นิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัสของหนอนไหม *BOMBYX MORI* ที่พบในประเทศไทย*

NUCLEAR POLYHEDROSIS VIRUS ISOLATED FROM MULBURRY SILKWORM *BOMBYX MORI* IN THAILAND

ทิพย์วดี อรรถธรรม **เนื่องพณิช สินชัยศรี**

Tipvadee Attathom **Neungpanich Sinchaisri**

ภาควิชากีฏวิทยา

คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Entomology

Faculty of Agriculture, Kasetsart University

บทคัดย่อ

การสำรวจแหล่งเลี้ยงไหม *Bombyx mori* ตามหมู่บ้านต่าง ๆ ในจังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบหนอนไหมเป็นโรคตายเป็นจำนวนมาก และจากการวิเคราะห์สาเหตุของโรค พบว่า ไวรัสเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคกับหนอนไหม การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงว่า เป็นเชื้อนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัส (Nuclear polyhedrosis virus, NPV) ชนิด single-embedded แต่ในบางเซลล์พบ virion ชนิด multiple-embedded อยู่ในผลึกโปรตีน (polyhedra) และในนิวเคลียสด้วย ผลึกโปรตีนมีขนาดเฉลี่ย 2.7 ไมโครเมตรและส่วนใหญ่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ พบผลึกรูปทรงกลมและหกเหลี่ยมบ้างแต่ไม่มากนัก อนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรงมีขนาดเฉลี่ย 340×45 นาโนเมตร ไวรัสที่พบนี้ทำให้เกิดโรคอย่างรุนแรงกับหนอนไหม หนอนไหมจะแสดงลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ NPV อย่างชัดเจนในระยะวัยที่ 5 หรือขณะกำลังจะเข้าดักแด้ การศึกษาทางโรควิทยาพบว่า ไวรัสนี้เข้าทำลายเนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อใต้ผนังลำตัว เซลล์รอบท่ออากาศ ต่อมผลิตเส้นใยและเนื้อเยื่อรอบอัณฑะ โครงสร้างจุลภาคหลายอย่างในเซลล์ที่ถูกทำลายได้เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของไวรัสนี้กับเชื้อ NPV ที่พบในหนอนผีเสื้อชนิดอื่น ผลจากการสำรวจและศึกษาสรุปได้ว่า เชื้อนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัสเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่ทำให้เกิดผลเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมในประเทศไทย

---

*ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ABSTRACT

Diseased silkworm larvae, Bombyx mori, *were collected from several sericultural farms in the Northeast of Thailand. Light and electron microscopic observations revealed that the causal pathogen was the nuclear polyhedrosis virus (NPV) of single - embedded type. In addition, virions of multiple-embedded type were observed in the polyhedra and in the infected nuclei. Polyhedra of 2.7 μm were primary tetragonal in shape although globular and hexagonal polyhedra were also found. The virus has a rod shaped nucleocapsid, measuring 340×45 nm. The isolated NPV was highly pathogenic to silkworm larvae and exhibited a pronounced characteristic symptom in the 5th instar larvae or at the time of cocoon forming. Pathological study revealed that this virus infected the nuclei of fat tissue, hypodermis, tracheal matrix, silkgland and the testicular sheath. Some ultrastructural changes observed in infected cells indicated that the NPV found in this study was different from those previously reported from other Lepidopterous insects. It is also concluded that this virus is one of the major factor inflicting economic damage to the silkworm industry in Thailand.*

คำนำ

การเลี้ยงไหมในประเทศไทยได้เปลี่ยนจากการเป็นเพียงอาชีพเสริมในครัวเรือน มาเป็นอาชีพหลักของครอบครัวและเป็นอุตสาหกรรมหลักอย่างหนึ่งของประเทศ จากการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้มีการเลี้ยงไหมจำนวนมากขึ้นในแต่ละครอบครัว และจำนวนครั้งของการเลี้ยงต่อปีก็เพิ่มมากขึ้น จึงทำให้การดูแลและป้องกันโรคไม่ทั่วถึง โรคไหมจึงเกิดขึ้นและระบาดไปได้รวดเร็ว อันเป็นอุปสรรคสำคัญในการเลี้ยงไหม Aoki รายงานว่าจากการสำรวจที่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่นและหนองคาย พบโรคมัสคาดีน (muscardine) โรคแฟลคเซอรี (flacherie) โรคแกรสเซอรี (grassery) และโรคเพ็บบริน (pebrine)[4] ซึ่งต่อมาได้ทำการศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคโดยเฉพาะโรคเพ็บบรินที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัว และโรคมัสคาดีนอันเกิดจากเชื้อรา[5]

สำหรับโรคแกรสเซอรีซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัสนั้น มีชื่อเรียกตามภาษาพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือว่า โรคเต้อหรือโรคตัวเหลือง มีรายงานว่าไหมพันธุ์ไทยมีความต้านทานต่อโรคนี้มากกว่าไหมพันธุ์ญี่ปุ่น และไหมพันธุ์ลูกผสมไทยและญี่ปุ่น[11] แต่ยังไม่มีการศึกษารายละเอียดอื่น ๆ ที่เกี่ยวกับเชื้อไวรัสนี้ ดังนั้น ผู้วิจัยได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของโรคแกรสเซอรีที่มีต่อการเลี้ยงไหม จึงได้ศึกษารายละเอียดเกี่ยวกับโรคนี้ โดยหวังว่าผลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการวิเคราะห์หาแนวทางในการกำจัดการระบาดของโรคต่อไป ซึ่งจะเป็นการขจัดปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่งของอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมของประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

การสำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหนอนไหมที่เป็นโรคจากแหล่งเลี้ยงไหมในเขตอำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา อำเภอบ้านไผ่ อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น อำเภอโนนสัง จังหวัดอุดรธานี อำเภอโพนพิสัย อำเภอบ้านม่วง จังหวัดหนองคาย อำเภอกุฉินารายน์ จังหวัดกาฬสินธุ์ อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี อำเภอกันทรารมย์ อำเภออุทุมพรพิสัย จังหวัดศรีสะเกษ อำเภอปราสาท จังหวัดสุรินทร์ อำเภอประโคนชัย จังหวัดบุรีรัมย์ และจังหวัดมุกดาหาร จากสถานีทดลองไหมของกองการไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จากนิคมสร้างตนเอง และจากหมู่บ้านเกษตรกรที่ห่างไกลจากตัวเมือง เพื่อเปรียบเทียบการระบาดและความรุนแรงของโรคในแหล่งเลี้ยงไหมต่าง ๆ เหล่านี้ แยกตัวอย่างหนอนไหมที่เป็นโรคตามลักษณะอาการของโรค สำหรับหนอนไหมที่เป็นไวรัสเก็บใส่ขวดแช่น้ำแข็งนำกลับมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การเพิ่มเชื้อไวรัสและการทำให้บริสุทธิ์

