

## สัณฐานวิทยาของเชื้อ BmNPV ในประเทศไทย

วัชรพร ปัตลา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

สิงหาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

# สัณฐานวิทยาของเชื้อ BmNPV ในประเทศไทย

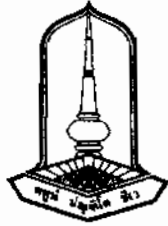
วัชรพร ปัตลา

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา


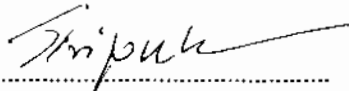
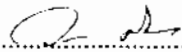
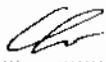
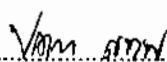
สิงหาคม 2558

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

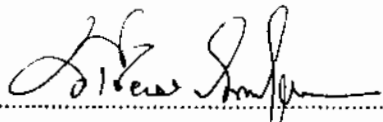



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาววัชรพร ปัตลา  
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีพวิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... (อาจารย์ ดร.วรรณชัย ชาแทน)	ประธานกรรมการ (อาจารย์บัณฑิตศึกษาประจำคณะ)
 ..... (ผศ.ดร.สิริกัก สุระพร)	กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก)
 ..... (ผศ.ดร.วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์)	กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม)
 ..... (ผศ.ดร.หทัยทิพย์ อุดชาชน)	กรรมการ (อาจารย์บัณฑิตศึกษาประจำคณะ)
 ..... (ผศ.ดร.ปริญดา แข็งขัน)	กรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิ)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีพวิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

  
.....  
(ศ.ดร.วิเชียร มากดุน)  
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

  
.....  
(ศ.ดร.ประติษฐ์ เทอดทูล)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
วันที่ ๑ เดือน ๙.๑. พ.ศ. 2558

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริภักดิ์ สุระพร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำแนะนำในการทดลอง และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เป็นที่เรียบร้อย และกราบขอบพระคุณอย่างสูงยิ่งสำหรับ คำอบรมสั่งสอน ที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินชีวิต ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ศิริวัฒน์เมธานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำตลอดจนช่วยเหลือ ด้านต่างๆ ระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วรรณชัย ชาแท่น ประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หทัยทิพย์ อุดชาชน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญดา แข็งขัน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ (ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก) ที่สละเวลา ในการร่วมเป็นกรรมการสอบและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ทุกท่านที่ให้ความรู้คำแนะนำ ให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณนวลอนงค์ นาคคง เจ้าหน้าที่ศูนย์บริการเครื่องมือด้านวิทยาศาสตร์ คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความช่วยเหลือแนะนำในการเก็บตัวอย่าง การเตรียม ตัวอย่างงานวิจัยเพื่อใช้ในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ตลอดจนให้คำแนะนำการใช้ อุปกรณ์ เครื่องมือ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจนสิ้นสุดกระบวนการวิจัย

ขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความ อนุเคราะห์เรื่อง สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการ พร้อมทั้งให้คำแนะนำและกำลังใจที่ดี เสมอมา

ขอขอบคุณ ศูนย์บริการเครื่องมือ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณ ศูนย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติฯ จังหวัดเชียงใหม่ แพรว น่าน ตาก สระบุรี ชุมพร นราธิวาส เลย อุบลราชธานี มุกดาหาร ร้อยเอ็ด ชัยภูมิ และจังหวัดศรีสะเกษ ที่ให้ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยง ไหมในเขตพื้นที่บริการ

ขอขอบคุณ ร้อยตำรวจตรี สมคิด มาพั้ว รองสารวัตรปราบปราม สภ.เขาค้อ ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างพื้นที่อำเภอเขาค้อเป็นอย่างดี ขอขอบคุณ ส.อบต.ประสิทธิ์ อิมจันทร์ เกษตรกรจังหวัดเพชรบูรณ์ คุณสงวน นาน้ำ เกษตรกรจังหวัดพะเยา คุณพิบูล ตาดี เกษตรกรจังหวัด เชียงราย คุณปัดดี ภัคดี เกษตรกรจังหวัดขอนแก่น คุณอนงค์ การนอก เกษตรกรจังหวัดนครราชสีมา คุณชูโล เชื้อสิริ เกษตรกรจังหวัดชัยภูมิ คุณสว่างศรี สุวรรณทอง เกษตรกรจังหวัดสุโขทัย คุณสมจิต เพิ่มพูน เกษตรกรจังหวัดตาก คุณมณูญ ศิริเวทย์ เกษตรกรจังหวัดกำแพงเพชร คุณปรากฏ ทองคำสิงห์ เกษตรกรจังหวัดอุทัยธานี คุณดวงตา เกษตรกรจังหวัดกาญจนบุรี และเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในประเทศไทยทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือในการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาทำการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณบุญประคอง – คุณณัฐมล โคตรพัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุน ค่าใช้จ่าย และให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคกลางตลอดการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณอดุลย์ – คุณกรรณิการ์ พันธุ์โพธิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุน ค่าใช้จ่าย และให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างในพื้นที่ภาคใต้ตลอดการวิจัยด้วยดีเสมอมา

และขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อกงมา – คุณแม่สังวร ปัตลา เป็นอย่างสูงยิ่งที่คอยเป็น  
กำลังใจ พร้อมทั้งร่วมเดินทางตลอดการเดินทางเก็บตัวอย่างในแต่ละภูมิภาค และให้ทุนในการทำวิจัยนี้  
จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

วัชรพร ปัตลา

ชื่อเรื่อง	สัณฐานวิทยาของเชื้อ BmNPV ในประเทศไทย
ผู้วิจัย	นางสาววัชรพร ปัตลา
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา ชีววิทยา
กรรมการควบคุม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิริภักดิ์ สุระพร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ปีที่พิมพ์ 2558

### บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของ *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) สาเหตุโรคแกระสเซอร์ในหนอนไหม โดยทำการเก็บตัวอย่างหนอนไหมวัย 4 และวัย 5 ที่แสดงอาการของโรคแกระสเซอร์จากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในประเทศไทย จำนวน 26 จังหวัด คือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 14 จังหวัด ภาคเหนือ 7 จังหวัด ภาคกลาง 3 จังหวัด และภาคใต้ 2 จังหวัด ทำการตัดขาเทียมหนอนไหม เพื่อแยกผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) จากเลือดหนอนไหม ด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำ BmNPV มาศึกษาความบริสุทธิ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ศึกษาสัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) และศึกษาโครงสร้างอนุภาคไวรัส ที่อยู่ภายในผลึกโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตามลำดับ พบว่า สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน BmNPV ที่ทำการสำรวจในประเทศไทย มี 4 รูปแบบ ได้แก่ รูปสี่เหลี่ยม (cuboidal shape) รูปหกเหลี่ยม (hexagonal shape) รูปแปดเหลี่ยม (octagonal shape) และรูปทรงกลม (globular shape) สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีนที่พบมากที่สุดในประเทศไทย คือ รูปทรงกลม และรูปหกเหลี่ยม รองลงมาคือ รูปสี่เหลี่ยม และรูปแปดเหลี่ยม คิดเป็นร้อยละ 100, 100, 84.61 และ 73.07 ของพื้นที่ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ และโครงสร้างอนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรง 2 รูปแบบ คือ SBmNPV และ MBmNPV คิดเป็นร้อยละ 38.46 และ 61.53 ของพื้นที่ที่ทำการศึกษา ตามลำดับ ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นด้านความหลากหลายของสัณฐานวิทยาของ BmNPV ที่พบในประเทศไทย เพื่อนำไปสู่การศึกษาความรุนแรงของ BmNPV สาเหตุของโรคแกระสเซอร์ต่อไป

**คำสำคัญ:** แกระสเซอร์, นิวคลีโอโพลีฮีดรไวรัส, หนอนไหม, นิวคลีโอแคพสิด, ผลึกโปรตีนไวรัส

**TITLE** Morphology of BmNPV in Thailand  
**AUTHOR** Miss Watcharaporn Pattala  
**DEGREE** Master degree of Science      **MAJOR** Biology  
**ADISORS** Assist Prof. Siripuk Suraporn, Ph.D.  
                  Assist Prof. Wanwisa Siritwatanametanon, Ph.D.  
**UNIVERSITY** Mahasarakham University      **YEAR** 2015

### ABSTRACT

The aim of this study is to investigate the morphology *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; BmNPV in Thailand. BmNPV causes grassery disease of silkworm, *Bombyx mori* is the most severe disease in Thai sericulture. Grassery infected silkworm larvae at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> were surveyed and collected in 26 provinces from 4 regions. There were 14 provinces in the Northeast, i.e., 7 provinces in the North, 3 provinces in the Center, and 2 provinces in the South. BmNPV-polyhedra was harvested by cutting the prolegs. Haemolymph including BmNPV – polyhedral was separated by centrifugation. BmNPV – polyhedra was determined by using light microscope. Morphology of BmNPV-polyhedra and nucleocapsid were observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM), respectively. The results showed the morphology of BmNPV-polyhedra were 4 shapes. They were cuboidal, hexagonal, octagonal and globular. The hexagonal and globular were in 100 % of silkworm collections, the cuboidal and octagonal were 84.61 % and 73.07 %, respectively. The nucleocapsid pattern shown in 2 types; single-embedded nucleocapsid (SBmNPV) and multiple-embedded nucleocapsid (MBmNPV). They were 38.46 % and 61.53 % of sample collection areas, respectively. The result obtained from this study will be the basic information for the further study or virulence determination of grassery disease caused by BmNPV in Thailand.

**Keyword:** Grassery disease, Nucleopolyhedrovirus, *Bombyx mori*, Nucleocapsid, Polyhedra inclusion body

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพประกอบ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.5 สถานที่ทำการวิจัย	2
1.6 แผนการดำเนินการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส	3
2.2 โรคแกรสเซอร์	6
2.3 ไหม	9
2.4 ชิพจักรและการเจริญเติบโตของไหม	10
2.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	11
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
3.1 แหล่งที่มาของไวรัส	18
3.2 การแยกผลึกโปรตีนไวรัส (BmNPV-polyhedra)	18
3.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra)	19
3.4 การศึกษาอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV	20
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปราย	21
4.1 การแยก BmNPV จากหนอนไหม	21
4.2 สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน BmNPV	23
4.3 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid)	38
บทที่ 5 สรุปผล	47
เอกสารอ้างอิง	48
ประวัติย่อผู้วิจัย	55

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 4.1 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปสี่เหลี่ยม ที่ศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหม ที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้	26
ตาราง 4.2 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปหกเหลี่ยม ที่ศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหม ที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้	27
ตาราง 4.3 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปแปดเหลี่ยม ที่ศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหม ที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ ของแหล่งเลี้ยงไหม จำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้	28
ตาราง 4.4 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปทรงกลม ที่ศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหม ที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้	29
ตาราง 4.5 ขนาดความกว้าง และความยาว ของอนุภาคไวรัส BmNPV วัดจากอนุภาคไวรัส จำนวน 5 อนุภาค ต่อ พื้นที่ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	40

สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 2.1 ลักษณะของผลึกโปรตีน (polyhedra inclusion bodies) ของ NPV หนอนไหม	5
ภาพประกอบ 2.2 อาการโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหม	7
ภาพประกอบ 2.3 กระบวนการเข้าทำลายของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส	9
ภาพประกอบ 2.4 วงจรชีวิตของไหม (Bombyx mori)	11
ภาพประกอบ 2.5 แสดงชนิดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	13
ภาพประกอบ 3.1 แผนที่ประเทศไทย และแสดงพื้นที่ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง BmNPV จากหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์	19
ภาพประกอบ 4.1 แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมวัย 5 ระยะสุดท้าย โดยผนังลำตัวมีผนังเปราะบาง และแตกในที่สุด ปล่อน้ำเลือด สีเหลืองขุ่นที่มีผลึกโปรตีน BmNPV ไหลออกมา	22
ภาพประกอบ 4.2 ลักษณะของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) เมื่อตรวจดูด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า	22
ภาพประกอบ 4.3 สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) จากการศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)	24
ภาพประกอบ 4.4 สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) จากพื้นที่ 26 จังหวัด ที่ทำการศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM)	30
ภาพประกอบ 4.5 แสดงจำนวนผลึกโปรตีนแต่ละรูปร่างของผลึกโปรตีน BmNPV จากจำนวน 100 ผลึก/พื้นที่	35
ภาพประกอบ 4.6 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) จากการศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)	39
ภาพประกอบ 4.7 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)	41
ภาพประกอบ 4.8 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาคเหนือ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)	44
ภาพประกอบ 4.9 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาคกลาง จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)	45

ภาพประกอบ 4.10 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาควัสดุ  
จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน  
(Transmission Electron Microscope; TEM)

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ไหม (*Bombyx mori*) เป็นแมลงที่มีประโยชน์ในเชิงการค้าและอุตสาหกรรมการส่งออกของประเทศไทย ไหมสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นสิ่งทอและเครื่องนุ่งห่ม ในปัจจุบันได้มีการนำประโยชน์ของไหมมาประยุกต์ใช้ในด้าน เครื่องสำอาง และการแพทย์ (สถาบันวิจัยหม่อนไหม, 2540)

การเลี้ยงไหมในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจังหวัดมหาสารคาม เป็นพื้นที่ ที่มีการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมมากที่สุด ผลิตภัณฑ์จากไหมสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรและเป็นสินค้าส่งออกนำเงินตราเข้าประเทศเป็นจำนวนมาก (กรมศุลกากร, 2555) อุปสรรคและปัญหาของการเลี้ยงไหม คือ ปัญหาเรื่องโรค และโรคที่สำคัญที่ทำให้ความเสียหายแก่การเลี้ยงไหมมากที่สุด คือ โรคแกรสเซอร์ (grassery) หรือที่เรียกตามภาษาพื้นบ้านในประเทศไทยว่า โรคเตื่อโรคกระเที หรือ โรคตัวเหลือง โรคแกรสเซอร์เกิดจากไวรัส *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) ซึ่งเป็นไวรัสของแมลงอยู่ในวงศ์ Baculoviridae สกุล *Alphababaculovirus* (Goodman *et al.* 2007) BmNPV ที่พบในประเทศไทย มีอนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรง มีขนาด 370 x 45 นาโนเมตร ฝังตัวแบบอนุภาคเดี่ยว ในผลึกโปรตีนที่เป็นรูปลิ่มเหลี่ยมและหกเหลี่ยมขนาด 2.7 ไมโครเมตร (ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพนิช สิ้นชัยศรี, 2531) จากการสำรวจโดยใช้แบบสอบถามกับเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในจังหวัดมหาสารคาม พบว่า ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการเลี้ยงไหม คือ ปัญหาโรคแกรสเซอร์ (พรรณณา ศักดิ์สูง และชาญชัย ถาวรอนุกุลกิจ, 2540) โรคแกรสเซอร์ทำความเสียหายให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในแต่ละรุ่นสูงถึง 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (งษ์ชัย ลิทธิสงคราม และสมณิ รักสังข์, 2529) เนื่องจากหนอนไหมที่ได้รับ BmNPV ในระยะแรกจะไม่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์ แต่จะแสดงอาการของโรคชัดเจนในหนอนไหมวัย 5 ซึ่งเป็นระยะที่สร้างรัง ทำให้เกษตรกรเสียเวลาและทรัพยากรในการเลี้ยงไหม แต่ไม่ได้ผลผลิต (Kumpratueang, 1998)

จากปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญของโรคแกรสเซอร์ที่ทำให้ความเสียหายต่อการเลี้ยงไหมในประเทศไทย จึงมีการศึกษาสัณฐานวิทยาของ BmNPV ได้แก่ รูปร่างของผลึกโปรตีน (BmNPV - polyhedra inclusion body) และอนุภาคไวรัส (BmNPV - nucleocapsid) เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับ BmNPV ในประเทศไทย ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

### 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาของ BmNPV ของหนอนไหมในประเทศไทย ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อน

1.2.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน และโครงสร้างอนุภาคไวรัส (nucleocapsid) BmNPV ของหนอนไหมที่พบในพื้นที่ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ของประเทศไทย



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus; NPV) จัดอยู่ในวงศ์ Baculoviridae สกุล *Alphabaculovirus* (Goodman *et al.*, 2007) เป็นไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายหนอนไหม เพิ่มปริมาณในหนอนไหมได้รวดเร็วและมีขนาดใหญ่ สามารถศึกษาได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง คุณลักษณะพิเศษของไวรัสชนิดนี้คือ มีผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทำให้มีความคงทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เก็บรักษาไว้ได้นานโดยไม่เสื่อมประสิทธิภาพ ออกฤทธิ์รุนแรง และสามารถทำลายหนอนไหมได้ในเวลารวดเร็ว (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535) นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส เป็นไวรัสชนิดแรกที่พบในแมลงและตัวแรกที่พบคือ นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสของหนอนไหม ที่ทำให้เกิดโรคจวนไคส์ (jaundice) หรือ แกรสเซอร์ (grassery) (Cornalia, 1856; Maestri, 1856) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ในปี ค.ศ. 1947 Bergold เป็นคนแรกที่แสดงให้เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนว่ามีอนุภาคไวรัสอยู่ภายในผลึกโปรตีน ปัจจุบันนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสมากกว่า 300 ชนิด สามารถทำลายแมลงในอันดับ Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Neuroptera, Coleoptera และ Trichoptera (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535)

##### 2.1.1 องค์ประกอบของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

##### 1) ผลึกโปรตีน

ผลึกโปรตีนของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส เรียกว่า polyhedra inclusion body มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.4 ถึง 2.5 ไมโครเมตร (Moser *et al.*, 2001) ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่เรียกว่า โพลีฮีเดริน (polyhedrin) มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ถึง 33,000 ดาลตัน (Faulkner, 1981) โมเลกุลของโปรตีนจัดเรียงตัวกันเป็นผลึก (paracrystalline) (Cheng *et al.*, 1998) อาจเป็นแบบจุด (dot pattern) หรือเป็นแถวต่อกัน (line pattern) ภายในผลึกโปรตีนมีนิวคลีโอแคปซิดจำนวนต่างกัน และมีนิวคลีโอแคปซิดจำนวนมากที่อยู่เป็นอิสระภายนอกผลึกโปรตีน Shapiro *et al.* (2004) รายงานโครงสร้างของผลึกโปรตีนเป็นรูปหลายเหลี่ยม, รูปหกเหลี่ยม, รูปสี่เหลี่ยม, รูปทรงกลม (ภาพประกอบ 2.1 ก) และมีผนังล้อมรอบผลึกโปรตีน เรียกว่า polyhedral membrane

##### 2) อนุภาคไวรัส

อนุภาคไวรัส มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod-shaped) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอเส้นคู่ (doublestranded DNA) พันเป็นเกลียววงกลมปิด (Miller, 1996) แคปซิดประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย เรียงตัวกันเป็นชั้นซ้อนกันหรือเป็นเกลียวแล้วแต่ชนิดของไวรัส (ภาพประกอบ 2.1 ข) นิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) ของ นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส มีผนังล้อมรอบเป็นชั้นไขมันหนาทั้งสองข้างด้วยชั้นโปรตีน (triple-layered lipoprotein membrane) (Bilimoria, 1986) เหมือนที่พบกับไวรัสของสัตว์อื่นทั่วไป นิวคลีโอแคปซิดที่มีผนังล้อมรอบนี้เรียกว่า วิริออน

(virion) จากการศึกษาของ Bergold (1963) พบว่า นิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส ของหนอนไหม แบ่งตาม ลักษณะโครงสร้างของไวรัสออกเป็น 2 ชนิด คือ ในผลึกโปรตีน มี ไวริออนที่ประกอบด้วย นิวคลีโอแคพซิด ฝังตัวแบบอนุภาคเดี่ยวกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีน (single - embedded NPV; SNPV) ไวริออนมี ขนาดกว้าง 40 ถึง 70 นาโนเมตร ยาว 260 ถึง 400 นาโนเมตร และ ไวริออนที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคพซิด ตั้งแต่ 1 ถึง 39 อนุภาค ฝังตัวกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีน (multiple-embedded NPV; MNPV) ซึ่งขนาดของไวรัสขึ้นอยู่กับจำนวนนิวคลีโอแคพซิด ที่อยู่ภายในไวรัส (ภาพประกอบ 2.1 ค)

ขนาดของอนุภาคไวรัส ของหนอนไหมที่พบมีรายงานที่ต่างกันกล่าวคือ Himeno และคณะ (1968) พบว่า มีขนาดเฉลี่ย 340 x 45 นาโนเมตร ในขณะที่ Khosaka และคณะ (1971) รายงานไว้ว่าอนุภาคไวรัสมี 2 ขนาด คือ 330 x 80 นาโนเมตร ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนตรงหนา (thick-rod shape) และขนาด 360 x 60 นาโนเมตร มีรูปร่างเป็นท่อนยาวเรียว (slender-rod shape) ซึ่งเชื่อว่า อาจเป็นเพราะสารเคมีและกระบวนการที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง สำหรับในประเทศไทย ทิพย์วดี อรรถธรรม และ เนื่องพนิช สิ้นชัยศรี (2531) สุ่มตรวจเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า อนุภาคไวรัสมีขนาด 340 x 45 นาโนเมตร และมีรูปร่างเป็นท่อนตรง

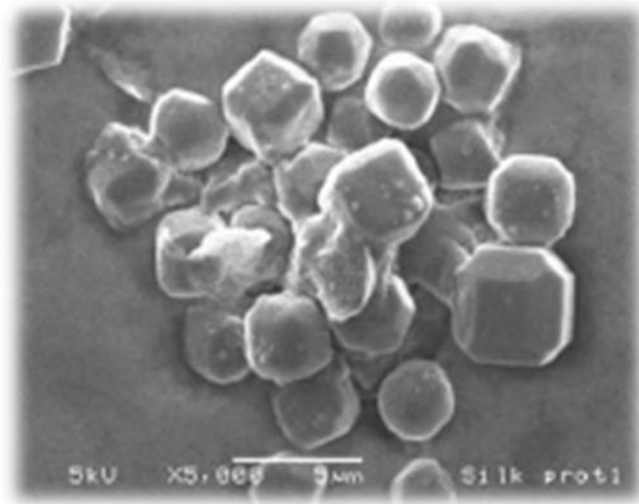
#### 2.1.2 สารพันธุกรรมของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส

จีโนมของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส เป็น DNA ที่มีขนาด 80 ถึง 180 กิโลเบส (Gomi *et al.*, 1999) ดีเอ็นเอเป็นเส้นคู่พันเป็นเกลียววงกลมปิด มีองค์ประกอบของเบสที่เป็น adenine และ thymine (A + T content) ประมาณ 40 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วแต่ชนิดของไวรัส (Miller, 1996) ยีนบนจีโนม ของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส ที่มีศักยภาพในการแสดงออก จะกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอบนเส้นดีเอ็นเอทั้งสองเส้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2549) จีโนมของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส สามารถรับชิ้นส่วนของยีน transposable elements ของเซลล์เจ้าบ้านได้ (Friesen, 1993) เช่น ยีน *egt* (endosteroid UDP – glucosyl transferase gene) ที่พบในนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส มีต้นกำเนิดมาจากแมลงอาศัยของไวรัส (Ayres *et al.*, 1994) ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจำลองตนเองของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส เพื่อเพิ่มปริมาณขณะเข้าทำลายเซลล์หนอนไหมนั้นถูกควบคุมด้วยกลุ่มของยีนบนจีโนม ซึ่งจะเกิดขึ้นแบบต่อเนื่องกันโดยการทำงานของยีนหนึ่งไปกระตุ้นให้ยีนลำดับต่อไปทำงานจนสิ้นสุดกระบวนการทำลายหนอนไหม (Friesen and Miller, 1986) การควบคุมการเข้าทำลายหนอนไหมของไวรัสด้วยยีน แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ

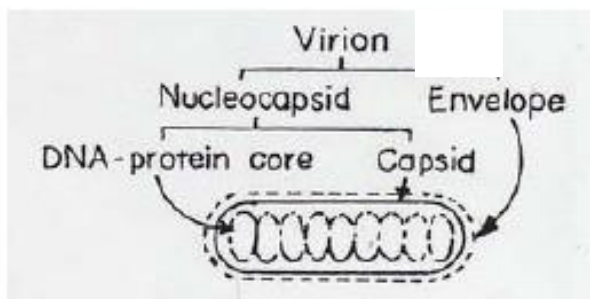
กลุ่มที่เริ่มทำงานทันทีเมื่อนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัสเข้าไปในเซลล์ของหนอนไหม (Early genes) นิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส จะสังเคราะห์อาร์เอ็นเอขึ้นภายใน 15 ถึง 60 นาที เพื่อใช้เป็นไพรเมอร์ในการจำลองตัวของดีเอ็นเอไวรัส (Kogan and Blissard, 1994)

กลุ่มของยีนที่เริ่มทำงานเมื่อนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัสเริ่มสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Late genes) หลังจากหนอนไหมได้รับเชื้อ 6 ถึง 8 ชั่วโมง (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2549) การทำงานของ Late genes เกิดขึ้นในช่วงเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง (Morris and Miller, 1994) ยีนในกลุ่มนี้มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนโครงสร้างของไวรัส ซึ่งได้แก่ โปรตีนของอนุภาคไวรัส และไกลโคโปรตีนของผนังล้อมรอบอนุภาคไวรัส (Lu and Miller, 1997)

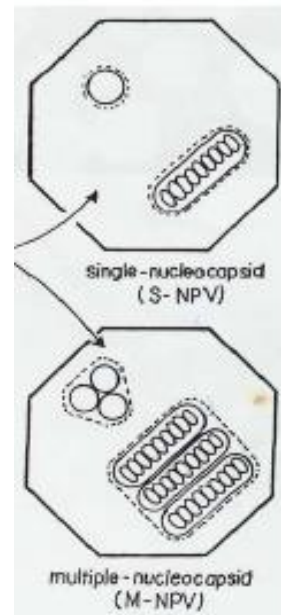
กลุ่มยีนที่ทำงานในช่วงสุดท้ายของกระบวนการเข้าทำลายหนอนไหม (Very late genes) ซึ่งจะเริ่มทำงานหลังจากไวรัสเข้าไปในหนอนไหม 20 ถึง 72 ชั่วโมง ยีนในกลุ่มนี้ควบคุมการสร้างโปรตีนของไวรัสที่สำคัญ ได้แก่ ผลิตโปรตีน (polyhedra) (Vlak *et al.*, 1988)



ก.



ข.



ค.

ภาพประกอบ 2.1 ลักษณะผลิตโปรตีน (BmNPV-polyhedra) ของ NPV หนอนไหม

ก) ลักษณะผลิตโปรตีนที่ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

ข) องค์ประกอบของไวรัสของ BmNPV

ค) ลักษณะไวรัสของ BmNPV (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2535)

## 2.2 โรคแกรสเซอร์

### 2.2.1 อาการของโรคแกรสเซอร์

หนอนไหมได้รับไวรัส BmNPV โดยการกิน เมื่อผลึกโปรตีนเข้าไปสู่กระเพาะอาหาร ส่วนกลางของหนอนไหมภายใน 12 ถึง 24 ชั่วโมง หนอนไหมวัย 1 ถึงวัย 3 จะมีความอ่อนแอต่อโรค มากกว่าหนอนไหมวัย 4 ถึงวัย 5 ในระยะเริ่มแรกของการเกิดโรค หนอนไหมจะมีการเคลื่อนไหวช้าลง ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ไม่กินอาหาร ผงลำตัวจะมีลักษณะเป็นมันเหมือนเปียกน้ำ ลวดลายและสีสันตามลำตัวซีดจางลง จนเป็นสีขาวครีม มีลักษณะเป็นก้อนสีขาว เป็นจ้ำตามลำตัว ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อไขมันใต้ผงลำตัวขยายใหญ่ขึ้น และ รวมตัวกัน ตัวหนอนไหมจะหดสั้นบวม เห็นข้อปล้องได้ชัดเจน เลือดซึ่งปกติใสไม่มีสีจะมีความหนืด และข้นขึ้นเป็นสีขาว หนอนไหมจะแสดงอาการที่เป็นลักษณะพิเศษของ นิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส คือ ก่อนตายจะกระวนกระวายและไต่ขึ้นไปบนที่สูง เช่น ยอดกิ่งไม้หรือใบไม้ และตายในลักษณะแขวนด้วยขาเทียมคู่หลังกับยอดไม้ ห้อยส่วนหัวลงมา เมื่อหนอนไหมตายสีลำตัวจะเปลี่ยนไปอย่างรวดเร็วเป็นสีเข้มขึ้นจนดำ ลำตัวอ่อนนุ่มไม่คงรูปทรง อวัยวะภายในเหลวและกลายเป็นถุงน้ำห้อยแขวนอยู่ ผงลำตัวเปราะบาง และจะแตกสลายทันทีเมื่อสัมผัส เมื่อผงลำตัวแตกผลึกโปรตีนจำนวนมาก จะไหลออกมาติดตามกิ่งไม้ใบไม้หรือตกลงบนพื้น (มาลี ตั้งระเบียบ, 2536)

อาการของโรคแกรสเซอร์แสดงในภาพประกอบ 2.2



ภาพประกอบ 2.2 อาการโรคแกระสเซอร์ในหนอนไหม ก) ลักษณะหนอนไหมวัย 5 อาการปกติ ข) หนอนไหมวัย 5 แสดงอาการของโรคแกระสเซอร์อย่างรุนแรง โดยมีอาการตัวสีเหลืองซีด ค) หนอนไหมจะปล่อยน้ำเลือดที่มีผลึกโปรตีนของนิวคลีโอโพลีดีโรไวรัส ออกมา ง) อาการหนอนไหมก่อนตายจะปีนป่าย ขึ้นไปเกาะตามที่สูง ใช้ขาเทียมเกาะตามขอบภาชนะแล้วห้อยหัวลงเป็นรูปตัววี (V) หัวกลับที่เป็นสัญลักษณ์ของโรคแกระสเซอร์ (Kumprateang, 1998)

### 2.2.2 การเข้าทำลายของ BmNPV (BmNPV Infection)

BmNPV เป็น DNA ไวรัส ที่สร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส เมื่อไวรัสทำลายหนอนไหมตาย และพร้อมที่จะออกมาภายนอกตัวหนอนไหม BmNPV จะสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2549) ดังนั้นผลึกโปรตีนจึงเป็นเพียงเกราะป้องกันอนุภาคไวรัส ไม่ให้สูญเสียสภาพ อันเกิดจากปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม เช่น แสงแดด และความชื้น เมื่อหนอนไหมกินเชื้อนิวคลีโอโพลีดีโรไวรัส เข้าไปในร่างกาย จึงมีกระบวนการย่อยสลายผลึกโปรตีนก่อนเพื่อปล่อยอนุภาคไวรัสเข้าทำลายหนอนไหม (Dow, 1984) ไวรัสนี้จะเข้าทำลายหนอนไหมด้วยการเพิ่มปริมาณในนิวเคลียสของเซลล์เท่านั้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เขยชมศรี, 2530) จึงเป็นที่มาของเชื้อไวรัส และความหมายของนิวคลีโอโพลีดีโรไวรัส (NPV) การเข้าทำลายหนอนไหมของ BmNPV แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

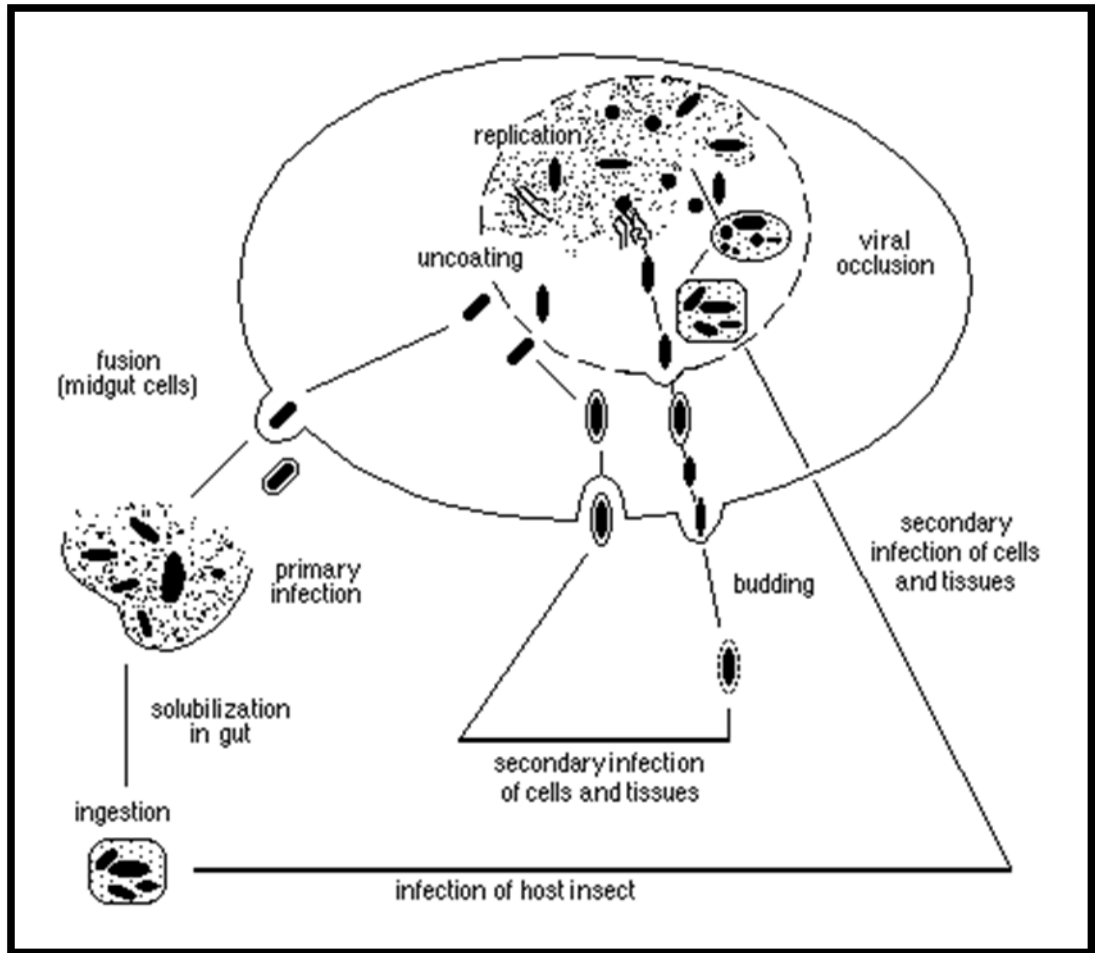
การเข้าทำลายระยะที่หนึ่ง (primary infection)

