโรคที่สำคัญคือ โรคแกรสเซอร์รี่ (grassery) หรือที่เรียกตามภาษาพื้นบ้านว่าโรคเตื่อ โรคกระเที หรือ โรคตัวเหลือง เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมมากที่สุด การระบาดเกิดขึ้นอย่างรุนแรงในทุกรุ่นของการเลี้ยงไหม และพบได้ทุกฤดูกาล หนอนไหมที่ถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไวรัสชนิด *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV) นั้นจะตายตอนวัย 5 ซึ่งเป็นวัยที่จะสร้างรัง (ทำให้เกษตรกรเสียเวลาและแรงงานเลี้ยง

หนอนไหม นอกจากนี้ในบางรุ่นของการเลี้ยงไหมแทบจะไม่ได้ผลผลิตเลย (ทิพย์วดี และคณะ 2538) ความสำคัญของโรคก็คือ เชื้อ BmNPV ดังกล่าวปนเปื้อนมาจากไหนกล่าวคือ เนื่องจากหนอนไหมไม่แสดงอาการของโรคในระยะเริ่มแรก แต่จะระบาดอย่างรุนแรงในระยะการสร้างรังซึ่งเป็นผลผลิตที่สำคัญ ทำให้หนอนไหมตาย 70 -100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ BmNPV อาจมีการปนเปื้อนมากับใบหม่อน หรือ เป็นการติดเชื้อจากพ่อแม่สู่รุ่นลูก (transmission: horizontal หรือ vertical transmission) ซึ่งยังไม่มีรายงานการติดเชื้อ BmNPV ดังกล่าวในประเทศไทย

ถึงแม้ประเทศไทยมีการปลูกหม่อน เลี้ยงไหมมาช้านาน และมีองค์กรหรือหน่วยงานที่ดูแลรับผิดชอบงานด้านหม่อนไหม แต่จะเป็นในแง่ของการส่งเสริมการเลี้ยงไหมและยังคงเป็นการเลี้ยงไหมแบบดั้งเดิม แต่งานวิจัยที่เป็นงานวิจัยพื้นฐานที่จะเป็นองค์ความรู้ในงานวิชาการเชิงลึก ยังมีรายงานไม่มากนัก ดังนั้น การวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการติดเชื้อสาเหตุโรคแกรสเซอร์ และลักษณะการถ่ายทอดโรค โดยทำการเลี้ยงไหมด้วยอาหารเทียมภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ซึ่งสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ BmNPV จากปัจจัยภายนอก (โดยสูตรอาหารเทียมดังกล่าวได้วิจัยและพัฒนาโดยอาจารย์คณะวิทยาศาสตร์และนักวิจัยศูนย์ นวัตกรรมไหม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และอยู่ในระหว่างการดำเนินการขอจดสิทธิบัตร) โดยนำเทคนิคพีซีอาร์ที่มีความไวในการตรวจหาเชื้อ BmNPV ซึ่งจะทำให้เข้าใจองค์ความรู้ของการติดเชื้อ และการเกิดโรคแกรสเซอร์ ซึ่งจะสามารถตอบโจทย์ที่มาจากเชื้อ BmNPV ได้ชัดเจน เพื่อเป็นการควบคุมการป้องกันการระบาดของโรคได้ เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาการติดเชื้อ BmNPV สาเหตุโรคแกรสเซอร์ และการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสต่อระยะของหนอนไหม
2. ศึกษาลักษณะการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ในระยะหนอนไหม
3. นำเทคนิคพีซีอาร์มาตรวจเชื้อ BmNPV ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2537 ได้สำรวจความคิดเห็นเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม ในเขตจังหวัดมหาสารคาม พบว่าปัญหาและอุปสรรคต่อการเลี้ยงไหม ที่สำคัญที่สุดคือเรื่องโรคแการสเซอร์รี่ของไหม หรือโรคเตื่อ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ปัญหาในการเลี้ยงไหมที่สำคัญที่สุดในความคิดของเกษตรกร ในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม จังหวัดมหาสารคาม

หมู่บ้าน	โรคเตื่อ	ปัญหาอื่นๆ	ไม่มีปัญหา
วังยาว	93.3	6.7	-
หัน	90.0	3.3	-
หนองคอม	90.1	6.7	3.3
ดอนอีลุ่ม	76.7	10.0	13.3
ทุ่งบ่อ	70.0	10.0	20.0
โคกกุง	96.7	3.3	-
สำโรง	76.6	6.7	16.7
เลิงแฝก	70.0	23.3	6.7
หนองไฮน้อย	70.0	3.3	26.7
หนองโพน	76.7	20.0	3.3
หนองไผ่น้อย	83.4	13.0	3.3
หนองเสม็ด	76.7	-	23.3

ดงบัง	97.1	2.9	-
-------	------	-----	---

ที่มา : สถาบันวิจัยและพัฒนา มข. (2537)

Vanapruek *et al.* 1994. ได้ศึกษาการตรวจหาเชื้อ BmNPV โดยวิธี ELISA ซึ่งเป็นเทคนิคทางอิมมูโนวิทยาแต่วิธีการดังกล่าว มีข้อจำกัดที่สามารถตรวจได้เฉพาะอนุภาคไวรัสและผลึกโปรตีนของ BmNPV แต่ไม่สามารถตรวจพบในระดับ ดีเอ็นดี และไม่สามารถติดตามการติดเชื้อสาเหตุได้ จากการหนอนไหมมาตรวจด้วยวิธี ELISA พบการระบาดของโรคในทุกฤดูกาลเลี้ยงไหม

Kumprateang, 1998. ได้สำรวจการระบาดของโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม 13 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการใช้ ดี เอ็น เอ ตัวตรวจ (DNA probe) โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหนอนไหมวัย 1 2 3 4 และ 5 พบว่าหนอนไหมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์มีเชื้อไวรัสลงทำลาย หากมองอาการภายนอกของหนอนไหมจะไม่พบอาการของโรคเลย แต่เมื่อเกษตรกรทำการเลี้ยงไหมไม่ถูกต้อง และมีปัจจัยสภาพแวดล้อมภายนอกไม่เหมาะสมก็จะเกิดการระบาดของโรคทันที ซึ่งโรคแกรสเซอร์มีเชื้อสาเหตุชื่อ นิวเคลียร์โพลีฮีดรอสไวรัส (Nuclear Polyhedrosis Virus, NPV) ซึ่งเป็นไวรัสของแมลงใน subgroup A ของวงศ์ Baculoviridae (Matthews, 1982) แกรสเซอร์ไวรัสประกอบด้วย DNA เส้นคู่ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 85×10^6 daltons (Iatrou *et al.* 1985) เชื่อกันว่าไวรัสตัวนี้เป็นเชื้อที่หลบอยู่ในตัวหนอนไหม (occult virus) และอยู่ในลักษณะเฉื่อยไม่ทำให้เกิดโรค แต่สามารถทำให้เกิดโรคกับหนอนไหมได้ ถ้าไวรัสถูกกระตุ้นด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น hydrogen peroxide, potassium nitrate, hydroxylamine ด้วยความเย็นจัด ร้อนจัด หรือในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม (Himeno *et al.* 1973) เนื่องจากความสำคัญของโรคดังกล่าวได้สร้างความเสียหายแก่อุตสาหกรรมไหมเป็นอันมาก