นำหนอนไหมที่เป็นโรคมาบดให้ละเอียดในน้ำกลั่นที่สะอาด กรองซากหนอนออกด้วยผ้าขาว-บางหลาย ๆ ชั้น น้ำกรองที่ได้จะมีผลึกโปรตีนของไวรัสจำนวนมาก จุ่มใบหม่อนลงในน้ำกรองนี้แล้วให้หนอนไหมพันธุ์ $K_1 \times K_8$ วัยที่ 3 กิน เมื่อหนอนเป็นโรคเก็บรวมกันแช่ในน้ำที่สะอาด ไวรัสจะหลุดออกจากซากหนอนและตกตะกอนอยู่ก้นภาชนะ นำตะกอนผลึกโปรตีนของไวรัสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation (SDGC) โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ 65, 60, 55, 50, 45 และ 40% (นน./นน.) ตามลำดับ หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ความเร็ว 25,000 รอบ/นาที นาน 2 ชม. ดูดชั้นผลึกโปรตีนของไวรัสออกมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 6,000 รอบ/นาที จากนั้นล้างน้ำตาลที่ติดค้างอยู่ออกด้วยการ dialysis ค้างคืน นำสารแขวนลอยไวรัสที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นด้วยการทำ SDGC ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เก็บไวรัสบริสุทธิ์ในสภาพแช่แข็งเพื่อการทดลองต่อไป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างจุลภาค

เพื่อศึกษาขนาดและรูปทรงของเชื้อไวรัสได้อย่างถูกต้อง จึงใช้ตัวอย่างซึ่งเตรียมด้วยวิธี shadow casting คือหยดสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ลงบนกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอร์มวาร์ (formvar) และคาร์บอน ทิ้งไว้ 15 นาที จากนั้นซับน้ำส่วนเกินออกด้วยการแตะกระดาษกรองที่ขอบกริด เมื่อกริดแห้งเคลือบไวรัสบนกริดด้วยโลหะผสม platinum-palladium ใช้เครื่อง vacuum evaporator JEF - 4x โดยทำมุมเอียง 30° ศึกษาตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่านที่ 80 กิโลโวลต์ และเพื่อศึกษาโครงสร้างจุลภาคของไวรัส ทำ ultrathin sections ของเนื้อเยื่อไขมันของหนอนไหมที่เป็นโรคตามวิธีของ

ทิพย์วดีและพิสสวรรณ[1] หลังจากย้อมสีชิ้นส่วนเนื้อเยื่อแล้ว นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงผ่าน

การศึกษาโรควิทยาของเชื้อไวรัส

ทำการศึกษาทั้งทาง histopathology และ cytopathology ด้วยการให้เชื้อไวรัสกับหนอนไหมตามวิธีการข้างต้น ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา เพื่อให้แน่ใจว่าหนอนเป็นโรค ผ่าตัดตัวหนอนตามขวางเป็นปล้อง ๆ เพื่อเตรียมตัวอย่าง paraffin sections และผ่าเอาเฉพาะเนื้อเยื่อไขมันออกมาเพื่อเตรียมตัวอย่าง ultrathin sections ซึ่งการเตรียมตัวอย่างทั้ง 2 วิธีนี้ กระทำตามขั้นตอนของทิพย์วดีและพิสสวรรณ[1]

ผลและวิจารณ์

จากการสำรวจพบว่าโรคแกรสเซอรีนี้ระบาดอย่างรุนแรงตามแหล่งเลี้ยงไหมของเกษตรกร โดยเฉพาะเกษตรกรในชนบทที่อยู่ห่างไกล แต่พบตัวอย่างหนอนไหมเป็นโรคน้อยมากในแหล่งเลี้ยงไหมของสถานีทดลองไหม หรือในแหล่งเลี้ยงไหมของนิคมสร้างตนเอง หนอนไหมที่เป็นโรคจะแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ NPV คือ หนอนจะไม่กินอาหาร เคลื่อนไหวช้าลง อาเจียรและถ่ายออกมาเป็นของเหลวทำให้รอบ ๆ ตัวหนอนเปียกแฉะ ตัวหนอนปกติเป็นสีขาวคล้ายฝุ่นแป้งจะเปลี่ยนมาเป็นสีขาวเหลืองและเป็นมันวาว ลำตัวบวม หดสั้นเป็นปล้อง ๆ ชัดเจน และจะมีจ้ำสีขาว ๆ ของไขมันอยู่ใต้ผนังลำตัวกระจายไปทั่วตัว เมื่อหนอนไหมตายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำอย่างรวดเร็ว ผนังลำตัวเป็นเหมือนถุงหุ้มอวัยวะที่ถูกทำลายอยู่ภายใน ในที่สุดผนังลำตัวจะแตกปล่อยของเหลวที่มีผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสจำนวนมากออกมาเปรอะเปื้อนภาชนะที่ใช้เลี้ยง ทำให้เชื้อโรคแพร่กระจายต่อไป โรคนี้มักจะแสดงอาการให้เห็นชัดเจนและระบาดอย่างรุนแรงในหนอนไหมวัยที่ 5 สันนิษฐานได้ว่า เชื้อไวรัสนี้อาจมีอยู่แล้วในหนอนไหมแต่อยู่ในสภาพหลบซ่อนที่เรียกว่า occult virus ความบกพร่องในการดูแลหนอนไหมมักเกิดขึ้นในช่วงที่ไหมเข้าสู่วัยที่ 5 เช่นหนอนไหมโตขึ้น ทำให้ต้องอยู่กันอย่างหนาแน่น การถ่ายเทอากาศไม่ดี ได้รับอาหารไม่เพียงพอ และเป็นช่วงเวลาที่หนอนไหมกำลังปรับสภาพของร่างกายเพื่อเตรียมลอกคราบครั้งสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ หนอนไหมจะมีความอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมและเป็นโรคได้ง่ายมาก นอกจากนี้เมื่อตัวใดแสดงอาการของโรคเกษตรกรมักจะเสียดายไม่คัดออกเนื่องจากใกล้จะเข้าดักแด้แล้ว การระบาดของโรคจึงมักเกิดขึ้นในช่วงนี้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างจุลภาค

จากภาพถ่ายของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นผลึกโปรตีนของไวรัสนี้ ส่วนใหญ่มีรูปทรงเป็นผลึกสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ มีมุมค่อนข้างมน ไม่เป็นมุมฉาก พบผลึกรูปทรงกลมและรูปหกเหลี่ยมบ้างแต่ไม่มากนัก (รูปที่ 1) ผลึกโปรตีนมีขนาดแตกต่างกัน และพบผลึกรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดใหญ่เกือบ 5 ไมโครเมตร

(รูปที่ 1 ข.) แต่โดยทั่วไปมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 2.7 ไมโครเมตร นับว่าเป็นผลึกโปรตีนไวรัสที่มีขนาดใหญ่กว่าเชื้อ NPV อื่น ๆ ที่มีรายงานในประเทศไทย[1,2,3] ดังนั้นเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะสามารถวิเคราะห์แจกแจงแยกผลึกโปรตีนของเชื้อ NPV ของหนอนไหมนี้จาก NPV ตัวอื่น ๆ ได้อย่างสะดวก เพราะเห็นเป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่ชัดเจน แต่ Bergold[7] ได้รายงานไว้ว่าผลึกโปรตีนของเชื้อ NPV ของหนอนไหมส่วนใหญ่เป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) และมีขนาดประมาณ 3–5 ไมโครเมตร ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาอาจเนื่องมาจากเป็นเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์กัน ในการศึกษานี้ พบผลึกรูปสี่เหลี่ยมลูกเต๋าที่เรียกว่า cuboidal inclusion ปะปนในสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ (รูปที่ 1 ค.) โครงสร้างนี้มีรายงานว่าพบใน NPV ของหนอนผีเสื้อหลายชนิด[6] ซึ่ง Vail และ Jay[15] ได้ให้ข้อสรุปว่าเป็นผลึกโปรตีนที่เกิดในไซโตพลาสซึมของเซลล์ ไม่พบมีอนุภาคไวรัสอยู่ภายในและไวรัสเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดโครงสร้างนี้ มิใช่เป็นการตอบสนองของเซลล์ที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย

ภาพถ่าย ultrathin sections ของเนื้อเยื่อไขมันของหนอนไหมที่เป็นโรคจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงให้เห็นโครงสร้างจุลภาคของเชื้อไวรัสอย่างชัดเจน (รูปที่ 2) เชื้อไวรัสนี้เป็น nuclear polyhedrosis virus แบบ single-embedded คือ virion ประกอบด้วยอนุภาคไวรัส (nucleocapsid) เพียงอันเดียวในผนังล้อมรอบ ไวรัสชนิดนี้แตกต่างจาก NPV ชนิด single-embedded ที่พบโดยทั่วไป อาจถือได้ว่าเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในหนอนไหมเท่านั้น กล่าวคือ ตามหลักการแบ่งแยกชนิดของไวรัสนั้น เชื้อ NPV ชนิด single-embedded จะมีแต่ virion ที่ประกอบด้วย nucleocapsid เพียงอันเดียวเท่านั้น ส่วน NPV ชนิด multiple-embedded นั้น มี virion ที่ประกอบด้วย nucleocapsid หลายอันหรืออันเดียวก็ได้ ส่วนมากจะมีหลายอันในผนังล้อมรอบเดียวกัน แต่ใน NPV ของหนอนไหมนี้ virion เกือบทั้งหมดเป็น single-embedded และพบที่เป็น multiple-embedded บ้างใน polyhedra และในนิวเคลียสของเซลล์ (รูปที่ 2 ก.) แต่มีจำนวนน้อยมาก Bergold ได้รายงานว่า พบเชื้อ NPV ของหนอนไหมมี virion ที่ประกอบด้วย nucleocapsid ถึง 7 อัน[8]

อนุภาคไวรัสของเชื้อ NPV ของหนอนไหมเป็นท่อนตรง (rod-shaped) มีผนังล้อมรอบ 2 ชั้น (รูปที่ 2 ข.) Himeno และคณะ[10] ได้ศึกษาโครงสร้างจุลภาคของ NPV ของหนอนไหมและรายงานว่าผนัง 2 ชั้นนี้เป็นเพียงผนังชั้นนอก ยังมีผนังชั้นในซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนเมื่อย่อยสลายผลึกโปรตีน และเห็นส่วนของ nucleoprotein หลุดออกมาจากผนังชั้นใน อนุภาคไวรัสที่ศึกษานี้มีขนาดค่อนข้างยาวเฉลี่ย 340 นาโนเมตร และกว้างประมาณ 45 นาโนเมตร ซึ่งไม่แตกต่างมากนักจากรายงานของ Khosaka และคณะ[12] ที่ได้แยกอนุภาคไวรัสของ NPV ของหนอนไหมออกจากผลึกโปรตีนและผนังล้อมรอบ และพบว่าอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์นั้นมี 2 แบบคือ ท่อนตรงหนาขนาด 330×80 นาโนเมตร และท่อนยาวบางขนาด 360×60 นาโนเมตร โดยปกติสารเคมีและกระบวนการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างมักจะมีผลกระทบต่อขนาดและรูปร่างของเชื้อไวรัส ดังนั้นขนาดของเชื้อไวรัสที่มีรายงานจึงแตกต่างกัน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากขั้นตอนของการเตรียมตัวอย่างที่แตกต่างกันก็ได้

เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อ NPV ของหนอนไหมมีความสามารถในการเพิ่มปริมาณได้ดีมากในแต่ละ

ผลึกโปรตีนจะเห็นอนุภาคไวรัสฝังตัวอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก ต่างจากผลึกโปรตีนของ NPV ของหนอนผีเสื้อชนิดอื่น (รูปที่ 2 ค.) นอกจากนี้ยังมีอนุภาคไวรัสอยู่นอกผลึกโปรตีนอีกเป็นจำนวนมาก โดยรวมเป็นกลุ่มอยู่ในบริเวณที่เรียกว่า virogenic stroma ตรงกลางนิวเคลียสของเซลล์ (รูปที่ 2 ค. และ ง.) ลักษณะดังกล่าวทำให้เชื้อนี้เมื่อมีโอกาสจะเข้าไปเจริญเพิ่มปริมาณในเซลล์ กระบวนการเกิดโรคและการแพร่ระบาดจะเป็นไปอย่างรวดเร็วจากหนอนไหมที่เป็นโรคเพียงตัวเดียวจะทำให้หนอนไหมทั้งหมดติดโรคได้ในเวลาอันสั้น หนอนไหมจะตายพร้อม ๆ กันหรือทยอยตายในเวลาใกล้เคียงจนหมดภายใน 3–4 วัน โดยไม่สามารถป้องกันหรือรักษาได้เลย

การศึกษาโรควิทยาในระดับเนื้อเยื่อ (histopathology)

ศึกษาลักษณะการเข้าทำลายของไวรัสจากตัวอย่าง paraffin sections ซึ่งเมื่อนำมาย้อมสีตามวิธีที่รายงานโดย Hamm[9] ผลึกโปรตีนจะติดสีแดงเข้ม ทำให้เห็นได้ชัดเจนว่าเนื้อเยื่อใดถูกทำลายมากน้อยเพียงใด จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เชื้อ NPV ของหนอนไหมเข้าทำลายเนื้อเยื่อไขมัน (fat body) เซลล์ใต้ผนังลำตัว (hypodermis) และเซลล์รอบท่ออากาศ (tracheal matrix cells) อย่างรุนแรง (รูปที่ 3 และ 4) นิวเคลียสของเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นและมีผลึกโปรตีนสีแดงเข้มบรรจุอยู่เต็ม เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อของหนอนปกติ (รูปที่ 3 ก.) พบว่า เนื้อเยื่อไขมันที่เป็นโรคมีนิวเคลียสขยายใหญ่อย่างเห็นได้ชัดเจน เนื้อเยื่อหลุดขาดจากกันเป็นท่อน ๆ (รูปที่ 3 ค. และ 4 ก.) ต่างจากเซลล์ไขมันปกติที่มีนิวเคลียสเล็กมากจนมองเกือบไม่เห็นและเนื้อเยื่อเรียงตัวต่อกันเป็นปกติ ส่วนเซลล์ใต้ผนังลำตัวมีนิวเคลียสขยายใหญ่และแยกหลุดออกมาจากชั้น epidermis ของผนังลำตัว (รูปที่ 3 ช.) ซึ่งเนื้อเยื่อชั้นนี้ปกติจะเป็นเซลล์ชั้นเดียวบาง ๆ ที่มองเกือบไม่เห็น สำหรับเซลล์รอบท่ออากาศนั้นถูกทำลายอย่างรุนแรงที่สุด คือพบว่านิวเคลียสเกือบทุกเซลล์ติดสีแดงเข้ม (รูปที่ 3 ฉ. และ 4 ข.) อย่างไรก็ตาม กระบวนการเกิดโรคในเนื้อเยื่อหลักทั้งสามไม่ได้เกิดขึ้นพร้อมกัน บางเซลล์อาจถูกทำลายอย่างรุนแรงในขณะที่เซลล์ข้างเคียงไม่ได้ถูกทำลายแต่อย่างใด (รูปที่ 3 ง.) นอกจากนั้นยังพบว่าต่อมผลิตเส้นใย (silkgland) และเซลล์รอบอัณฑะ (testicular sheath) ถูกไวรัสเข้าทำลายเช่นกัน (รูปที่ 4 ค., จ. และ ฉ.) แต่ไม่รุนแรงนัก การที่ไวรัสเข้าทำลายต่อมผลิตเส้นใยจึงเป็นสาเหตุให้หนอนไหมไม่สามารถชักเส้นใยเข้าดักแด้ได้ ส่วนเนื้อเยื่อสำคัญอื่น ๆ ที่ต้านทานต่อการถูกทำลายได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cells) (รูปที่ 3 ค.) ต่อมขับถ่าย (malpighian tubules) (รูปที่ 3 ฉ.) และเซลล์รอบท่ออาหาร (gut epithelial cells) (รูปที่ 4 ง.) นอกจากเนื้อเยื่อหลายชนิดของตัวอ่อนคือหนอนไหมจะอ่อนแอต่อโรคแล้ว เนื้อเยื่อบางชนิดของตัวแก่ เช่น follicular cells ของแม่ผีเสื้อก็ถูกเชื้อ NPV เข้าทำลายเช่นกัน[14] ความเจาะจงกับเนื้อเยื่อแมลง (tissue specificity) ของเชื้อ NPV ของหนอนผีเสื้อชนิดต่าง ๆ คล้ายคลึงกัน แตกต่างกันที่ช่วงเวลาและอันดับการเข้าทำลายก่อนหรือหลัง Vail และ Jay[15] ได้ให้ข้อคิดไว้ว่าเนื้อเยื่อเกือบทุกชนิดของหนอนคืบกระหล่ำปลี *Trichoplusia ni* สามารถเป็นแหล่งเพิ่มปริมาณเชื้อ NPV ได้ทั้งสิ้น อย่างไรก็ตามข้อคิดนี้อาจไม่ถูกต้องเสมอไปกับเชื้อ NPV ของหนอนผีเสื้อชนิดอื่น