เริ่มจากหนอนไหมกินผลึกโปรตีนของไวรัส BmNPV ที่ปนเปื้อนมากับใบหม่อน (Vega and Kaya, 2012) ผลึกโปรตีนจะถูกย่อยสลายที่กระเพาะอาหารส่วนกลางของหนอนไหม น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของหนอนไหมมีค่าความเป็นด่าง pH 9 ถึง 11 (Dow, 1984) สามารถย่อยสลายผลึกโปรตีนของไวรัส เมื่อผลึกโปรตีนของไวรัสย่อยสลายแล้วอนุภาคไวรัสจะถูกปล่อยออกมาจาก

ผลึกโปรตีนอย่างอิสระ เรียกว่าไวรัสระยะนี้ว่า occlusion – derived virions หรือ ODVs อนุภาคไวรัสจะเคลื่อนที่ผ่านผนังกระเพาะอาหาร ที่เรียกว่า peritrophic membrane ที่มีลักษณะเป็นเส้นใยประกอบด้วยสารไคติน และโปรตีนที่กั้นกระเพาะอาหารส่วนกลางกับเซลล์รอบท่ออาหาร จากนั้นผนังที่ล้อมรอบอนุภาคไวรัส และผนังกระเพาะอาหารจะเชื่อมต่อกัน (Kawanishi *et al.*, 1972; Granados and Lawler, 1981) อนุภาคไวรัสจะถูกผลักเข้าไปในเซลล์ของกระเพาะอาหารซึ่งจะตรงไปที่นิวเคลียส (Russell *et al.*, 1997) เมื่ออยู่ในนิวเคลียส อนุภาคไวรัสจะเพิ่มปริมาณโดยเข้าควบคุมการทำงานของเซลล์ และอาศัยวัตถุดิบที่เซลล์ของหนอนไหมเพื่อสร้างอนุภาคไวรัสขึ้นใหม่ (Ohkawa *et al.*, 2010) และทำการเพิ่มปริมาณจนผนังนิวเคลียสของเซลล์กระเพาะอาหารหนอนไหมแตก อนุภาคไวรัสจะเคลื่อนที่ออกจากเซลล์กระเพาะอาหาร แล้วเข้าไปในช่องว่างในลำตัวหนอนไหม (Vega and Kaya, 2012) เพื่อเริ่มกระบวนการเข้าทำลายขั้นต่อไป

#### การเข้าทำลายระยะที่สอง (Secondary infection)

เมื่ออนุภาคไวรัสออกจากเซลล์รอบท่อกระเพาะอาหารของหนอนไหมด้วยกระบวนการ budding เข้าไปในช่องว่างในลำตัวของหนอนไหม เรียกอนุภาคไวรัสแบบนี้ว่า budded virion หรือ BV (ทิพย์วดี อรรถธรรม, 2549) จะเคลื่อนที่ไปยังเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ไวรัสที่มีความจำเพาะที่จะเข้าทำลาย นิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส ส่วนใหญ่เข้าทำลายเนื้อเยื่อได้หลายชนิด (Rahman and Gopinathan, 2004) ซึ่งเนื้อเยื่อ และ เซลล์ ที่แสดงให้เห็นได้ชัด คือ เซลล์เม็ดเลือด เซลล์ไขมัน เซลล์รอบท่ออากาศ อนุภาคไวรัสจะเพิ่มปริมาณจำนวนมากอย่างรวดเร็วในเซลล์เม็ดเลือดภายใน 15 ชั่วโมง และ 24 ถึง 48 ชั่วโมง สามารถพบในเซลล์ไขมัน เซลล์รอบท่ออากาศของหนอนไหมหลังจากได้รับเชื้อไวรัสเข้าไป (Nappi and Hammill, 1975) เมื่อไวรัสสร้างเป็นอนุภาคที่สมบูรณ์และมีผนังล้อมรอบแล้วก็จะสร้างผลึกโปรตีนล้อมรอบกลุ่มของอนุภาคไวรัสขึ้น นิวเคลียสของเซลล์จะขยายเพิ่มขึ้น 5 ถึง 10 เท่า จากปกติ เพราะอัดแน่นไปด้วยผลึกโปรตีนของไวรัส เมื่อนิวเคลียสบวม เซลล์และเนื้อเยื่อจะขยายใหญ่ขึ้น หนอนไหมที่เป็นโรคจึงมีอาการตัวบวม การขยายใหญ่ขึ้นส่งผลให้เซลล์แตก และปล่อยผลึกโปรตีนจำนวนมากออกมานอกเซลล์ (Federici, 1997) ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่หนอนไหมตาย ผนังลำตัวหนอนไหมแตกสลาย ผลึกโปรตีนของไวรัสถูกปล่อยออกมาภายนอก ตกค้างอยู่บนภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงไหม เพื่อรอการเข้าทำลายหนอนไหมตัวใหม่ และเริ่มวงจรชีวิตของการเข้าทำลายหนอนไหมตัวใหม่ต่อไป (สิริภักดิ์ สุระพร, 2552)



ภาพประกอบ 2.3 กระบวนการเข้าทำลายของนิวคลีโอโพลีดีโรไวรัส  
(Cheryl *et al.*, 2004)

### 2.3 ไหม

ไหม อาจใช้เกณฑ์แตกต่างกันไปในการจำแนก แต่เกณฑ์ที่นิยมนำมาใช้ในการจัดจำแนกประเภทของไหมคือ การจำแนกตามจำนวนครั้งที่ไข่ไหมฟักออกเป็นตัวตามสภาพธรรมชาติในรอบปี ซึ่งแบ่งประเภทของไหมออกเป็น 3 กลุ่ม คือ (สิริภักดิ์ สุระพร, 2552)

หนอนไหมที่ฟักออกได้ปีละ 1 ครั้ง (Univoltine) ไข่ไหมชนิดนี้จะมีการฟักตัวผ่านฤดูหนาว ได้แก่ ไหมที่อยู่ในแถบทวีปยุโรป หนอนไหมจะมีอายุยาวกว่าสายพันธุ์อื่น โดยไข่ไหมจะฟักออกเป็นตัวไหมได้เองตามธรรมชาติปีละครั้งเท่านั้น หนอนไหมตัวใหญ่ เส้นไหมมีคุณภาพดี แต่หนอนไหมไม่แข็งแรง (อารีย์ งามศิริวัฒนกุล, 2539)

หนอนไหมที่ฟักออกได้ 2 ครั้ง ต่อปี (Bivoltine) ไข่ไหมชนิดนี้จะมีอยู่ในเขตอบอุ่น เช่น ประเทศญี่ปุ่น จีน เกาหลี เป็นต้น หนอนไหมมีอายุสั้นกว่าเมื่อเทียบกับพันธุ์ univoltine ต่างกันที่เมื่อครบวงจรชีวิตแรกแล้ว จะสามารถเพิ่มวงจรชีวิตต่อไปได้ในปีเดียวกัน หลังจากนั้นจะฟักตัวผ่านฤดูหนาว

แล้วไปเริ่มวงจรชีวิตในปีถัดไป หนอนไหมแข็งแรง แต่เส้นไหมคุณภาพด้อยกว่า (กมลทิพย์ กสิการ, 2550)

หนอนไหมที่ฟักออกได้ปีละหลายครั้ง (Polyvoltine) พบในเขตร้อน เช่น ไทย ลาว หนอนไหมมีอายุสั้น และมีความแข็งแรงมาก ไช้ไหมชนิดนี้จะไม่มีการพักตัว สามารถฟักเองได้หลังจากที่มีผีเสื้อวางไข่แล้ว 10 ถึง 12 วัน รังไหมมีขนาดเล็ก สามารถสาวเป็นเส้นไหมได้ปริมาณน้อย แต่เส้นไหมมีความมันเงาสูง แต่จะมีปมปมมาก (จิราภา กุลสาริน, 2554)

## 2.4 ชีพจักรและการเจริญเติบโตของไหม

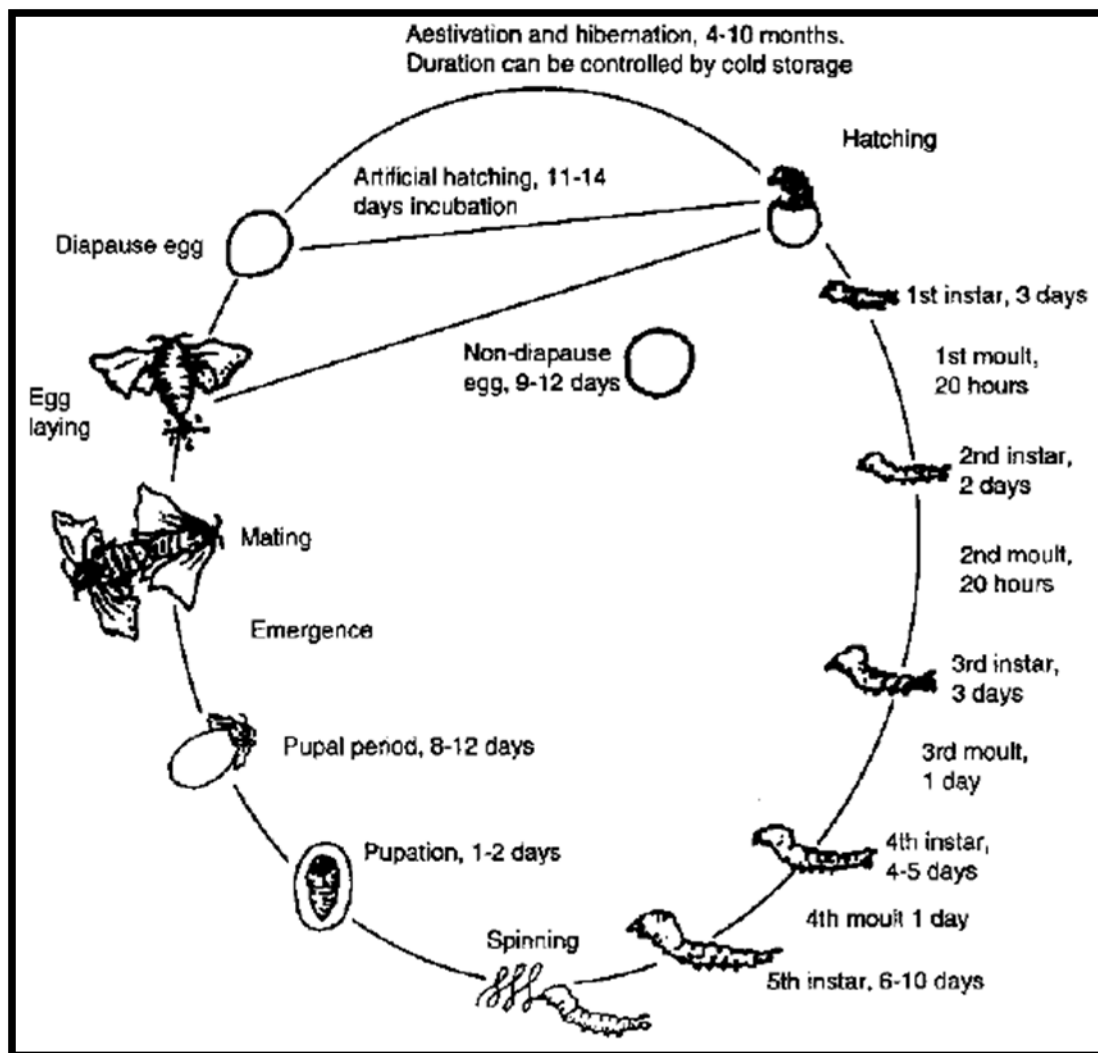
หนอนไหมมีชื่อสามัญว่า Silkworm และชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bombyx mori* Linn. เป็นแมลงที่จัดอยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Bombycidae ผีเสื้อในวงศ์นี้มีลักษณะพิเศษประจำวงศ์คือ ตัวหนอนจะพันเส้นใยเพื่อใช้ทำรังห่อหุ้มตัวเองแล้วลอกคราบเป็นดักแด้อยู่ในรังก่อนพัฒนาเป็นแม่ผีเสื้อ หนอนไหมเป็นแมลงที่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแบบสมบูรณ์ (complete metamorphosis insect) วงชีวิตของหนอนไหมแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ระยะตัวหนอน ระยะดักแด้ และระยะผีเสื้อ (ภาพประกอบ 2.4) เริ่มจากผีเสื้อตัวเมียวางไข่ โดยทั่วไปแม่ผีเสื้อไหมพันธุ์ไทยจะวางไข่ประมาณ 250 ถึง 350 ฟอง (สิริภักดิ์ สุระพร, 2552) โดยปกติ วงชีวิตของหนอนไหม ซึ่งเริ่มตั้งแต่ระยะไข่จนถึงระยะผีเสื้อ ใช้เวลาประมาณ 42 ถึง 45 วัน วงชีวิตของไหมจะประกอบ ด้วยระยะต่างๆ ดังนี้