เนื่องจากไวรัสอาจหลบอยู่ในตัวไหม ในลักษณะเป็นอนุภาคไวรัสโดยยังไม่มีการสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้ม ทำให้ไม่สามารถเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หรือเพิ่งเข้าติดเชื้อในระยะเริ่มแรกจึงเป็นเพียงดีเอ็นเอที่เชื้อไวรัสสร้างขึ้น จึงไม่สามารถตรวจโรคได้ด้วยเทคนิคการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิคทั่วไป จำเป็นต้องพัฒนาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ก่อนที่จะนำไขไหมที่ติดเชื้อไปเลี้ยง ซึ่งวิธีการดังกล่าวต้องมีความไว (sensitive) ในการตรวจหาไวรัสดังกล่าว โดยเฉพาะเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) โดยเฉพาะเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction)

สิริภักดิ์ และคณะ 2548. วิจัยการเกิดโรคแกรสเซอร์ซึ่งมี *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus (BmNPV) เป็นไวรัสสาเหตุโรค ศึกษาความต้านทานต่อโรคแกรสเซอร์ในไหมพันธุ์นางลาย โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมและใบหม่อน ผสมสารแขวนลอย เชื้อ BmNPV ที่ความเข้มข้น 10^3 PIBs/ml ให้หนอนไหมทั้งสองกลุ่ม โดยวิธีการกิน ในหนอนไหมวัยที่ 3 พบอัตราการเลี้ยงรอดของหนอนไหม (วัย 1-5) ในกลุ่มหนอนไหมที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม เท่ากับ 91 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักหนอนไหมวัย 5 เท่ากับ 1.46 กรัม อัตราการเข้าทำรัง เท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักรังสดเท่ากับ 1.40 กรัม น้ำหนักหนอนไหมวัย 5 เท่ากับ 1.51 กรัม อัตราการเข้าทำรังเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ และน้ำหนักรังสดเท่ากับ 1.39 กรัม ส่วนกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมอย่างเดียวพบอัตราการเลี้ยงรอด 93 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเข้าทำรังเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ส่วนหนอนไหมที่เลี้ยงด้วยใบหม่อนพบอัตราการเลี้ยงรอดเท่ากับ 81 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเข้าทำรังต่ำ คือ 61 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาพบว่าหนอนไหมที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม มีความสามารถในการต้านทานต่อการเกิดโรคแกรสเซอร์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงไหมด้วยใบหม่อน

มัลลิกา และคณะ 2552. พัฒนาการตรวจสอบเชื้อ BmNPV ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี วิธีที่ 1 ดัดแปลงจากวิธี สกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในเซลล์แมลง วิธีที่ 2 ดัดแปลงมาจากวิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ พบว่าทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหนอนไหมได้ โดยวิธีที่ 1 ใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอ 48 ชั่วโมง 36 นาที ส่วนวิธีที่ 2 ใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอไม่เกิน 30 นาที เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อ BmNPV ในตัวหนอนไหมด้วยการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างเปลือกโปรตีนของไวรัส (*polh* gene) ในเลือดหนอนไหมด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อ BmNPV ในหนอนไหมหลังจากได้รับเชื้อไปแล้ว 3 วัน เมื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 1 และตรวจสอบเชื้อ BmNPV ด้วยเทคนิค PCR ต้องใช้เวลาในการดำเนินการทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 3 วัน แต่ถ้าสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 2 จะใช้เวลาในการตรวจสอบทั้งสิ้นเพียง 5 ชั่วโมง เทคนิค PCR จึงเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพเหมาะจะนำมาพัฒนาใช้ในการตรวจสอบโรคแกรสเซอร์ของไหม เพื่อป้องกันการระบาดของโรคนี้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหม

Jiaping et al. 2012 ได้ศึกษาลำดับเบสของ BmNPV สาเหตุของโรคแกรสเซอร์ที่พบในหนอนไหมไทย โดยทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีนที่เป็นอนุภาคคือ จาก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ T3 จากญี่ปุ่น CD และ CQ1 จากจีน และ SC7 จากฝรั่งเศส พบว่า BmNPV สายพันธุ์จากประเทศไทย มียีน *bro* แตกต่างจาก BmNPV ทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าว โดยพบว่าที่เพียงส่วนของ *bro-a*, *bro-c* และ *bro-d* แต่ไม่พบ *bro-b*, *bro-e* เหมือน สาย

พันธุ์จากจีน ญี่ปุ่น และฝรั่งเศส และจากการศึกษาลักษณะวิวัฒนาการของ BmNPV โดยการวิเคราะห์ไฟโลจีนิติกของยีน *bro* จากทั้ง 5 สายพันธุ์นั้น สภาพภูมิประเทศไม่มีผลต่อความแตกต่างของยีน *bro*

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์ในหมู่บ้านที่เกษตรกรทำการเลี้ยงไหม

ออกสำรวจการเกิดโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหม ตามหมู่บ้านที่เกษตรกรทำการเลี้ยงไหม ในเขตพื้นที่ จังหวัดมหาสารคาม ในเขตหมู่บ้านรอบๆ อำเภอเมืองมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย อำเภอเชียงยืน อำเภอบรบือ อำเภอพยัคภูมิพิสัย เป็นต้น

เมื่อพบอาการหนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์ หรือโรคเต๋อ ดังกล่าว นำหนอนไหมที่เป็นโรคใส่ขวดพลาสติก เพื่อนำกลับมาแยกเชื้อ BmNPV ให้บริสุทธิ์ ในห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. การเตรียมเชื้อไวรัส BmNPV

นำหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์มาแยกเชื้อ BmNPV ในห้องปฏิบัติการนำหนอนไหมที่เป็นโรคจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม โดยการบดหนอนไหมที่เป็นโรค แล้วกรองผ่านสำลี 2-3 ชั้น ในกรวยกรอง ทำการเก็บสารแขวนลอยไวรัส และทำการเพิ่มปริมาณเชื้อโดยการผสมสารแขวนลอยเชื้อนิวคลีโอโพลีอีโตรีซิสไวรัส ที่แยกได้จากหนอนไหมผสมลงในใบหม่อนให้หนอนไหมกิน เมื่อหนอนไหมแสดงอาการของโรค โดยมีลำตัวหนอนไหมบวมและผิวหนังเต่ง ใช้กรรไกรตัดขาเทียมหนอนไหม แล้วนำหนอนไหมที่มีผลึกโปรตีน (Polyhedra Inclusion Bodies: PIBs) จำนวนมากและภายในผลึกโปรตีนมีอนุภาคไวรัสบรรจุอยู่จำนวนมาก และภายในผลึกโปรตีนมีอนุภาคไวรัสบรรจุอยู่ ทำการตรวจดูลักษณะของผลึกโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และ/ หรือ 40X ทำการนับจำนวนผลึกโปรตีนด้วยเครื่องนับ (counter chamber หรือ haemocytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X เพื่อหาความเข้มข้นของเชื้อ BmNPV-polyhedra เก็บไว้สำหรับการเจือจางในระดับความเข้มข้นต่างๆของการทดลอง