การศึกษาโรควิทยาในระดับเซลล์ (cytopathology)

เชื้อไวรัสนี้มีกระบวนการเข้าทำลายเซลล์ของหนอนไหมคล้ายคลึงกับเชื้อ NPV โดยทั่วไป กล่าวคือ ไวรัสจะเข้าไปเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณในนิวเคลียสของเซลล์ ทำให้นิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้นจนเกือบเต็มเซลล์ (รูปที่ 5 ก.) ส่วนที่เป็น nucleolus ไม่เห็นเด่นชัดและจางหายไป ส่วนของ chromatin เคลื่อนไปอยู่ติดผนังนิวเคลียส ตรงกลางนิวเคลียสมีบริเวณทึบแสงอิเล็กตรอนที่เรียกว่า virogenic stroma ขึ้นแทนที่ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีอนุภาคไวรัสถูกสร้างขึ้นเป็นจำนวนมาก อนุภาคเหล่านี้เมื่อกระจายตัวออกจากบริเวณดังกล่าวจะสร้างผนังล้อมรอบสองชั้น และเข้าฝังตัวในผลึกโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นกระจายทั่วไปในนิวเคลียส แต่มีอนุภาคไวรัสจำนวนมากที่มิได้เข้าฝังตัวในผลึกโปรตีน เมื่อมีผลึกโปรตีนจำนวนมากขึ้น นิวเคลียสขยายใหญ่ขึ้นจนผนังนิวเคลียสขาด องค์ประกอบต่าง ๆ ในเซลล์เสียรูปทรงและแตกสลายไปในที่สุด (รูปที่ 5 ข.) ดังนั้น เนื้อเยื่อที่ถูกไวรัสเข้าทำลายจึงแตกสลายกลายเป็นของเหลวที่มีแต่ผลึกโปรตีนของไวรัสปะปนอยู่มากมาย

โดยปกติผลึกโปรตีนของเชื้อ NPV เมื่อถูกสร้างเสร็จสมบูรณ์มีอนุภาคไวรัสเข้าฝังตัวภายในจำนวนพอสมควร จะสร้างผนังล้อมรอบ แสดงให้เห็นว่าเป็นผลึกที่สมบูรณ์แล้ว แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่พบผลึกโปรตีนใดที่มีผนังล้อมรอบเลย ซึ่งไม่น่าจะเป็นไปได้ว่าทั้งหมดเป็นผลึกยังสร้างไม่เสร็จสมบูรณ์ เพราะผลึกโปรตีนเหล่านี้มีขนาดใหญ่กว่าผลึกโปรตีนของเชื้อ NPV อื่น ๆ อยู่มาก และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกโปรตีนที่แยกออกจากหนอนไหมและทำให้บริสุทธิ์ ก็พบว่าเป็นผลึกที่มีรูปทรงที่แน่นอนและสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ความกระจ่างในเรื่องนี้

โครงสร้างจุลภาคพบเกิดขึ้นในนิวเคลียสที่ถูกเชื้อ NPV ของหนอนไหมเข้าทำลาย ได้แก่ membranous profile ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้น membrane โค้งไปมาหรือเป็นท่อนสั้น ๆ ในบางช่วงก็เป็นเส้นบาง ๆ และในบางช่วงก็เป็นหนาทึบแสงอิเล็กตรอน (รูปที่ 5 ก.) นอกจากนี้ยังอาจอยู่ในลักษณะเป็นวงที่เรียกว่า vesicular membrane (รูปที่ 2 ค. และ 5 ค.) เส้น membrane ที่เกิดขึ้นมากมายในนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกทำลายนั้นมีรายงานพบอยู่เสมอ ๆ และเป็นที่เข้าใจกันว่าเป็นผนังบางที่เหลือจากการนำไปใช้สร้างผนังล้อมรอบอนุภาคไวรัสหรือล้อมรอบผลึกโปรตีน[13] ในการศึกษานี้ไม่พบโครงสร้างที่เรียกว่า fibrillar strand ซึ่งมีรายงานว่าพบเป็นจำนวนมากเกี่ยวข้องกับเชื้อ NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน[2] และเชื้อ NPV ของหนอนกระทู้หอมที่สำรวจพบในประเทศไทย[3] แต่ทั้ง membrane profile และ fibrillar strand มีรายงานว่าไม่พบหรือพบน้อยมากในเชื้อ NPV ของหนอนคืบกระหล่ำปลี[1]

การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ที่เชื้อ NPV ของหนอนไหมเข้าไปเจริญเพิ่มปริมาณ แม้ว่าจะคล้ายคลึงกับที่เกิดขึ้นกับหนอนผีเสื้อชนิดอื่น ๆ แต่เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดแล้วจะพบว่ารูปร่างลักษณะของโครงสร้างเหล่านี้แตกต่างกัน และความถี่ของการพบโครงสร้างเหล่านี้ในนิวเคลียสต่างกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเชื้อ NPV ของหนอนไหมเป็นเชื้อ NPV อีกตัวหนึ่งที่สำรวจพบ มิใช่เชื้อ NPV