ระยะไข่ (egg stage) ไช้ไหมมีลักษณะกลมรีคล้ายรูปไข่ มีสีและรูปร่างแตกต่างกันตามสายพันธุ์ บางชนิดมีระยะฟักไข่ 4 ถึง 10 เดือน แต่บางสายพันธุ์มีระยะฟักไข่เพียง 10 ถึง 12 วัน จากนั้นไข่จะฟักออกเป็นตัวอ่อนหนอนไหม (อารีย์ งามศิริวัฒนกุล, 2539)

ระยะตัวหนอน (larval stage) หลังจากหนอนไหมฟักออกจากไข่จะมีขนาดเล็กมาก มีขนสีน้ำตาลดำหรือสีดำปกคลุม ต่อมาผิวหนังจะขยายตัวออกทำให้มีสีจางลงและขนที่ปกคลุมจะลดน้อยลงจากนั้น 1 ถึง 2 วัน หนอนไหมจะหยุดกินอาหารและอยู่นิ่ง ประมาณ 1 วัน เพื่อทำการลอกคราบ เรียกว่า “ไหมนอน” แล้วจะเริ่มกินอาหารและเคลื่อนที่ เรียกว่า “ไหมตื่น” หนอนไหมจะลอกคราบแบบนี้ทั้งหมด 4 ครั้ง ในระยะนี้จะเป็นช่วงการเจริญเติบโตที่ยาวนานที่สุด ประมาณ 23 ถึง 25 วัน ตัวหนอนจะมีขนาดการเจริญเติบโตจากเริ่มแรกจนถึงระยะสุดท้าย ประมาณ 10,000 เท่า (อัญชลี พัดมีเทศ, 2538)

ระยะดักแด้ (pupa stage) หลังจากตัวหนอนลอกคราบและมีการเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนจะเปลี่ยนเป็นระยะดักแด้ เรียกว่า ไหมสุก หนอนไหมจะหยุดกินอาหารแล้วจะเริ่มทำการพันเส้นใยห่อหุ้มตัวเองเป็นรังไหม 2 ถึง 3 วัน จากนั้นจะลอกคราบกลายเป็นดักแด้อยู่ภายในรังไหม

ระยะตัวเต็มวัย (adult stage) ในขณะที่เป็นดักแด้ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงพัฒนาตัวเองกลายเป็นผีเสื้ออยู่ภายในรังไหม ซึ่งใช้เวลา 10 ถึง 12 วัน จากนั้นผีเสื้อไหมจึงจะเจาะรังไหมโดยวิธีการพ่นน้ำลายซึ่งมีฤทธิ์เป็นด่างละลายชั้นเปลือกรังออกมาสู่ภายนอก พร้อมทั้งจะผสมพันธุ์และวางไข่ภายใน 1 ถึง 2 วัน จากนั้นผีเสื้อไหมจะมีอายุได้ไม่เกิน 2 ถึง 3 วัน ก็ตายในที่สุด



ภาพประกอบ 2.4 วงจรชีวิตของไหม (*Bombyx mori*) (Veda et al., 1997)

## 2.5 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

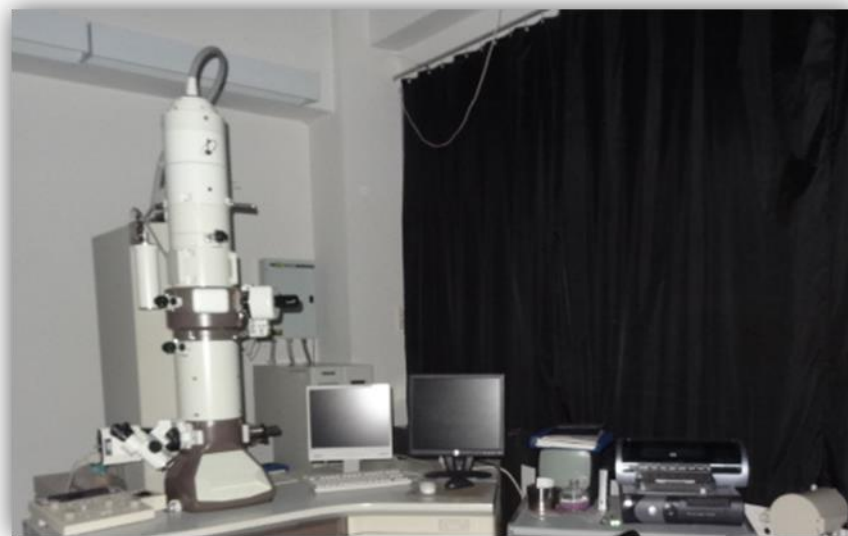
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนประดิษฐ์ขึ้นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2475 ในประเทศเยอรมนี โดยนักวิทยาศาสตร์ 2 คน คือ Ernst Ruska และ Max Knoll เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้ลำอิเล็กตรอนแทนแสงธรรมดา กล้องแบบนี้มีหลักการทำงานคล้ายกับกล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง แต่แตกต่างกันที่ส่วนประกอบภายใน กล่าวคือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะใช้ลำอิเล็กตรอนซึ่งมีขนาดเล็กมากวิ่งผ่านวัตถุและโฟกัสภาพลงบนจอเรืองแสง เลนส์ต่าง ๆ ในกล้องจะใช้ขดลวดพันรอบ แท่งเหล็กอ่อน เมื่อกระแสไฟฟ้าไหลผ่านจะเกิดสนามแม่เหล็กขึ้น ซึ่งสนามแม่เหล็กจะผลัดกับประจุของอิเล็กตรอน ทำให้อิเล็กตรอนเบี่ยงเบนไปสู่เป้าหมายได้

### 2.5.1 ชนิดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบโครงสร้างขนาดเล็กมากๆ ของตัวอย่างทางชีวภาพ และสารอนินทรีย์ที่หลากหลาย เช่น จุลินทรีย์ ตัวอย่างชิ้นเนื้อ โลหะ และ คริสตัล ในปัจจุบันกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมี 2 ชนิด คือ

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron microscope) หรือ เรียกแบบย่อว่า TEM ซึ่งคิดค้นโดย Ernst Ruska ในปี พ.ศ. 2475 ใช้ศึกษาโครงสร้างภายในของ เซลล์โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องผ่านเซลล์หรือตัวอย่างที่ต้องการศึกษาซึ่งผู้ศึกษาต้องเตรียมตัวอย่าง ให้ได้ขนาดบางเป็นพิเศษประมาณ 60 ถึง 90 ไมโครเมตร เหมาะสำหรับการศึกษาโครงสร้างภายในของ เซลล์ ภาพที่ปรากฏบนจอเรืองแสงเป็นภาพ 2 มิติ มีกำลังขยายสูงมาก คือ 500,000 ถึง 1,000,000 เท่า นอกจากจะใช้ศึกษาสิ่งมีชีวิต ยังสามารถใช้ส่องศึกษารูปผลึกของสารต่าง ๆ ในการวิเคราะห์ทาง เคมีได้ (เพทาย บุญยรัตพันธุ์ และรัตน์สุณี สุขพนินันท์, 2557)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron microscope) เป็น เครื่องมือวิทยาศาสตร์ขั้นสูงที่มีความสำคัญต่อการวิจัยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันนิยมเรียกสั้นๆว่า SEM ถูกสร้างขึ้นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2480 โดย Manfred Von Ardenne นักฟิสิกส์ และนักประดิษฐ์ ชาวเยอรมัน กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดทำงานโดยควบคุมให้ลำอิเล็กตรอนกราดไปบน พื้นผิวของตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะ รูปร่าง ลวดลายบนพื้นผิว และขนาดของตัวอย่าง ซึ่งภาพที่ได้เป็นภาพสามมิติ สามารถศึกษาได้ทั้ง ตัวอย่างทางชีวภาพ และตัวอย่างทางด้านวัสดุศาสตร์ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เป็นกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง จึงมีบทบาทต่อการศึกษาและวิจัยด้านต่างๆ เช่น ในงานด้าน พฤกษศาสตร์ สัตวศาสตร์ จุลชีววิทยา ใช้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต ด้านอุตสาหกรรมและการเกษตรใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของอาหาร และตรวจสอบ คุณภาพของผลิตภัณฑ์ และบรรจุภัณฑ์ที่ประดิษฐ์คิดค้นขึ้น การศึกษาทางเคมี ฟิสิกส์และวิศวกรรม เช่น การผลิตท่อนาโน ซีเมนต์ ดิน และการตรวจสอบอนุภาคต่างๆที่สังเคราะห์ขึ้น ด้านการแพทย์ การผลิตยา รวมถึงการศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางด้านปฐพีวิทยาของพื้นที่ว่าในอดีตเกิดการ เปลี่ยนแปลงอย่างไร เช่น เคยเป็นทะเลมาก่อน หรือการศึกษาลักษณะของหิน แร่ หรือศึกษาปัจจัย ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดิน และหิน เช่น น้ำ และลม เป็นต้น รวมถึงการศึกษาฟอสซิล เพื่อบ่งชี้ ถึงวิวัฒนาการการเปลี่ยนแปลงของโลกในยุคต่างๆ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่องานด้านนิติ วิทยาศาสตร์ และการตรวจสอบทางด้านศิลปะ เช่น การตรวจสอบสี หรือวัสดุที่ใช้ ในงานจิตรกรรม (ยุพดี เผ่าพันธุ์, 2557)



ก.