3. การเลี้ยงหนอนไหมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

ทำการเลี้ยงหนอนไหมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) โดยเลี้ยงในอาหารเทียม ในการทดลองนี้ ได้ใช้ไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน พันธุ์นางลาย นำไข่ไหมไปกกและทำการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์กับเปลือกไข่ไหม หรือเรียก Disinfection ตามวิธีการของ สิริภักและคณะ (2545) โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติ คือ

1. นำไข่ไหมพันธุ์นางลายไปกกที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ประมาณ 5-7 วัน

2. สังเกตสีของไข่ไหม เมื่อไข่ไหมเปลี่ยนสีดำหรือน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไข่ไหมใกล้จะฟักออกเป็นตัว นำไข่ไหมมาทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่ โดยปฏิบัติในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) ตามขั้นตอน ดังนี้

2.1 จุ่มไข่ไหมด้วยฟอร์มาลิน 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที

2.2 ย้ายไข่ไหมมาแช่ใน แอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที

2.3 ย้ายไข่ไหมมาแช่ใน แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 1 นาที

2.4 ย้ายไข่ไหมมาแช่ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1 นาที

2.5 ทำให้ไข่ไหมแห้งใน Laminar flow เมื่อไข่ไหมแห้งแล้ว นำไข่ไหมกลับไปกกที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ตามเดิม รอจนกระทั่งไข่ไหมฟักออกเป็นตัวจึงนำไปเลี้ยงตามปกติ วิธีการดังกล่าวจะช่วยลดปัญหาการติดเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคในหนอนไหม กรณีที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่ได้

4. การเตรียมอาหารเทียมสูตรพัฒนา และการเลี้ยงหนอนไหมภายใต้เทคนิคปลอดเชื้อ

4.1 องค์ประกอบของอาหารเทียม

1. ผงไหม่อนแห้ง เตรียมจากไหม่อนสดที่ผ่านการอบแห้งแล้ว นำมาบดเป็นผงที่มีความละเอียดขนาด 0.1-0.25 มิลลิเมตร
2. ผงเซลลูโลส เตรียมจากกระดาษเยื่อไม้ไฟ โดยการบดให้เป็นผงที่มีขนาด 0.25 มิลลิเมตร
3. ถั่วเขียวสด เตรียมโดยการแช่ถั่วเขียวข้ามคืน 1 คืนแล้วทำการบดให้ละเอียดในเครื่องบดแบบเปียก
4. กลุ่มสารอินทรีย์ ได้แก่ แป้งข้าวโพด (corn starch), น้ำตาล (sucrose) (เป็นชนิด reagent grade), sorbic acid, crotonic acid, L – ascorbic acid, citric acid กลุ่มวิตามิน ได้แก่ D-calcium pantothenate, pyridoxine, nicotinamide, 8-hydroxyquinolinol sulfate
5. กลุ่มเกลือแร่ ได้แก่ manganese sulfate, iron (III) phosphate *n* hydrate, magnesium sulfate, potassium chloride, calcium carbonate, potassium phosphate

สูตรอาหารเทียม CU-MSU1

เตรียมโดยการละลายองค์ประกอบรวมหนัก 1 กิโลกรัม ในปริมาตรน้ำ 1.6 ลิตร

ผงใบหม่อนแห้ง (Mulberry leaves powder)	40%
ถั่วเขียวสด (Fresh mung bean)	41%
ผงเซลลูโลส (cellulose powder)	10%
Mix powder 1	3%
Mix powder 2	2%
Mix powder 3	4 %

mix powder 1 ประกอบด้วย

inositol	61.86 g
D-calcium pentothenate	3.06 g
Vitamin B complex	0.63 g
Nicotinamide	1.98 g
8- quinolinol sulfate	15.27 g
Chloramphenical	6.06 g
Gallic acid monohydrate	150.6 g
Corn starch	150.3 g

mix powder 2 ประกอบด้วย

Manganese sulfate	0.6	g
Iron (III) phosphate <i>n</i> hydrate	4.5	g
Magnesium sulfate	27	g
Potassium chloride	36	g
Calcium carbonate	63	g
Potassium dihydrogen phosphate	93	g

mix powder 3 ประกอบด้วย

crotonic acid	4	g
L-ascorbic acid	15	g
Citric acid	20	g
เตรียม 10 เท่า		

4.2 การเตรียมอาหารเทียม

วัสดุที่ใช้ในการเตรียมอาหารเทียม



ผงหม่อน



ผงเซลลูโลส



ถั่วเขียวสด



สารอินทรีย์ วิตามิน แร่ธาตุ และสารกันบูด

1. ทำการแช่ถั่วเขียวข้ามคืน 1 คืน แล้วทำการบดให้ละเอียดในเครื่องปั่นน้ำผลไม้
2. ผสมส่วนต่างๆ ของสูตรอาหารที่ซั่งแล้วตามองค์ประกอบในแต่ละสูตร ลงในเครื่องผสมอาหาร เทียมจนผสมรวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน
3. . เมื่อผสมส่วนประกอบของอาหารเทียมครบแล้ว นำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว



ลักษณะของอาหารเทียมเมื่อผสมองค์ประกอบครบถ้วน

5. นำอาหารเทียมที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ในกล่องพลาสติก ปริมาณ 100 กรัม ต่อหนอนไหม 200 ตัว ทำการเกลี่ยอาหารเทียมในลักษณะร่วนให้กระจายทั่วพื้นภาชนะ นำไข่ไหมที่ฟักออกเป็นตัวระยะที่ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยวิธี disinfection ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ใส่ลงในกล่องพลาสติกที่มีอาหารเทียมอยู่ หลังจากนั้นนำกล่องพลาสติก ที่ปิดฝาให้สนิทไปเก็บในสภาวะอุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อหนอนไหมเป็นระยะการเจริญเติบโต เป็นวัย 2 3 4 และ 5 ทำการสุมหนอนไหมแต่ละระยะ เพื่อเก็บไว้เป็นหนอนไหมกลุ่มปลอดโรคแกรสเซอร์ (healthy silkworm) และเพื่อเป็นกลุ่มควบคุม