ของหนอนผีเสื้อชนิดอื่นที่บังเอิญมาเกิดโรคกับหนอนไหม

โรคแกรสเซอรีของหนอนไหมทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจมากกว่าโรคอื่น ๆ เพราะเมื่อโรคนี้ระบาดจะทำให้หนอนไหมตายในวัยที่ 5 หรือเกือบเข้าดักแด้ ซึ่งเกษตรกรต้องสูญเสียทั้งแรงงานและทรัพย์สินในการเลี้ยงจนเกือบครบวงจรแล้ว ในแหล่งเลี้ยงไหมบางแห่งพบว่าหนอนไหมตายเกือบทั้งหมดเมื่อนำเข้าจ่อเพื่อให้ถักเส้นใย อย่างไรก็ตามไม่พบการระบาดของโรคนี้ตามสถานีทดลองไหมและแหล่งเลี้ยงไหมของนิคมสร้างตนเอง แต่พบการระบาดอย่างรุนแรงตามแหล่งเลี้ยงไหมของเกษตรกรในชนบทที่อยู่ห่างไกล ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุดังนี้

1. เกษตรกรไทยจำนวนมากเลี้ยงไหมพันธุ์พื้นเมืองซึ่งไข่ไหมจะไม่มีการพักตัว สามารถฟักออกจากไข่ได้ปีละหลายครั้ง ทำให้การเลี้ยงไหมเป็นไปอย่างต่อเนื่อง เกือบจะไม่มีการเว้นระยะเพื่อทำความสะอาดโรงเรือนและอุปกรณ์การเลี้ยงไหม เมื่อมีโรคเกิดขึ้นจึงแพร่ระบาดอย่างรุนแรง

2. เกษตรกรที่อยู่ห่างไกลไม่สะดวกในการมารับหรือซื้อไข่ไหมจากสถานีทดลองไหมจึงผลิตไข่ไหมขึ้นเลี้ยงเองและกระทำสืบต่อเนื่องกันหลายช่วง ทำให้เกิดปัญหาคุณภาพของไข่ไหมที่เกิดจากการผสมกันเอง (inbreeding) ไม่มีการคัดพันธุ์ และไม่มีการตรวจสอบโรค คุณภาพจึงต่างจากไข่ไหมที่ผลิตจากสถานีทดลองไหม ซึ่งเป็นไข่ไหมที่ปลอดโรคและมีคุณภาพดีเนื่องจากมีการคัดพันธุ์

3. เกษตรกรที่ผลิตไข่ไหมเลี้ยงเองมักจะเลี้ยงไหมขึ้นมาจากไข่ทั้งหมดที่ผลิตได้ เพราะคิดว่าเลี้ยงปริมาณมาก ๆ ไว้ทดแทนจำนวนที่สูญเสียไปในระหว่างการเลี้ยง ซึ่งเป็นความคิดที่ผิด เพราะการเลี้ยงไหมจำนวนมากเกินไป ทำให้หนอนไหมได้รับอาหารไม่เพียงพอแก่ความต้องการ และอยู่กันหนาแน่นเกินไป เกษตรกรไม่มีแรงงานเพียงพอที่จะดูแลและรักษาความสะอาดได้อย่างถูกต้องทั่วถึงตามหลักวิชาการ ทำให้หนอนไหมอ่อนแอ เกิดการติดโรค และโรคระบาดได้ง่าย ดังนั้นการเลี้ยงไหมจำนวนพอประมาณเหมาะแก่กำลังการดูแลและปริมาณใบหม่อนที่มี จะทำให้หนอนไหมเจริญเติบโตแข็งแรงและมีความต้านทานต่อโรคได้ดีขึ้น

4. สภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการเลี้ยงไหมไม่ถูกต้อง เช่นอุณหภูมิและความชื้นในโรงเรือน ซึ่งพบว่าในฤดูร้อนเมื่ออุณหภูมิในโรงเรือนสูง และไม่มีการถ่ายเทอากาศที่ดีพอจะทำให้หนอนไหมอ่อนแอ การระบาดของโรคจะรุนแรง นอกจากนี้อุปกรณ์ต่าง ๆ ในการเลี้ยงไหมที่ไม่เหมาะสม หนอนไหมหลายวัยปะปนกัน การเลี้ยงด้วยใบหม่อนที่ไม่สดหรือมีแร่ธาตุอาหารไม่เพียงพอ และเทคนิคต่าง ๆ ในการเลี้ยงที่ไม่ถูกต้อง ล้วนทำให้หนอนไหมเจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ ไม่แข็งแรงสมบูรณ์เท่าที่ควรและอ่อนแอต่อโรค

ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่า หากการเลี้ยงไหมเริ่มจากไข่ไหมที่มีคุณภาพดีและปลอดโรค โดยเลี้ยงอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ มีการป้องกันโรคและดูแลรักษาความสะอาดอย่างทั่วถึง มีโรงเลี้ยงไหมและอุปกรณ์การเลี้ยงที่เหมาะสมแล้ว โรคของไหมอันเกิดจากเชื้อไวรัสก็จะไม่เป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการเลี้ยงไหม