ข.

ภาพประกอบ 2.5 แสดงชนิดของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ก. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron microscope)

ข. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron microscope)

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ทิพย์วดี อรรถธรรม และศิรินันท์ เอี่ยมประภา (2526) ศึกษาสัณฐานวิทยา โครงสร้างจุลภาค และ โรควิทยาของนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซิสไวรัสของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ที่พบในประเทศไทย พบว่า เป็นชนิด multiple embedded ผลึกโปรตีนเป็นรูปเหลี่ยมมีขนาดแตกต่างกัน โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 1.4 ไมโครเมตร ผลึกโปรตีนมีโครงสร้างพื้นผิวขรุขระไม่เรียบและมีส่วนยื่นออกไปเป็นปุ่มปม ผลึกรูปทรงกลมมีขนาดใหญ่ผิดปกติ และผลึกโปรตีนที่เชื่อมติดกัน วิริออน มีขนาดกว้างและยาว 132 x 365 นาโนเมตร ประกอบด้วยอนุภาคไวรัส 2 ถึง 6 อนุภาค นิวคลีโอแคพซิด หรืออนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรง มีขนาดกว้างและยาว 51 x 325 นาโนเมตร และพบเป็นจำนวนมากอยู่เป็นกลุ่มนอกผลึกโปรตีน ไวรัสเข้าทำลายอย่างรุนแรงในนิวเคลียสของเซลล์เนื้อเยื่อไขมัน เซลล์ใต้ผนังลำตัว และเซลล์รอบท่ออากาศ นอกจากนั้นยังเจริญเพิ่มปริมาณในเซลล์กระเพาะอาหาร เซลล์รอบอวัยวะ และเซลล์รอบท่อขับถ่าย กระบวนการเจริญเพิ่มปริมาณ และการเข้าทำลายเซลล์เนื้อเยื่อคล้ายกับ NPV ของหนอนผีเสื้อทั่วไป การเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์แตกต่างไปจากที่มีรายงานพบใน NPV ของหนอนผีเสื้ออื่นที่สำรวจพบในประเทศไทย โครงสร้างจุลภาคที่พบในเซลล์ที่ถูกไวรัสทำลาย และไม่มีปรากฏในเซลล์ปกติ ได้แก่ fibrillar strand ซึ่งพบในเกือบทุกนิวเคลียสของเซลล์ที่ถูกทำลาย และ membranous profile ซึ่งไม่ปรากฏให้เห็นหลายลักษณะ คือ เป็นเส้นบางโค้งไปมาและซ้อนกันเป็นชั้นอยู่ชิดกับผนังนิวเคลียส เป็นเส้นสั้น กระจายทั่วไปในนิวเคลียส แต่มักอยู่หนาแน่นบริเวณ fibrillar strand และ virogenic stroma และเป็นเส้นหนาที่บ่งแสงอิเล็กตรอน

ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพลิช สิ้นชัยศรี (2531) สำรวจแหล่งเลี้ยงไหม *Bombyx mori* ตามหมู่บ้านต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย พบหนอนไหมเป็นโรคตายจำนวนมาก และ จากการวิเคราะห์สาเหตุของโรค พบว่า ไวรัสเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคกับหนอนไหม การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แสดงว่า เป็นเชื้อนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซิสไวรัส (Nuclear polyhedrosis virus; NPV) ชนิด single-embedded ผลึกโปรตีน มีขนาดเฉลี่ย 2.7 ไมโครเมตร และส่วนใหญ่เป็นรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์อนุภาคไวรัสเป็นท่อนตรง มีขนาดเฉลี่ย 340 x 45 นาโนเมตร

มาลี ตั้งระเบียบ (2536) คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซิสไวรัสของหนอนไหม (*Bombyx mori* L. nuclear polyhedrosis virus; BmNPV) สาเหตุโรคแกรสเซอร์ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 15 ไอโซเลต ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี linear sucrose density gradient centrifugation พบว่า ผลึกโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ที่ระดับความเข้มข้น 53 ถึง 56 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก) และ วิริออนอยู่ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 33 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก ต่อ น้ำหนัก) แล้วนำเชื้อ BmNPV ทุกไอโซเลตมาทดสอบกับหนอนไหมวัย 3 พันธุ์อ่อนมาตรฐาน (NB<sub>4</sub>D<sub>2</sub>) และพันธุ์ต้านทานมาตรฐาน (ลูกผสม Polyvotine) พบว่าลักษณะอาการของโรคในหนอนไหมที่ได้รับเชื้อ BmNPV ทุกไอโซเลตเหมือนกัน (typical symptom) สามารถจัดตั้งเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลตได้ 5 กลุ่ม คือ 1) ระดับความรุนแรงสูงมาก คือ เชื้อไอโซเลตที่ 15 2) ระดับความรุนแรงสูง คือ เชื้อไอโซเลตที่ 2, 6 และ 9 3) ระดับความรุนแรงปานกลาง คือ เชื้อไอโซเลตที่ 1, 3, 4, 5, 7, 8, 13 และ 14 4) ระดับความรุนแรงต่ำ คือ เชื้อไอโซเลตที่ 10 และ 5) ระดับความรุนแรงต่ำมาก คือ เชื้อไอโซเลต

ที่ 11 และ 12 ผลจากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นมาตรฐานเพื่อคัดเลือก และประกอบการพิจารณาหาพันธุ์ใหม่ที่ต้านทานต่อโรคแกระสเซอร์ต่อไป

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต (2551) ตรวจสอบวิเคราะห์ชนิดของไวรัส NPV ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจาก NPV 4 ชนิด คือ HaSNPV, SeMNPV, SiMNPV และ TnMNPV เปรียบเทียบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านพบว่าผลึกโปรตีนไวรัส HaSNPV มี 1 นิวคลีโอแคพซิด/ไวรัส, SeMNPV มี 1, 3, 4 และ 5 นิวคลีโอแคพซิด/ไวรัส, SiMNPV มี 1, 3, 7, 8 และ 9 นิวคลีโอแคพซิด/ไวรัส ในขณะที่ TnMNPV มีถึง 1, 2, 4, 6, 7, 8 และ 11 นิวคลีโอแคพซิด/ไวรัส และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า ผลึกโปรตีนไวรัสเหล่านี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย เท่ากับ 1.07, 1.25, 1.90 และ 1.78 ไมโครเมตร ตามลำดับ

กลุ่มวิจัยกัญและสัตววิทยา (2548) ศึกษาสัณฐานวิทยาและประสิทธิภาพการเกิดโรคของไวรัส NPV หนอนกระทุ้งผัก พบว่า เมื่อศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (SEM) และลำแสงส่องผ่าน (TEM) เชื้อไวรัส NPV ของหนอนกระทุ้งผักที่พบในประเทศไทย (*Spodoptera litura* NPV) เป็นชนิด Multiple Embedded nucleocapsids ผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มนิวคลีโอแคพซิดเป็นรูปหลายเหลี่ยม (Polyhedral Inclusion Bodies) มีขนาดสม่ำเสมอโดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย  $2.236 \pm 0.3833$  ไมโครเมตร จึงเรียกไวรัสชนิดนี้ว่า SiMNPV ไวรัสชนิดนี้มีลักษณะเป็นท่อนตรง มีขนาดกว้างและยาว  $81.236 \pm 1.701$  และ  $234.79 \pm 68.0319$  นาโนเมตร ตามลำดับ ประกอบด้วยอนุภาคไวรัสจำนวน 2 ถึง 4 อนุภาค ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนตรงยาวสม่ำเสมอมีขนาดกว้างและยาว  $39.94 \pm 6.0078$  และ  $222.84 \pm 6.862$  นาโนเมตร ตามลำดับ ไวรัส NPV หนอนกระทุ้งผัก (SiMNPV) มีศักยภาพสูงในการกำจัดหนอนกระทุ้งผัก เมื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพในการเกิดโรคของเชื้อ กับหนอนกระทุ้งผักวัยที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ พบว่าค่า  $LC_{50}$  คือ  $1.49 \times 10^4$ ,  $7.0 \times 10^4$ ,  $2.6 \times 10^5$ ,  $3.4 \times 10^6$  และ  $1.3 \times 10^7$  ผลึก ต่อ มิลลิลิตร (PIBs/ml) ซึ่งผลจากการทดสอบ ประสิทธิภาพดังกล่าว สามารถนำไปทดลองเพื่อหาปริมาณไวรัสที่เหมาะสม ต่อการเพิ่มปริมาณไวรัสในแมลงอาศัยให้ได้ปริมาณมากในระบบการผลิตในโรงงานต้นแบบและสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตได้

มัลลิกา แก้ววิเศษ และคณะ (2548) ตรวจสอบเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ของหนอนไหม *Bombyx mori* ด้วยเทคนิค PCR โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ 2 วิธี วิธีที่ 1 ดัดแปลงจากวิธีสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในเซลล์แมลง วิธีที่ 2 ดัดแปลงมาจากวิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ พบว่าทั้งสองวิธีสามารถใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดหนอนไหมได้ โดยวิธีที่ 1 ใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอ 48 ชั่วโมง 36 นาที ส่วนวิธีที่ 2 ใช้เวลาในการสกัดดีเอ็นเอไม่เกิน 30 นาที เมื่อทำการตรวจสอบเชื้อ BmNPV ในตัวหนอนไหมด้วยการตรวจหายีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนของไวรัส (*polh* gene) ในเลือดหนอนไหมด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อ BmNPV ในหนอนไหมหลังจากได้รับเชื้อ 3 วัน และเมื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 1 และตรวจสอบเชื้อ BmNPV ด้วยเทคนิค PCR ต้องใช้เวลาในการดำเนินการทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 3 วัน แต่ถ้าสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ 2 จะใช้เวลาในการตรวจสอบทั้งสิ้นเพียง 5 ชั่วโมง

Adams และคณะ (1997) ศึกษาการเข้าทำลาย และการจำลองตัวสร้างอนุภาคใหม่ของเชื้อ baculoviruses ในแมลง และในหลอดทดลอง ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่า เมื่ออนุภาคไวรัสแบบ budded virion เข้าไปในกระแสเลือดของแมลงซึ่งไหลเวียนอยู่นอกระบบในช่องว่างภายในตัว

ของแมลง อนุภาคไวรัสจะไปตามกระแสเลือดเพื่อเข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อของอวัยวะภายในของแมลง ดังนั้นเลือดจึงเป็นพาหะในการแพร่กระจายอนุภาคไวรัสไปทั่วตัวแมลง

Kumpratueang (1998) สำรองการติดเชื้อ BmNPV ในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ด้วยเทคนิค DNA probe เป็นวิธีตรวจสอบ โดยวิธี dot blot hybridization ซึ่งมีความไวในการตรวจจำระดับ 0.1 ถึง 1 พิโคกรัม และ DNA probe มีความจำเพาะต่อ BmNPV จากการศึกษาที่มีการลดขั้นตอนในวิธีการตรวจสอบโดยสามารถตรวจระยะเวลาจากวิธีการเดิมใช้เวลา 32 ชั่วโมง 12 นาที เป็น 2 ชั่วโมง 52 นาที แล้วนำไปตรวจหาเชื้อ BmNPV ในตัวอย่างหนอนไหมที่สุ่มเก็บได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า ประสิทธิภาพของ DNA probe สามารถตรวจสอบเชื้อ BmNPV ในระยะเริ่มต้นตั้งแต่วัย 1 ถึง วัย 5