5. การให้เชื้อ BmNPV กับหนอนไหม

ทำการให้เชื้อ BmNPV กับหนอนไหมพันธุ์นางลายในระยะวัยที่ 3 ที่ความเข้มข้น 10^5 PIBs/ml ทำการเลี้ยงหนอนไหมด้วยใบหม่อน จนกระทั่งหนอนไหมแสดงอาการของโรคแกรสเซอร์ และทำการเลี้ยงไหมที่รอดตายจากโรค จนกระทั่งถึงระยะตัวเต็มวัย หลังจากแม่ผีเสื้อวางไข่ นำไข่ไหมมาผ่านกรรมวิธี Disinfection ตามวิธีการของ สิริภักและคณะ (2547) หลังจากนั้น นำหนอนไหมแรกฟักระยะที่ 1 ไปเลี้ยงบนอาหารเทียมสูตรดังกล่าว ที่ปิดฝาให้สนิทไปเก็บในสภาวะอุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อหนอนไหมมีพัฒนาการ การเจริญเติบโต เป็นวัย 2 3 4 และ 5 ทำการสุมหนอนไหมแต่ละระยะมาตรวจหาเชื้อ BmNPV ด้วยวิธีพีซีอาร์

6. ศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมด้วยวิธีพีซีอาร์

6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากหนอนไหม

โดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหนอนไหม ระยะไข่ หนอนไหมวัย 1 2 3 4 5 ดักแด้ และผีเสื้อ มาตรวจ โดยการทำการสกัดดีเอ็นเอ จาก BmNPV โดยการทำให้ DNA extraction แบบ mini preparation โดยนำ หนอนไหม 0.5 กรัม บดด้วยสารละลาย lysis buffer 200 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนสารละลายน้ำใส แล้วเติม 1/10 Abs.ETOH + sodium acetate นำไปแช่ที่ อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส นำกลับมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 rpm นาน 20 นาที แล้วจึงทำ ตะกอนให้แห้งภายใต้ laminar flow หลังจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวด เชื้อ เก็บไว้สำหรับ ตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ ในทำนองเดียวกัน ในการเตรียมตัวอย่างในไข่ไหม ก็นำมาบดด้วยวิธีการเดียวกับใน หนอนไหม

6.2 การออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ไพรเมอร์

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับตรวจหาเชื้อ BmNPV จาก GenBank โดยใช้โปรแกรม คอมพิวเตอร์จากการคำนวณหาความเหมาะสมต่างๆ จึงได้ ไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BmNPV จาก ยีนที่ควบคุมการจำตัวดีเอ็นเอเริ่มแรก (immediately early-1) หรือ ยีน *ie-1* จากธนาคารยีนหมายเลข X58442 (GenBank Accession No.X58442, Huybrechts *et al.* 1992) ขนาดความยาว 28 bps หรือ 28 เมอร์ ดังนั้นคือ forward primer – 5'- CCAAACGCATATGACGCAAATTAATTTT-3' และ reverse primer – 5'-TTGTTAAATTGGGCCACACACTTTGT-3' โดยจะได้ผลิตภัณฑ์ของยีนขนาด 473 bp โดยมีค่า เปอร์เซ็นต์ G+C content เท่ากับ 55.6%, melting temperature เท่ากับ 47°C ความเฉพาะเจาะจง (specificity) ต่อ BmNPV-DNA และมีขนาดของ PCR product ขนาด 1.2 kb หลังจากส่งลำดับเบสเหล่านี้ ไปสังเคราะห์แล้วจึงนำมาคำนวณหาความเข้มข้น และปรับสภาพที่เหมาะสมของวิธีพีซีอาร์ในการตรวจ เชื้อ BmNPV จากการทดลองหาปรับสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยาเพิ่มขยาย(amplification) ซึ่งเกิดขึ้น โดยขบวนการหลัก 3 ขั้นตอน จะต้องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาตามที่กำหนด โดยอาศัยเครื่องอัตโนมัติ Programmable DNA Thermal Cycle หรือที่เรียก เครื่อง PCR สำหรับตรวจ BmNPV สาเหตุโรคแกรส เซอร์ ดังนี้

Denaturation 94 °C เป็นเวลา 5 นาที

1 รอบ

Denaturation 94 °C เป็นเวลา 2 นาที

Annealing 47 °C เป็นเวลา 2 นาที

Extension 72 °C เป็นเวลา 2 นาที

35 รอบ

Extension 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

สำหรับปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมในการตรวจโรคแกรสเซอร์หนอนไหมเป็นดังนี้คือ

PCR reaction

100 µl

.....

dH₂O

68 µl

10X PCR buffer

10 µl

MgCl₂

10 µl

10mMdNTP

4 µl

Primer # 1 (10 pmol/µl)

3 µl

Primer #2 (10 pmol/µl)

3 µl

Taq polymerase

1 µl

Template (BmNPV-DNA)

1 µl

6.3 การวิเคราะห์ผลด้วยการเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส(agarose gel electrophoresis) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพีซีอาร์ นำมาวิเคราะห์ผลการตรวจหาเชื้อ BmNPV-DNA ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย TBE buffer แล้วนำมาย้อมสีด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ เพื่อวิเคราะห์ แถบของ BmNPV-DNA product ที่ปรากฏโดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลของ λ Hind III marker

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. ลักษณะของเชื้อ *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus (BmNPV)

ผลการออกสำรวจการเกิดโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมจากเกษตรกรที่ทำการเลี้ยงไหมในเขตอำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม พบลักษณะภายนอกของหนอนไหมที่เกิดโรคแกรสเซอร์กล่าวคือ หนอนไหมวัย 4 ตอนปลายที่ติดเชื้อ BmNPV เริ่มมีอาการไต่ไปมา และไต่ขึ้นตามขอบกระดัง หรือไต่ตามที่สูงของภาชนะที่เลี้ยง กินอาหารได้น้อยลง ลำตัวสีเหลือง ใส เมื่อสัมผัสลำตัวจะเปราะบาง แตก มีของเหลวสีเหลืองหรือขาวขุ่น ที่เรียก hemolymph ของแมลงไหลออกมา (รูปที่1) ซึ่งภายในของเหลวมีผลึกโปรตีนของไวรัสเป็นจำนวนมาก และปนเปื้อนกับใบหม่อน จึงทำหนอนที่อยู่ในกระดังเดียวได้รับเชื้อและติดต่อกันไปเรื่อยๆ พบการระบาดของโรคในเกือบทุกรอบที่ทำการเลี้ยงไหม (kumpratueang,1998; พรรณภาและชาญชัย 2540)