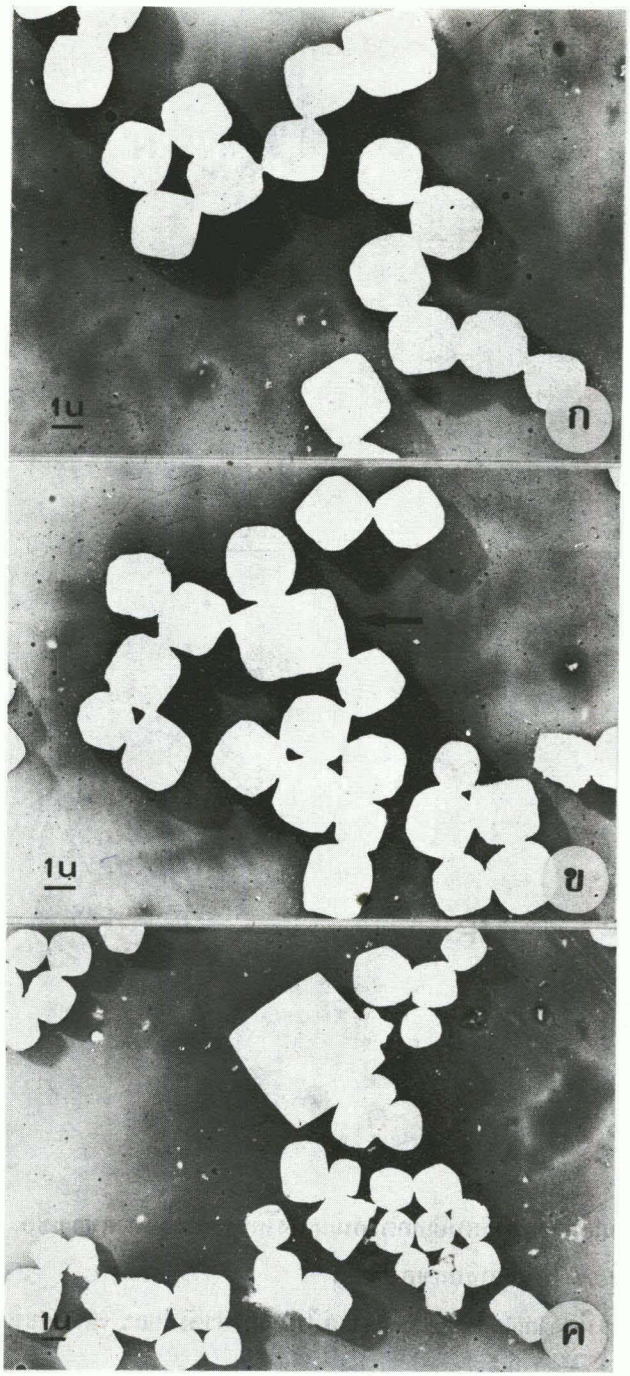
สรุป

นิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัส (NPV) เชื้อสาเหตุของโรคแกรสเซอรีที่เกิดกับหนอนไหม *Bombyx mori* เป็นชนิด single-embedded มีผลึกโปรตีนรูปทรงสี่เหลี่ยมขนาดใหญ่เห็นชัดเจนด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไวรัสนี้แตกต่างจาก NPV ของหนอนผีเสื้อชนิดอื่นคือ เป็น NPV ชนิด single-embedded ที่มี virion แบบ multiple-embedded ปรากฏให้เห็นทั้งในผลึกโปรตีนและในนิวเคลียสของเซลล์ นอกจากนี้ยังเป็นไวรัสที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณสูง จึงระบาดได้ในเวลาอันรวดเร็ว ไวรัสจะเข้าทำลายเนื้อเยื่อหลัก ๆ ที่สำคัญของหนอนไหม อาการจะแสดงให้เห็นชัดเจนและตายในช่วงวัยที่ 5 หรือขณะกำลังเข้าดักแด้ เกษตรกรจึงสูญเสียทั้งทรัพย์สินและแรงงานที่ได้ลงไปตั้งแต่เริ่มเลี้ยงจนเกือบเก็บผลผลิต นับเป็นการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมาก ความแตกต่างกันของโครงสร้างจุลภาคของเชื้อไวรัส และโรควิทยาทั้งในระดับเนื้อเยื่อและเซลล์ ทำให้สามารถวิเคราะห์แจกแจงเชื้อ NPV ของหนอนไหมจากไวรัสอื่น ๆ ที่สำรวจพบในประเทศได้โดยง่าย การเลี้ยงไหมอย่างถูกต้องตามหลักวิชาการ การเล็งเห็นความสำคัญในการกำจัดตัวไหมที่อ่อนแอเพื่อระงับการระบาดของโรคและการดูแลรักษาความสะอาดอย่างทั่วถึง ล้วนเป็นสิ่งสำคัญที่เกษตรกรผู้เลี้ยงไหมควรคำนึงถึงเพื่อขจัดปัญหาโรคแกรสเซอรีของหนอนไหม ซึ่งจะช่วยทำให้อุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมของไทยประสบผลสำเร็จดียิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

1. อรรถธรรม, ทิพย์วดี และ พูนพล, พิสสวรรณ. นิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัสของหนอนคืบกระหล่ำปลีในประเทศไทย. *ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.)*, 2527, **18**, 136–143.
2. อรรถธรรม, ทิพย์วดี และ อรรถธรรม, สุพัฒน์. การใช้เชื้อไวรัสในการปราบหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน, *Helicoverpa armigera* (Hubner). รายงานฉบับสมบูรณ์, สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพ, 2528.
3. อรรถธรรม, ทิพย์วดี และ เอี่ยมประภา, ศิรินันธ์. สัณฐานวิทยาโครงสร้างจุลภาคและโรควิทยาของเชื้อนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไวรัสของหนอนกระทู้หอม, *Spodoptera exigua*. *ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.)*, 2530.
4. Aoki, K. Silkworm Diseases in Thailand. *Bull. Thai Ser. Res. Train. Centre*, 1971, No. 1, 102-108.
5. Aoki, K., Isarangkul, L. and Sinchaisri, N. On Silkworm Disease, Especially Pebrine and Aspergillus Disease Found in 1971. *Bull. Thai Ser. Res. Train. Centre*, 1972, No. 2, 72-76.
6. Attathom, T. A Comparative Study of Six Baculovirus Isolates from Larvae of the Family Noctuidae (Insecta: Lepidoptera.). Ph. D. Dissertation, University of California, Riverside, 1978.
7. Bergold, G. H. Insect Viruses. In Smith, K.M. and Lauffer, M.A. (eds.). Advances in Virus Research. Academic Press, New York, 1953, **1**, 91-139.
8. Bergold, G. H. Fine Structure of Some Insect Viruses. *J. Insect Pathol.*, 1963, **5**, 111-128.
9. Hamm, J. J. A Modified Azan Staining Technique for Inclusion Body Viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 1966, **8**, 125-126.
10. Himeno, M., Yasuda, S., Khosaka, T. and Onodera, K. The Fine Structure of a Nuclear Polyhedrosis Virus of the Silkworm. *J. Invertebr. Pathol.*, 1968, **11**, 516-519.

11. Isarangkul, L. Varietal Resistance of Silkworm to Nuclear Polyhedrosis. *Bull. Thai Ser. Res. Train. Centre,* 1974, No. 4, 114-115.
12. Khosaka, T., Himeno M. and Onodera, K. Separation and Structure of Component of Nuclear Polyhedrosis Virus of the Silkworm. *J. Virology*, 1971, **7**(2), 267-273.
13. Krieg, A. and Huger, A. M. New Ultracytological Findings in Insect Nuclear Polyhedrosis. *J. Invertebr. Pathol.*, 1969, **13**, 272-279.
14. Smith-Johannsen, H., Witkicwicz, H. and Iatrou, K. Infection of Silkmoth Follicular Cells with *Bombyx mori* Nuclear Polyhedrosis Virus. *J. Invertebr. Pathol.*, 1986, **48**, 74-84.
15. Vail, P. V. and Jay, D. L. Pathology of a Nuclear Polyhedrosis Virus of the Alfalfa Looper in Alternate Hosts. *J. Invertebr. Pathol.*, 1973, **21**, 198-204.