Cheng และคณะ (1998) ศึกษาลำดับของยีนในผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมของยีน *ThorNPV* จากการวิเคราะห์เปรียบเทียบยีน *ThorNPV* ด้วยวิธี open reading frame (ORF) พบว่า มี 738 nt มีกรดอะมิโน 246 ชนิด และมวลโมเลกุลหนัก 28,778 ดาลตัน ทำการแทนที่ยีน *ThorNPV* ในยีน *AcNPV* ที่ผลิตผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยม และมีอนุภาคไวรัสเป็นจำนวนมากภายในผลึกโปรตีน จากการศึกษาเป็นการกำหนดความสำคัญของการลำดับโปรตีนในยีนที่เป็นตัวกำหนดรูปร่างของผลึกโปรตีน ซึ่งลิวิซิน ของยีน *ThorNPV* ถูกระบุว่าเป็นตัวกำหนดรูปร่างสี่เหลี่ยมของยีน *ThorNPV* บน PCR-based และผลึกโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการผสมยีน *AcMNPV* (RECAcV) มีความไวต่ออับเฟอร์ที่เป็นต่าง และผลึกโปรตีนของยีน *ThorNPV* มีขนาดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับยีนของ *ThorNPV* สายพันธุ์พื้นเมือง และค่า LD<sub>50</sub> ของยีน RECAcV ในหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) อย่างมีนัยสำคัญต่ำกว่าของยีน *AcMNPV*

Kautsuma และคณะ (1999) ศึกษาโครงสร้างของผลึกโปรตีน BmNPV จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ สายพันธุ์ #126, #136, #211 และ #220 และ 2 ไอโซเลต ที่มีในห้องปฏิบัติการ คือ สายพันธุ์ #24 และ #128 โดยนำมาเปรียบเทียบกับ BmNPV K ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) พบว่า สายพันธุ์ #211 ผลึกโปรตีนมีขนาดใหญ่ จำนวนมากกระจายอยู่ภายในเซลล์ และ สายพันธุ์ #220 ผลึกโปรตีนเป็นรูปสี่เหลี่ยม จำนวนน้อยอยู่ภายในเซลล์ (น้อยกว่า 10 ผลึก ต่อ เซลล์) ซึ่งสองสายพันธุ์นี้ตรวจพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ โดยผลึกโปรตีน และอนุภาคไวรัส มีโครงสร้างที่สมบูรณ์ทุกประการ สายพันธุ์ #126 และ #136 ผลึกโปรตีนมีขนาดเล็ก จำนวนมากภายในเซลล์ แต่จากการตรวจสอบพบว่า ผลึกโปรตีนสายพันธุ์ #136 มีขนาดใหญ่กว่าผลึกโปรตีนสายพันธุ์ #126 ซึ่งตรวจพบในนิวเคลียสและไซโทพลาสซึม ของเซลล์ที่ BmNPV เข้าทำลาย และสายพันธุ์ #128 พบว่า เป็นสายพันธุ์ที่คล้ายกันกับ BmNPV สายพันธุ์ดั้งเดิม คือ ตรวจพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์ และผลึกโปรตีนเป็นรูปหลายเหลี่ยม แต่เมื่อทำการทดลองโดยเปรียบเทียบค่า LC<sub>50</sub> ของหนอนไหมที่กินผลึกโปรตีน BmNPV K เข้มข้น 8.5 × 10<sup>6</sup> ผลึกโปรตีน ต่อ มิลลิลิตร กับ #128 เข้มข้น 10<sup>9</sup> ผลึกโปรตีน ต่อ มิลลิลิตร พบหนอนไหมที่กิน BmNPV #128 ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ BmNPV เนื่องจากสายพันธุ์ #128 มียีนที่กำหนดการเกิดโรคหายไป

Hong และคณะ (2000) ศึกษาโครงสร้างของ BmNPV 4 สายพันธุ์ คือ BmNPV-K1, BmNPV-K2, BmNPV-K3 และ BmNPV-K4 โดยทำการเก็บตัวอย่าง BmNPV จากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในประเทศเกาหลีใต้ จากนั้นนำเชื้อ BmNPV มาศึกษาด้วยวิธีการเพิ่มปริมาณไวรัส 3 ถึง 5 วัน พบว่าการเพิ่มปริมาณไวรัสมีความแตกต่างกันในวันที่ 1 ถึงวันที่ 2 คือ BmNPV-K2 มีการเพิ่มปริมาณไวรัสได้

ซ้ำกว่าสายพันธุ์อื่น และศึกษาโครงสร้างของยีนที่สร้างผลึกโปรตีน (polyhedrin gene) หรือเรียกว่ายีน P10 พบว่า ยีน BmNPV-K1 และ K3 มีโครงสร้างเหมือนกัน ซึ่งแตกต่างจากโครงสร้างของ BmNPV-K3 และ K4 ส่วนกรดอะมิโนของ BmNPV-K1, K2 และ K3 เท่ากับ 94 ชนิด แต่ BmNPV-K4 เท่ากับ 70 ชนิด และประสิทธิภาพในการสร้างผลึกโปรตีน BmNPV-K1 สร้างผลึกโปรตีนได้ปริมาณมากที่สุด คือ 24 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ ยีน BmNPV-K2, BmNPV-K3 และ BmNPV-K4 สร้างผลึกโปรตีนได้ปริมาณ 7.8, 6.3 และ 5.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยผลึกโปรตีนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2 ถึง 3 ไมโครเมตร

Pereira และคณะ (2008) ติดตามการติดเชื้อ BmMNPV ในอัมตะของหนอนไหมวัย 5 สายพันธุ์ญี่ปุ่น ด้วยเทคนิคเซลล์วิทยา โดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) หลังจากหนอนไหมกินเชื้อ BmMNPV เข้าไป 6 วัน พบการเข้าทำลายด้านนอกของเซลล์เยื่อบุอัมตะ (epithelium cell) ซึ่งเป็นเซลล์ที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของ BmNPV และในวันที่ 7 พบการแพร่กระจายเชื้อ BmMNPV เข้าไปภายในเซลล์เยื่อบุอัมตะ เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างนิวเคลียส เรียกว่า virogenic stroma และเชื้อ BmMNPV จะสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ซึ่งในระยะสุดท้ายเซลล์เยื่อบุอัมตะจะแตก แล้วปลดปล่อยผลึกโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ จากนั้นทำการศึกษาเนื้อเยื่อวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) พบการติดเชื้อ BmMNPV ใน internal epithelium และ basal laminae

Fernandez และคณะ (2009) ทำการตรวจสอบความอ่อนแอของหนอนไหมต่อเชื้อ BmMNPV บนเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารส่วนต้นของหนอนไหมวัย 5 สายพันธุ์ญี่ปุ่น โดยวิธีการให้หนอนไหมกินเชื้อ BmMNPV ปริมาณ  $8 \times 10^8$  OBs/ml เข้าไป 6 วัน พบว่า สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา แล้วทำการศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และในวันที่ 8 พบการสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส หลังจากนั้นหนอนไหมก็จะตาย ซึ่งเยื่อบุผิวกระเพาะอาหารส่วนต้นของหนอนไหมมีความอ่อนแอต่อเชื้อ BmMNPV เหมือนกับเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารส่วนกลาง เนื้อเยื่อไขมัน ต่อมไหม ระบบประสาท และเนื้อเยื่ออัมตะของหนอนไหม

Manimegalai และคณะ (2013) ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคแพกเซอร์รี่ และเชื้อไวรัส BmNPV สาเหตุของโรคแกรสเซอร์รี่ในหนอนไหม (*Bombyx mori* L.) ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากหนอนไหมตายที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จากนั้นทำการแยกโคโลนี แล้วย้อมสี นำไปศึกษาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทำการแยกเชื้อไวรัส BmNPV โดยวิธีการนำหนอนไหมมาบดด้วยโกร่ง (mortar) เติมน้ำกลั่น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนผลึกโปรตีนไวรัส แล้วทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อ BmNPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์ สามารถระบุได้ว่าเชื้อแบคทีเรีย ที่ก่อโรค คือ *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus albus* และ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ BmNPV มีรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมีขนาดตั้งแต่ 5.78 ถึง 15.28 ไมโครเมตร

## บทที่ 3

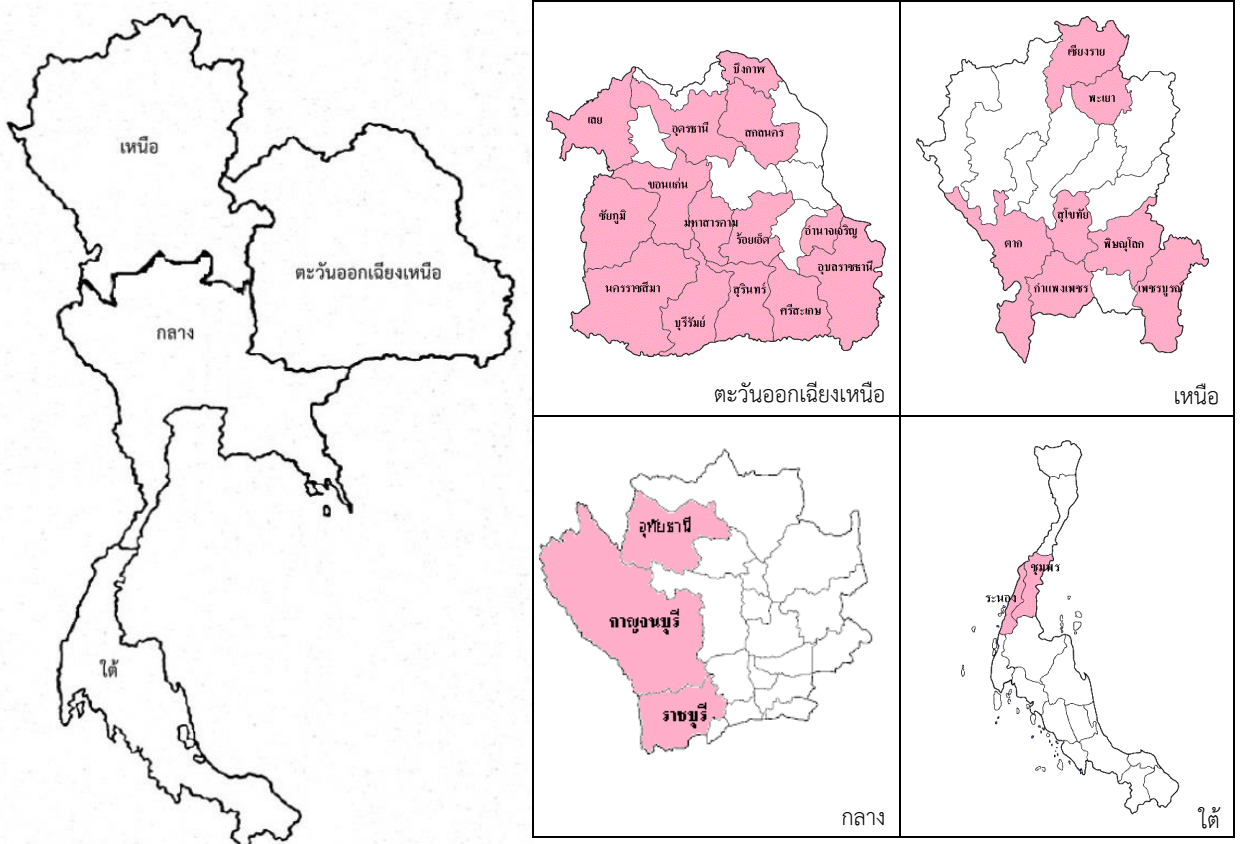
### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 แหล่งที่มาของไวรัส