ก

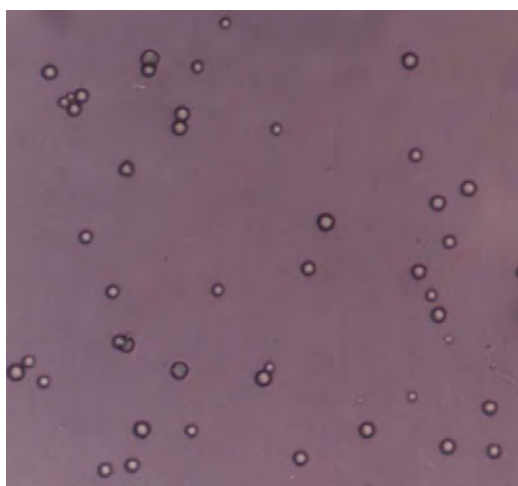


ข

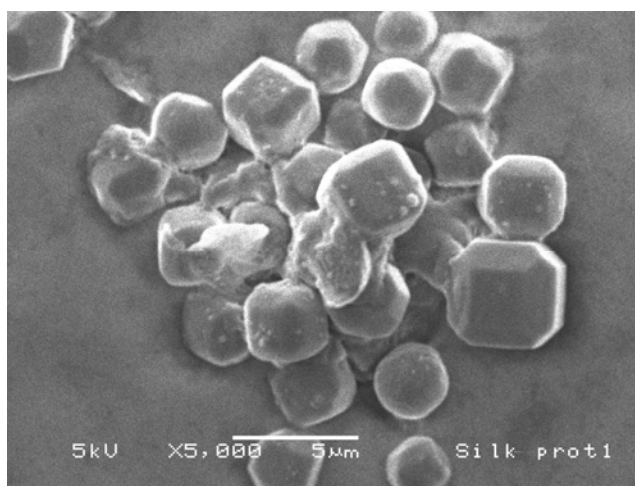
รูปที่ 1 ลักษณะของหนอนไหมที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์ในวัย5

- (ก) ซึ่งเป็นอาการที่รุนแรงปล่อยของเหลวสีเหลืองออกมาซึ่งมีผลึกโปรตีนอยู่จำนวนมาก
ตัวหนอนไหมสีเหลือง
- (ข) หนอนไหมปกติ

นำหนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์มาทำการแยก BmNPV ที่ห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เมื่อศึกษาลักษณะของผลึกโปรตีน (polyhedra inclusion bodies) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบลักษณะผลึกโปรตีน กลมๆ เป็นเม็ดเล็กๆ เป็นจำนวนมากกระจายในของเหลว hemolymph และไม่มีการปนเปื้อนแต่อย่างใด เมื่อทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีนที่ชัดเจนขึ้นโดยใช้กล้องสแกนนิ่งอิเล็กตรอน (scanning electron microscope หรือ SEM) พบผลึกโปรตีนเป็นเหลี่ยม หลายเหลี่ยม ตั้งแต่ 6 เหลี่ยม และ 8 เหลี่ยม และบางผลึกจะมีรูปร่างเป็นทรงกลม (รูปที่ 2) ในขณะที่พื้นที่จะมีลักษณะกลมมากกว่าเป็นเหลี่ยม (กรมวิชาการเกษตร 2540)



ก



ข

รูปที่ 2 ลักษณะของผลึกโปรตีน (polyhedra inclusion bodies) ในหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์

(ก) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า

(ข) ภายใต้กล้องแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM)

2.การเลี้ยงหนอนไหมด้วยอาหารเทียมโดยเทคนิคปลอดเชื้อ

ทำการเลี้ยงหนอนไหมที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือไหมพันธุ์นางลาย เป็นไหมที่สามารถฟักออกได้ตลอดปีตามธรรมชาติ ด้วยอาหารเทียมสูตร CU-MSU2 (อยู่ในระหว่างรอรับการจดสิทธิบัตร เลขที่คำขอ 0901001253) ซึ่งเป็นอาหารเทียมสูตรพัฒนา ถือเป็นเทคโนโลยีการเลี้ยงไหมแบบใหม่ ที่มีการนำเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) มาใช้ พบว่า การเลี้ยงไหมด้วยอาหารเทียม หนอนไหมมีการเจริญเติบโตได้ดี ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรคจากภายนอกและในอาหารเทียมแต่อย่างใด ลักษณะไข่ไหมแรกฟักจะมีสีเหลืองอ่อนหรือครีม เมื่อนำไปกก ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซนเซียส เมื่อไข่เริ่มฟัก จะเปลี่ยนเป็นสีม่วงหลังจากทำการฆ่าเชื้อโรคที่ปนเปื้อนแล้วจึงนำไปกกต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 2 วัน ไข่ไหมจึงฟักออกเป็นตัว และอัตราการฟัก เท่ากับ 99.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากหนอนไหมฟักออกเป็นตัวอ่อนประมาณ 24 ชั่วโมงจึงนำไปเลี้ยงในอาหารเทียมที่เตรียมไว้ในกล่องพลาสติก ทำการเปลี่ยนอาหารเทียม 2 ครั้งตลอดวงจรชีวิตของหนอนไหม คือ ครั้งแรกลงอาหารเทียมช่วงที่แรกฟัก คือวัย 1 ถึง วัย 3 จะอยู่ในกล่องพลาสติก (รูปที่ 3) และ ย้ายหนอนไหมลงอาหารเทียมใหม่อีกในช่วงวัย 4 ถึง วัย 5 ซึ่งเป็นระยะที่หนอนไหมกินอาหารมากวงจรชีวิตของไหมที่เลี้ยงในอาหารเทียมจะใช้เวลามากกว่าการเลี้ยงด้วยใบหม่อนประมาณ 5-6 วัน กล่าวคือ ระยะไข่ 11 วัน จึงฟักออกเป็นตัวหนอนวัย 1 วัย 1 ใช้เวลา 5 วัน วัย 2 ใช้เวลา 4 วัน วัย 3 ใช้เวลา 5 วัน วัย 4 ใช้เวลา 7 วัน และ วัย 5 ใช้เวลา 7 วัน ส่วนระยะดักแด้ นั้น ใช้เวลา 10 วัน จึงมีการพัฒนาเป็นผีเสื้อ ซึ่งระยะนี้จะไม่มีการกินอาหารแต่อย่างใด



ก



ข



ค

รูปที่ 3 การเลี้ยงไหมพันธุ์นางลายแบบเทคนิคปลอดเชื้อซึ่งเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสูตร CU-MSU1

(ก) ไช้ไหมหลังจากการทำการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมากับเปลือกไข่ไหม

(ข) นำเลี้ยงไหมแรกพัก วัย 1 - วัย 3 ในกล่องพลาสติก

(ค) ทำการเปลี่ยนอาหารเทียมเมื่อหนอนไหมพัฒนาเป็นวัย 4

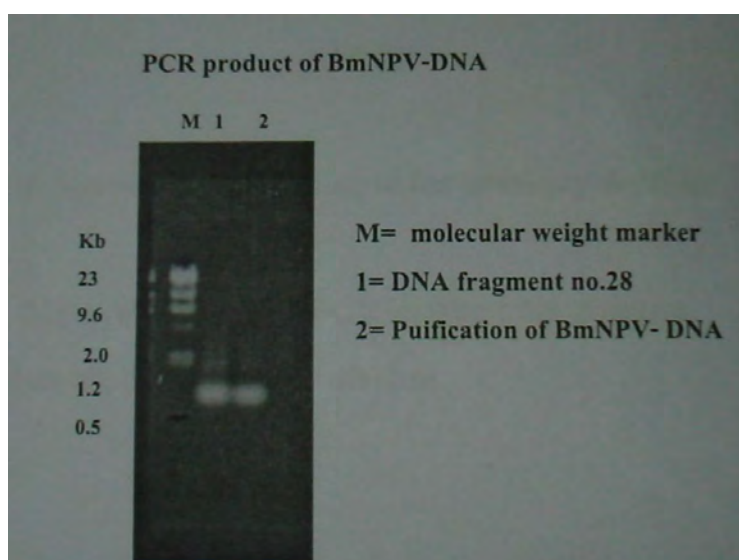
หลังจากผีเสื้อผสมพันธุ์ และวางไข่ ผีเสื้อตายภายใน 5 วัน พบอัตราการเลี้ยงรอดของหนอนไหม จากวัย1- ผีเสื้อ เท่ากับ 96 เปอร์เซ็นต์ อัตราการวางไข่ต่อแม่ผีเสื้อ 1 ตัว เฉลี่ย 411 ฟอง