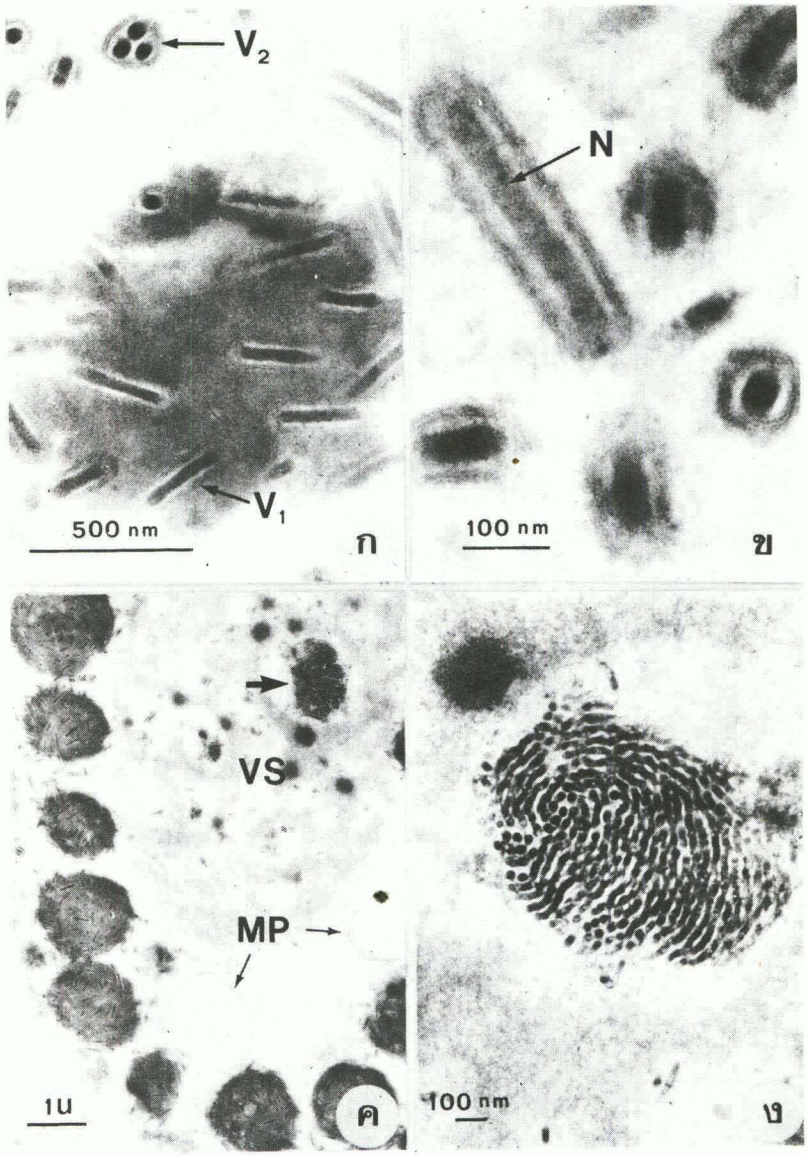


รูปที่ 1. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของผลึกโปรตีนของเชื้อ NPV ของหนอนไหม *Bombyx mori* ซึ่งเตรียมด้วยวิธี shadow casting

ก. ผลึกโปรตีนรูปทรงสี่เหลี่ยม มีมุมโค้งมน

ข. ผลึกโปรตีนรูปทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดใหญ่มาก (ศรชี้)

ค. **Cuboidal inclusion** ที่มีปะปนมากับผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัส



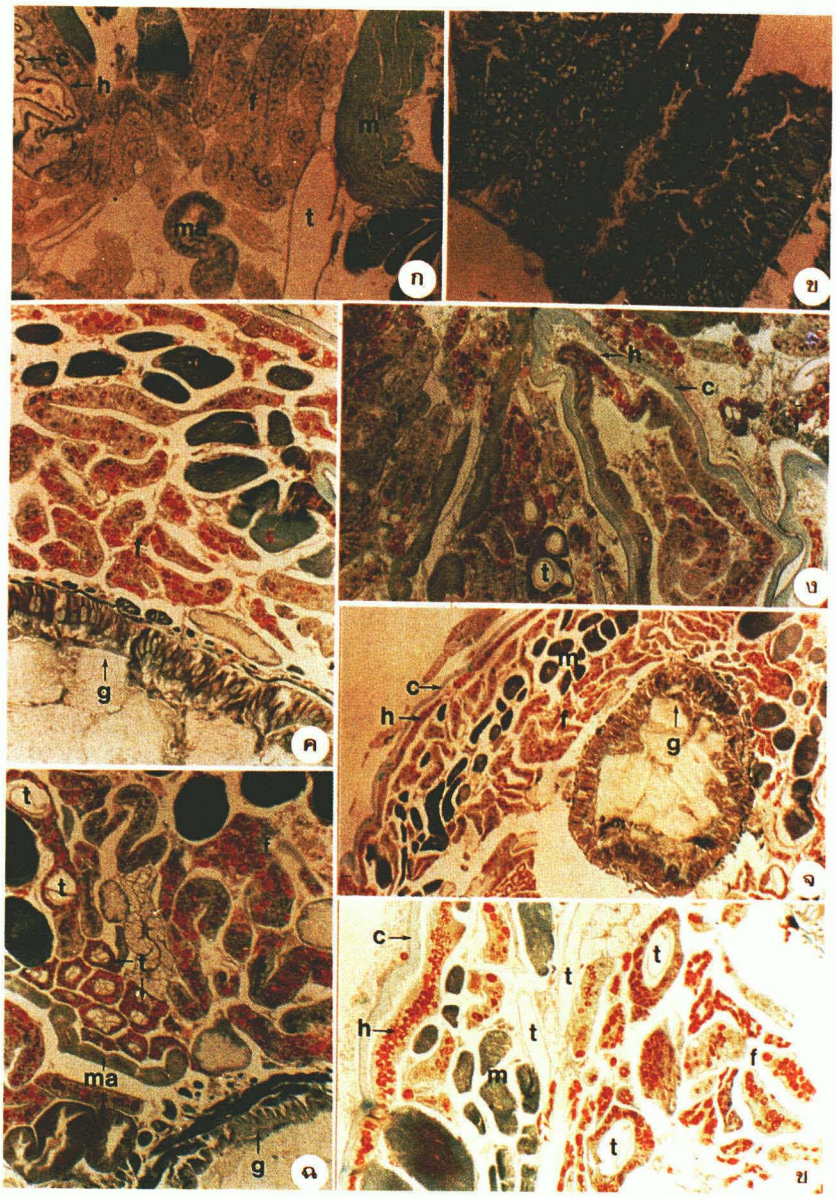
รูปที่ 2. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงโครงสร้างจุลภาคของเชื้อ NPV ของหนอนไหม *Bombyx mori* ในนิวเคลียสของเซลล์

ก. Virions ชนิด single-embedded (V_1) ในผลึกโปรตีน และ virion ชนิด multiple-embedded (V_2) นอกผลึกโปรตีน

ข. Nucleocapsid (N) ที่มีผนังล้อมรอบสองชั้นประกอบกันขึ้นเป็น virion

ค. อนุภาคไวรัสจำนวนมากในผลึกโปรตีน และที่จับเป็นกลุ่ม (ศรชี้) ในบริเวณ virogenic stroma (VS) ในภาพแสดง vesicular membranous profile (MP)