เมื่อนำไปทดสอบให้ BmNPV ความเข้มข้นที่ 10^5 PIBs/ml กับหนอนไหมวัย 3 ในรุ่นที่ 2 ที่เลี้ยงในอาหารเทียม นั้นพบเปอร์เซ็นต์การเลี้ยงรอด จากวัย1 ถึง ระยะผีเสื้อ เท่ากับ 41 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผีเสื้อวางไข่ นำไข่ไหมไปกกและเลี้ยงไหมในรุ่นที่3 ด้วยอาหารเทียมและเทคนิคปลอดเชื้อ โดยที่ไม่มีการให้เชื้อ BmNPV อีก สุ่มไหม แต่ละระยะ กล่าวคือ ระยะไข่ วัย1 วัย 5 ระยะดักแด่ และผีเสื้อ มาตรวจการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์

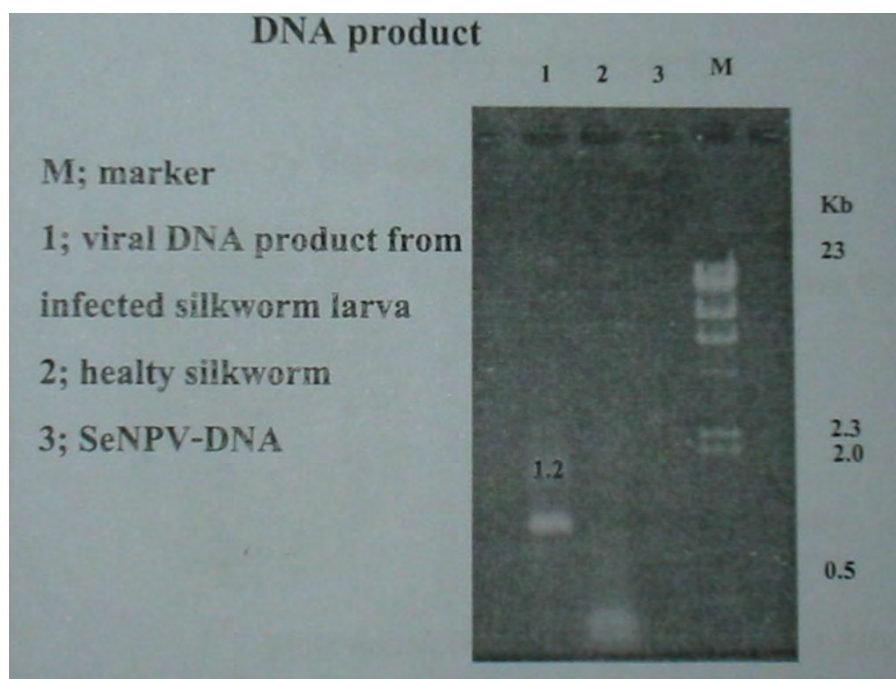
3.การตรวจ BmNPV โดยวิธีพีซีอาร์

3.1 การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์

เมื่อทดสอบหาความจำเพาะต่อ ไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ กับ BmNPV-DNA แล้ววิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจล อิเลคโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไพรเมอร์ ที่ออกแบบจากส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ BmNPV สามารถเพิ่มปริมาณยีนหรือส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment) ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 1.2 กิโลเบส (รูปที่4) และไพรเมอร์มีความจำเพาะ(specificity) ต่อ BmNPV-DNA จากหนอนไหมเท่านั้นเมื่อ (รูปที่5)



รูปที่ 4 agarose gel electrophoresis วิเคราะห์ผลการทดสอบไพรเมอร์สามารถตรวจเชื้อ BmNPV-DNA (lane1 และ 2)



รูปที่ 5. Agarose gel electrophoresis วิเคราะห์ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อเชื้อ BmNPV จากหนอนไหม (lane 1) และไม่ตรวจได้ในหนอนไหมที่ปลอดโรค (lane 2) เมื่อเทียบกับ SeNPV-DNA จากหนอนกระทู้หอม (lane 3) โดยมี λ Hind III เป็นน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบ

ศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมด้วยวิธีพีซีอาร์

เมื่อออกแบบไพรเมอร์ สำหรับตรวจหา BmNPV และสามารถปรับสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว จึงนำมาใช้ในการตรวจเชื้อ BmNPV เพื่อศึกษาการถ่ายทอดโรคดังกล่าว โดยการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อของหนอนไหมที่ถูกให้เชื้อ BmNPV โดยการสกัดดีเอ็นเอ แบบ miniprepation ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอ นี้ได้พัฒนาจากการสกัดดีเอ็นเอสาเหตุโรคพืช (พิสวรรณ 2536) หลังจากสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ผลโดยการอ่านค่าแถบ(band) ของดีเอ็นเอ ที่ปรากฏเมื่อย้อม อะกาโรสเจลด้วยเอทธิเดียม โบรไมด์ และส่องดูด้วยแสงยูวี (uv transilluminator) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 ศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ โดยการตรวจเชื้อ BmNPV-DNA ที่สกัดจากหนอนวัย 1 (lane 3) หนอนไหมวัย 2 วัย ถึง วัย 5 (lane 4 ถึง lane 7) จากดักแด้ (lane 8) จาก ผีเสื้อ (lane 9) จากไข่ (lane 10) ส่วน (lane 1 และ 2) คือ BmNPV-DNA ควบคุม

จากการศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมโดยการตรวจหาเชื้อ BmNPV-DNA จาก หนอนไหม ในระยะไข่ ระยะหนอนไหมวัย 1 2 3 4 5 ระยะดักแด้ และระยะผีเสื้อ ซึ่งตัวอย่างไหมเหล่านี้ได้ จากการเลี้ยงไหมรุ่นที่ 3 โดยการเลี้ยงแบบเทคนิคปลอดเชื้อ และเลี้ยงในอาหารเทียม ซึ่งเป็นการควบคุม ปัจจัยภายนอกที่จะเข้ามาก่อให้เกิดการปนเปื้อนหรือการติดเชื้อ BmNPV จากภายนอกได้ ดังนั้นเมื่อทำการ

ตรวจพบเชื้อนี้ในหนอนไหมรุ่นที่ 3 ที่รอดจากการที่รุ่นพ่อแม่ ของไหมได้รับเชื้อ ก็เพื่อเป็นการศึกษาถึงว่าเชื้อ BmNPV สาเหตุโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหม สามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูก

จากการทดลองพบเชื้อ BmNPV –DNA ใน วัย 2 วัย 4 ระยะดักแด้และผีเสื้อ ไหมวัย1 วัย 3 และวัย 5 ไม่พบเชื้อ BmNPV-DNA รวมทั้งไม่พบในระยะไข่ไหม ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจาก ไข่ไหมมีปริมาณเชื้อไวรัส ที่น้อยมากจึงตรวจไม่พบ แต่สามารถตรวจพบในวัยที่2 และ 4 ส่วนหนอนไหมวัย 1 3 และ 5 ไม่พบเชื้อBmNPV เนื่องจากไหมเป็นแมลงที่ออกลูกเป็นไข่ประมาณ 300-400 ฟอง จึงมีโอกาที่จะตรวจไม่พบในทุกฟอง เนื่องจากการทดลองนี้ เป็นการสุ่มตรวจตัวอย่างหนอนไหม มา ในแต่ละวัย ซึ่งไม่ใช่หนอนตัวเดียวกัน ซึ่งมีโอกาที่จะตรวจพบในบางตัวเพราะจะมีบางตัวที่ตรวจพบเชื้อ และบางตัวไม่ได้รับเชื้อ จึงทำให้ตรวจไม่พบเชื้อ BmNPV ถึงแม้จะมาจากแม่ผีเสื้อตัวเดียวกัน การถ่ายทอดโรคดังกล่าวเป็นไปได้ทั้งกรณีที่เกิดการปนเปื้อนกับเปลือกไข่ (transovum transmission) และการถ่ายทอดโรคจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูกได้โดยผ่านทางตัวอ่อน(transovarian transmission) (Tazima,2001) หากเกิดการถ่ายทอดโรคแบบแรกที่เกิดการปนเปื้อนกับเปลือกไข่ เราก็สามารถที่จะทำความสะอาด โดยใช้น้ำยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทำความสะอาดภายนอกเปลือกไข่ไหมได้ แต่หากกรณีที่เกิดการติดเชื้อมาจากพ่อแม่ สู่ตัวอ่อน(embryo) ของไหมรุ่นลูก เป็นการยากที่จะทำความสะอาดโดยการฆ่าเชื้อที่เปลือกไข่ไหมได้ จำต้องมีวิธีการที่ดีกว่านี้ ซึ่งก็คือการใช้วิธีการตรวจเชื้อBmNPV เริ่มแรก หรือการตรวจในระยะเริ่มต้นนั่นเอง ซึ่งในการทดลองนี้สามารถนำวิธีการตรวจหาเชื้อBmNPV โดยวิธีพีซีอาร์ได้ดี

จากการศึกษาการถ่ายทอดและตรวจหาโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหม โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ ได้ทำการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์จาก nucleotide sequence ของเชื้อ BmNPV-DNA จาก GenBank ในครั้งนี้พบว่าไพรเมอร์สามารถนำมาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัส BmNPV จากหนอนไหมได้ ถึงแม้จะตรวจไม่พบในทุกระยะของไหม ทั้งนี้อาจจะเป็นไปได้ว่าการถ่ายทอดเชื้อโรคนี้สามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่สู่รุ่นลูกได้ แต่เนื่องจากไหมมีการวางไข่เป็นกลุ่ม และการสุ่มเก็บตัวอย่างแมลงมาตรวจ อาจจะมีบางตัวของไหม ที่ไม่ได้รับเชื้อ หรือได้รับในปริมาณที่น้อยมาก หรือในระยะเริ่มต้น จึงไม่สามารถตรวจพบ อย่างไรก็ตาม ในการสุ่มตัวอย่างหนอนไหมมาเตรียมสกัด ดีเอ็นเอ ในครั้งนี้ เนื่องจากผู้วิจัยได้สุ่มหนอนไหมมาเพียง 1 ตัว และ นำชิ้นเนื้อของหนอนไหมมาเพียง 0.5 กรัม ซึ่งก็เป็นไปได้ว่าเชื้อBmNPV นี้ น่าจะเข้าทำลายหนอนไหมในระยะเริ่มแรก ซึ่งเข้าไปแอบแฝงอยู่ในตัวไหม เพียงปริมาณที่น้อย และยังจำกัดบริเวณ หากว่าการสุ่มตัวหนอน และตัดชิ้นส่วนหนอนไหมตรงบริเวณที่เชื้อยังไม่กระจายตัวก็อาจจะทำตรวจไม่พบเชื้อBmNPV ได้

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากหนอนไหม มีการเจริญ และอยู่กันเป็นกลุ่มประชากร รวมถึงพฤติกรรมการกินอาหารเป็นกลุ่ม และแม่ผีเสื้อวางไข่ ประมาณ 300-400 ฟอง เมื่อตรวจพบเชื้อโรคแกรสเซอร์จากหนอนไหมที่มาจากพ่อแม่ ก็ไม่ควรนำหนอนไหมกลุ่มนี้มาเลี้ยง เพราะหนอนไหมเพียง 1 ตัว ที่ได้รับเชื้อดังกล่าวมีโอกาสที่จะเกิดการติดเชื้อ หรือการแพร่ระบาดในกลุ่มประชากรไหมเป็นไปได้นาน ดังนั้นจึงไม่ควรนำไหมกลุ่มนั้น มาเลี้ยงอีกต่อไป ควรมีการกำจัด หรือทิ้งไข่ไหม หรือพันธุ์เหล่านั้นไป เพื่อป้องกัน ไม่ให้เกิดการระบาดของโรคแกรสเซอร์ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหม หรือในเกษตรกรต่อไป

การศึกษาการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ครั้งต่อไป ควรจะต้องทำการศึกษาและหาวิธีที่จะติดตามเชื้อ BmNPV ในหนอนไหม ไปได้ทุกระยะ และจำกัดอยู่กับหนอนไหม ภายในตัวหนอนไหม 1 ตัวไปจนตลอดวงจรชีวิตและมีการติดตามยืนยันโดยการติดฉลาก (marker gene) ไปแต่ละวงจรชีวิตของไหม ทั้งนี้เพื่อจะได้เป็นการติดตามการถ่ายทอดโรคแกรสเซอร์ได้อย่างแท้จริง

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการถ่ายทอดโรคแกลสเซอร์ในหนอนไหมและการตรวจหาเชื้อ BmNPV ในหนอนไหมด้วยเทคนิคพีซีอาร์นี้ พบว่า

ลักษณะของผลึกโปรตีนของเชื้อ BmNPV ที่แยกได้จากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม ในเขต อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม มีลักษณะเป็นรูปกลมๆ คล้ายเม็ดสาคุ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า เมื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM จะพบลักษณะเป็นเหลี่ยม ตั้งแต่ 6-8 เหลี่ยม และรูปร่างทรงกลม ภายในผลึกโปรตีนประกอบด้วย อนุภาคไวรัส