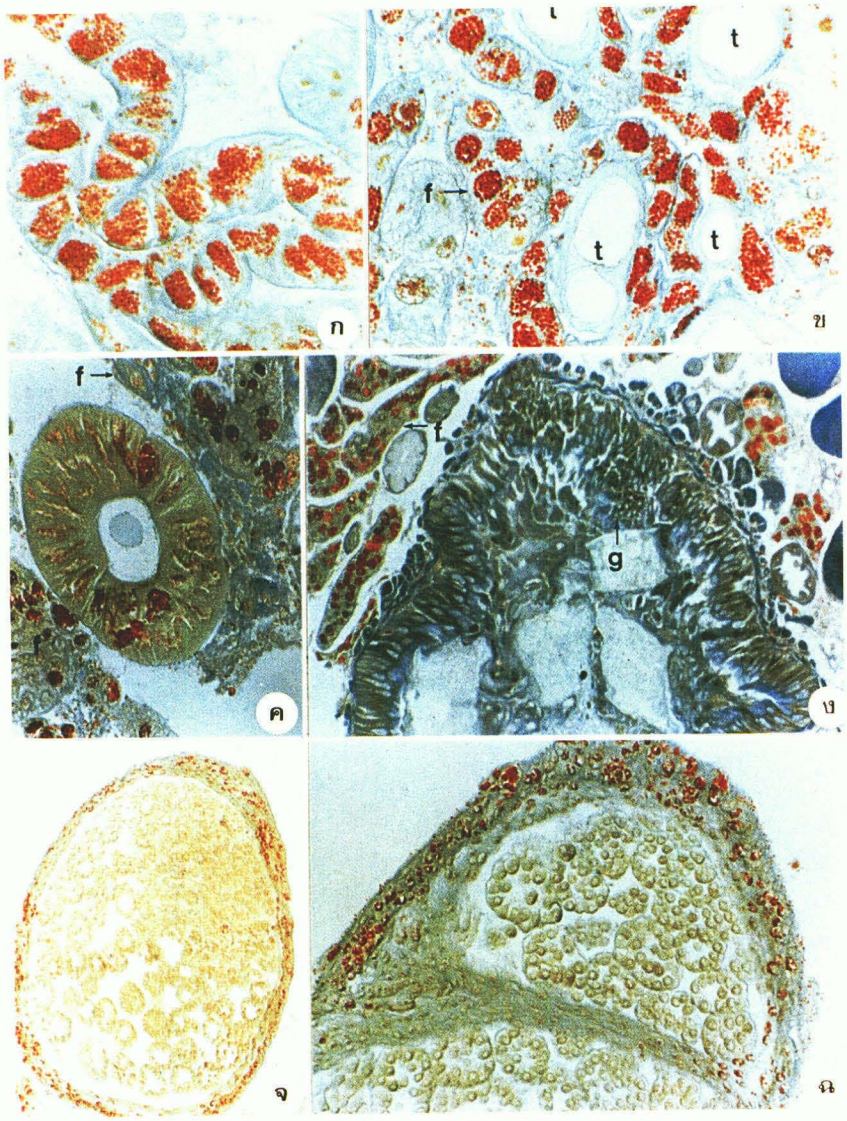
ง. ภาพขยายของ nucleocapsids ที่จับเป็นกลุ่มอยู่ในนิวเคลียสของเซลล์



รูปที่ 3. **Paraffin sections** ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนอนไหม *Bombyx mori* ที่เป็นโรคอันเกิดจากเชื้อ **NPV** ก. เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ข. เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหนอนไหมปกติ 75% ค.-ช. เนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของหนอนไหมที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย สังเกตได้จากนิวเคลียสที่ขยายใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีผลึกโปรตีนติดสีแดงเข้มบรรจุอยู่ภายใน

c = cuticle h = hypodermis f = fat cells m = muscle cells t = tracheal matrix cells ma = malpighian tubules g = gut epithelial cells

(กำลังขยายรูป ค., ง. และ ช. 75×, รูป จ. 40× และ รูป ฉ. 90×)



รูปที่ 4. **Paraffin sections** ของเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของหนอนไหม *Bombyx mori* ที่เป็นโรคอันเกิดจากเชื้อ NPV

ก. เนื้อเยื่อไขมันแสดงนิวเคลียสที่ขยายใหญ่มีผลึกโปรตีนอยู่ภายใน (300×)

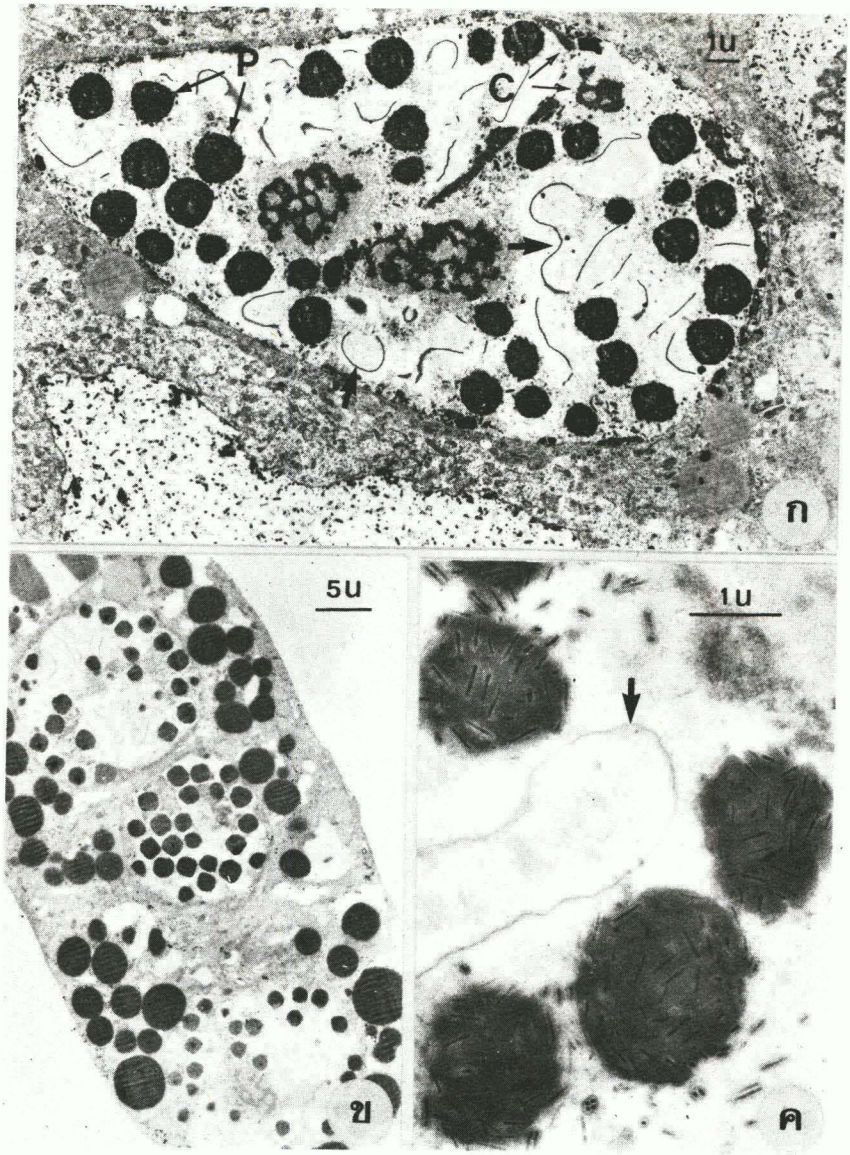
ข. เซลล์รอบท่ออากาศ ที่ถูกทำลายอย่างรุนแรง (163×)

ค. ต่อมผลิตเส้นใย ถูกไวรัสเข้าทำลาย (120×)

ง. เซลล์รอบท่ออาหาร

จ. เซลล์รอบอัณฑะแสดงลักษณะการถูกเข้าทำลาย (40×)

ฉ. ภาพขยายเซลล์รอบอัณฑะมีนิวเคลียสขยายใหญ่และติดสีแดงแสดงว่ามีผลึกโปรตีนบรรจุอยู่ภายใน (90×)



รูปที่ 5. ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงโครงสร้างต่าง ๆ ในนิวเคลียสของเซลล์ไขมันของหนอนไหม *Bombyx mori* ที่ถูกเชื้อ NPV เข้าทำลาย

ก. นิวเคลียสของเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นจนเกือบเต็มเซลล์ chromatin (C) เคลื่อนไปอยู่ริมขอบนิวเคลียส polyhedra (P) อยู่กระจายในนิวเคลียส และมี membrane profile เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก (ศรชี้)

ข. เนื้อเยื่อไขมันที่ถูกไวรัสเข้าทำลายจนโครงสร้างต่าง ๆ ในเซลล์เสียรูปทรงไป

ค. ผลึกโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ และ vesicular membrane profile (ศรชี้)