การเลี้ยงไหมด้วยอาหารเทียม โดยเทคนิคปลอดเชื้อ สามารถนำมาเลี้ยงไหมไทยได้ และเหมาะที่จะนำมาทำเลี้ยงไหมในงานวิจัย เพราะสามารถแก้ปัญหาการปนเปื้อนโรคจากปัจจัยภายนอกๆได้ วงชีวิตของหนอนไหมพันธุ์นาง x 108 จะมีอายุจากวัย 1-ผีเสื้อ 42 วันซึ่งมากกว่าการเลี้ยงด้วยใบหม่อนแบบวิธีดั้งเดิม การเลี้ยงไหมทั้งหมด 3 รุ่น คือ รุ่นที่ เลี้ยงเพื่อให้ออกลดเชื้อจากปัจจัยภายนอก รุ่นที่ 2 ทำการใช้เชื้อ BmNPV กับหนอนไหม นำไหมที่รอดชีวิตมาทำการผสม วางไข่ และเลี้ยงต่อไปเป็นรุ่นที่ 3 โดยไม่มีการให้เชื้อ นำตัวอย่างหนอนไหมรุ่นที่ 3 มาตรวจหาเชื้อ BmNPV เพื่อศึกษาการถ่ายทอดโรคแกลสเซอร์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์จาก BmNPV โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ทำการออกแบบโดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 28 เมอร์ รูปแบบของไพรเมอร์คือ Forward Primer, 5'-CCAAACGCATATGACGCAAATTAATTTT-3' และ Reverse Primer, 5'-TTGTTAAATTGGGCCACACACTTTGT-3' มีค่า เปอร์เซ็นต์ G+C เท่ากับ 55.6% อุณหภูมิหลอมเหลว (melting temperature) เท่ากับ 47 °C สามารถตรวจพบเชื้อ BmNPV-DNA เมื่อนำเนื้อเยื่อหนอนไหมระดับ 0.5 กรัม และไพรเมอร์มีความจำเพาะ (specificity) ต่อเชื้อ BmNPV จากหนอนไหมเท่านั้น

การศึกษาการถ่ายทอดโรคแกลสเซอร์ในหนอนไหมโดยการสูมนำเนื้อเยื่อของหนอนไหมจากประชากรหนอนไหม รุ่นที่ 3 มาตรวจหาเชื้อ BmNPV-DNA สามารถตรวจพบเชื้อในหนอนไหมวัย 2 และ 4 แต่ไม่พบเชื้อในระยะไข่ไหม หนอนวัย 1 วัย 3 และ วัย 5 ดังนั้น ในการทดลองยังไม่สามารถสรุปได้ว่าโรคแกลสเซอร์สามารถถ่ายทอดจากรุ่นพ่อแม่ต่อรุ่นลูกได้และไพรเมอร์ที่ออกแบบและสังเคราะห์ได้ สามารถตรวจพบเชื้อ BmNPV ได้ในรุ่นที่ 3

เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร 2540. การประชุมวิชาการหม่อนไหม ประจำปี 2540 กลุ่มงานวิจัยหม่อนไหม บางเขน กรุงเทพฯ 125 หน้า
- กรมส่งเสริมการเกษตร 2539. การปลูกหม่อนเลี้ยงไหมในประเทศไทย เอกสารกรมส่งเสริมการเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ 59 หน้า
- ชาญชัย ถาวรอนุกุลกิจ 2540. โรคที่สำคัญของไหม ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ทิพย์วดี อรรถธรรม 2538. โรควิทยาของแมลง ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม
- ทิพย์วดี อรรถธรรม สุพัฒน์ อรรถธรรม สิริภักดิ์ คำประเทือง และ มงคล อุทโท 2538. การตรวจวินิจฉัยโรค แกรสเซอร์ในหม่อนไหมโดยการใช้ ดีเอ็นเอ ตัวตรวจ ใน วารสารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ห้า 285-301 งานประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน
- พรรณนภา ศักดิ์สูง และชาญชัย ถาวรอนุกุลกิจ 2540. วิเคราะห์อุปสรรค ปัญหา ในการพัฒนาหม่อนไหม ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี แห่งชาติ กรุงเทพฯ
- พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ 2536. การวินิจฉัยโรคของพืชโดยเทคนิค PCR หน้า 129-135 ใน ทฤษฎี การประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล
- วิโรจน์ แก้วเรือง 2540. หม่อนไหม พืชและสัตว์สารพัดประโยชน์ สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการ เกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ บางเขน กรุงเทพฯ
- สิริภักดิ์ สุระพร ภาณุวรรณ จันทาญ จิราภา บุติมาลย์ มีทूरย์ เวียนเก้าน้อย วราภรณ์ สุทธิสา 2548. การเกิด โรคแกรสเซอร์ของหม่อนไหมที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมและใบหม่อน วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีที่ 2 ฉบับที่ 24 เมษายน – มิถุนายน 2548 หน้า 27-32.

- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. & Pegler, D. N. (1995). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford UK. 616 p.
- Huybrechts, R., Guarino, L., Van Brussel, M., Vulsteke, V. 1992. Nucleotide sequence of a transactivating *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus immediate early gene. Biochim. Biophys. Acta 1129: 328-330.
- Zhou, J.B, Li, X.Q., De-Eknamkul, W, Suraporn, S, Xu, J.P. 2011. Identification of a new *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus and analysis its *bro* gene family. Virus genes. 44: 539-547.
- Kawakuchi Hiroshi. 1995. Structure and Character of Silk Fibers. *In* General Remarks of Sericulture. Department of Engineering, Seian College of Art and Design. Kyoto, Japan.
- Ramanathan Arun 1997. New Illustrated Sericulture Reader. Central Silk Board Bangkok. p 159.
- Regional Office for Asai and the Pacific (RANA). 1997. Sericulture Development in Asai. Bangkok, Thailand. p 179.
- Sato Tohishi. 1997. Silkworm Egg Production. Faculty of Agriculture, Tokyo University. P 194.
- Tazima Yotaro. 2001. Improvement of Biology Functions in the Silkworm (translated from Japanese)
- Watanabe Hotoshi. 1998. The Silkworm: An Important Laboratory tool. Kondasha , Tokyo, Japan.

ภาคผนวก

1. Manuscript

- กำลังดำเนินการเขียน manuscript ที่ยังไม่เสร็จสมบูรณ์

2. รายละเอียดการนำงานวิจัยหรืองานสร้างสรรค์ไปใช้อันก่อประโยชน์อย่างเด่นชัด ดังนี้ ประเภทของการใช้ประโยชน์จากงานวิจัย และงานสร้างสรรค์

- การใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ
- การนำไปใช้ในการเรียนการสอน โรควิทยาของหนองใหม่และการตรวจวินิจฉัยโรค (ตาม Course syllabus แนบ)