เก็บตัวอย่างหนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ ในพื้นที่ที่เกษตรกรทำการเลี้ยงไหมในประเทศไทย โดยแบ่งเขตพื้นที่การเก็บตัวอย่างเป็น 4 ภูมิภาค (ภาพประกอบ 3.1) ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มี 14 จังหวัด คือ ร้อยเอ็ด อุตรธานี บึงกาฬ อุบลราชธานี สุรินทร์ ศรีสะเกษ เลย อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ สกลนคร มหาสารคาม ชัยภูมิ ขอนแก่น และนครราชสีมา ภาคเหนือ มี 7 จังหวัด คือ เชียงราย พะเยา กำแพงเพชร สุโขทัย พิษณุโลก ตาก และเพชรบูรณ์ ภาคกลาง มี 3 จังหวัด คือ ราชบุรี กาญจนบุรี และอุทัยธานี ภาคใต้ มี 2 จังหวัด คือ ระนอง และชุมพร โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหนอนไหมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหม จำนวน 2 ราย ต่อ พื้นที่ พื้นที่ละ 10 ตัว ด้วยวิธีการตัดขาเทียม หนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์รี่

#### 3.2 การแยกผลึกโปรตีนไวรัส (BmNPV-polyhedra)

ทำการแยกผลึกโปรตีนโดยตัดขาเทียมหนอนไหม ที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ ด้วยกรรไกรจุ่มด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำการฆ่าเชื้อปนเปื้อน ทำการแยกผลึกโปรตีนที่อยู่ในน้ำเลือดของหนอนไหม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาดบรรจุ 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยง 5,000 รอบ ต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วทำการคงสภาพผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยกลูตาไรดีไฮด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเก็บหลอดบรรจุตัวอย่างเลือดหนอนไหมในน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำกลับมาศึกษาความบริสุทธิ์ของผลึกโปรตีน BmNPV ในห้องปฏิบัติการ



ภาพประกอบ 3.1 แผนที่ประเทศไทย และแสดงพื้นที่ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง BmNPV จากหนอนไหม ที่เป็นโรคแกรสเซอร์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ หมายถึง สีแดง แทน พื้นที่ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง BmNPV

### 3.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra)

ศึกษาความบริสุทธิ์ของ BmNPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า และศึกษารูปร่างและขนาดของผลึกโปรตีน BmNPV จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM) ด้วยวิธีการเตรียมผลึกโปรตีน BmNPV ดัดแปลงจากเทคนิควิธีการเตรียมตัวอย่างของ Adams and Wilcox (1982) นำผลึกโปรตีน BmNPV บริสุทธิ์ที่คงสภาพด้วยกลูตาราลดีไฮด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 7.2 นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบ ต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างกลูตาราลดีไฮด์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำการคงสภาพตัวอย่างผลึกโปรตีน BmNPV (post-fix) ด้วยออสเมียมเตตรอกไซด์ (OsO<sub>4</sub>) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่สภาพอุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำการดึงน้ำออก (dehydration) โดยแช่ผลึกโปรตีน BmNPV ในสารละลายอะซิโตนเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เวลา 15 นาที ในแต่ละความเข้มข้น แล้วทำการหยดผลึกโปรตีน BmNPV ลงบนกระจก

ปิดสไลด์ รอให้แห้ง หลังจากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ไปติดบนสตัปทองเหลือง (stub) เคลือบตัวอย่างผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยทอง ศึกษาลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวัดขนาด ความกว้าง x ความยาว ของผลึกโปรตีนโดยการสุ่ม จำนวน 20 ผลึก ต่อ ตัวอย่าง ต่อ จังหวัด

### 3.4 การศึกษาอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV

ศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนของอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) โดยการเตรียมผลึกโปรตีน BmNPV ซึ่งดัดแปลงจากเทคนิคการเตรียมตัวอย่างของ Adams and Wilcox (1982); Bozzola และ Russell (1992) นำผลึกโปรตีน BmNPV บริสุทธิ์ที่คงสภาพด้วยกลูตาราตไฮโดรไซด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในสารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ pH 7.2 นำไปหมუნเหวี่ยง ตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบ ต่อ นาที เป็นเวลา 5 นาที ในสภาพอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างกลูตาราตไฮโดรไซด์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำการคงสภาพตัวอย่างผลึกโปรตีน BmNPV (post-fix) ด้วยออสเมียมเตตรอกไซด์ (OsO<sub>4</sub>) เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่สภาพอุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ทำการดึงน้ำออก (dehydration) โดยแช่ผลึกโปรตีน BmNPV ในสารละลายอะซิโตนเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้เวลา 15 นาที ในแต่ละความเข้มข้น จากนั้นฝังผลึกโปรตีน BmNPV ใน อะซิโตน ต่อ อีปอน 812 ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 นานข้ามคืน แล้วฝังผลึกโปรตีน BmNPV ใน อีปอน 812 บริสุทธิ์ 3 ชั่วโมง ทำการฝังตัวอย่าง (embedding) ลงในภาชนะแล้วเติมอีปอนบริสุทธิ์ (pure epon) ที่เตรียมขึ้นมาใหม่พร้อมใส่รหัสชื่อพื้นที่ ที่ทำการเก็บตัวอย่างไว้ข้างภาชนะ จากนั้นทำให้พลาสติกแข็งตัว ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำพลาสติกมาหั่นบาง (section) ด้วยเครื่องมือตัดพิเศษ ที่เรียกว่า อุลตราไมโครโทม (ultramicrotome) ให้ได้ชิ้นบางขนาด 60 ถึง 90 นาโนเมตร เมื่อได้พลาสติกหั่นบางแล้วนำไปวางบนกริด (grid) ทำการย้อมสีกริดด้วยโลหะหนัก 2 ชนิด คือยูรานิลอะซิเตต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในน้ำกลั่น เวลา 15 นาที (ขั้นตอนนี้ทำในที่มืด) ล้างกริด ด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง จากนั้นย้อมสีกริดด้วยเลดอะซิเตต เป็นเวลา 15 นาที ล้างกริดด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ฝังกริดในที่แห้งและไม่มีฝุ่น นำมาศึกษาอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

### 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้สถิติพื้นฐานคือ  $(\bar{x})$  และค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปราย

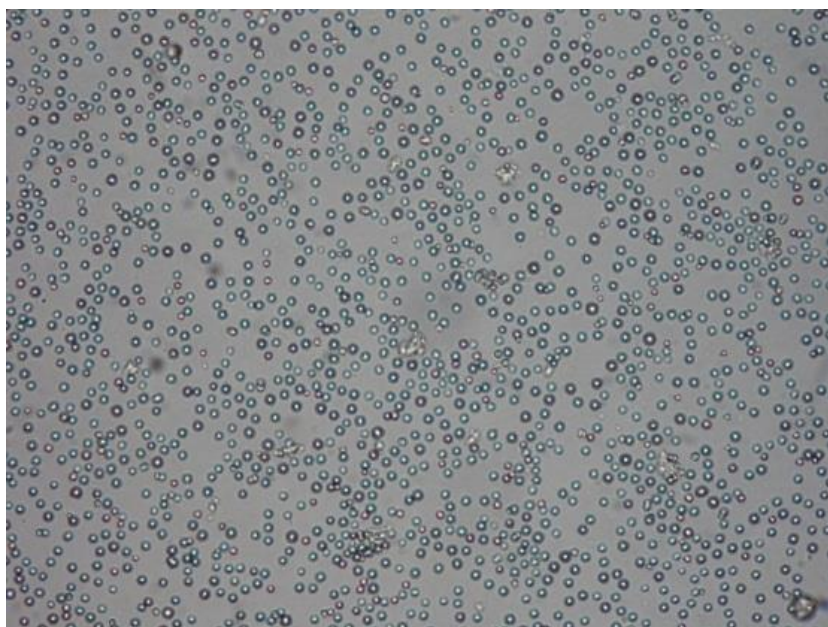
#### 4.1 การแยก BmNPV จากหนอนไหม

จากการออกสำรวจและศึกษาหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์รี่ หรือโรคเตื่อ จากเกษตรกรในหมู่บ้านที่เลี้ยงไหม จำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบว่าลักษณะการเลี้ยงไหมของเกษตรกรเป็นแบบดั้งเดิม ซึ่งเป็นการเลี้ยงไหมแบบครอบครัวเดี่ยว และการเลี้ยงเป็นกลุ่มหรือแบบสหกรณ์ พันธุ์ไหมที่นิยมเลี้ยง ได้แก่ นางสี่ว นางตุ่น นางลาย นางน้อย ซึ่งเป็นไหมไทยพื้นเมือง รังไหมมีขนาดเล็ก สีเหลือง และพบอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ในหนอนไหมวัย 4 และ วัย 5 คือ หนอนไหมมีลักษณะตัวซีดเหลืองหรือขาวชून เดินกระวนกระวาย หยุดกินใบหม่อน มีพฤติกรรมไต่ขึ้นตามกระดัง หรือที่สูงของภาชนะที่เลี้ยง ผงลำตัวเปราะและแตก ปล่อน้ำเลือดสีเหลืองชून ซึ่งมีผลึกโปรตีนบนอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพประกอบ 4.1) หนอนไหมจะแสดงอาการของโรคให้เห็นก่อนเข้าจ่อสร้างรัง แล้วตายภายใน 4 ถึง 7 วัน ซึ่งเป็นอาการที่ชัดเจน และเป็นลักษณะเอกลักษณ์ของโรคแกรสเซอร์รี่ หรือเรียกว่าโรค Tree top disease จากการรายงานการศึกษาอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ในห้องปฏิบัติการ หนอนไหมสามารถแสดงอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ได้อย่างชัดเจน (Kaewwises, 2006)

ศึกษาความบริสุทธิ์ของผลึกโปรตีนที่แยกได้จากหนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ และศึกษาลักษณะของผลึกโปรตีน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า ผลึกโปรตีนมีลักษณะกลมมน ไม่มีสิ่งปนเปื้อน เนื่องจากในการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้เทคนิคการตัดเฉพาะขาเทียม (proleg) ของหนอนไหม แยกเอาเฉพาะส่วนของผลึกโปรตีนของ BmNPV ออกมา จึงทำให้ผลึกโปรตีนมีความบริสุทธิ์ (ภาพประกอบ 4.2) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการแยกผลึกโปรตีนของ BmNPV ตามวิธีการของ สิริภัก และคณะ (2548) กล่าวคือ เมื่อศึกษาลักษณะของผลึกโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า พบลักษณะผลึกโปรตีน เป็นรูปทรงกลม ขนาดเล็ก มีความมันวาวและขอบหนาจำนวนมากกระจายในน้ำเลือดของหนอนไหม



ภาพประกอบ 4.1 แสดงอาการของโรคแกรสเซอร์ในหนอนไหมวัย 5 ระยะสุดท้าย โดยลำตัวมีผนังเปราะบาง และแตกในที่สุด ปล่อยของเหลวสีเหลืองขุ่นที่มีผลึกโปรตีน BmNPV ไหลออกมา (ศรีชัย)



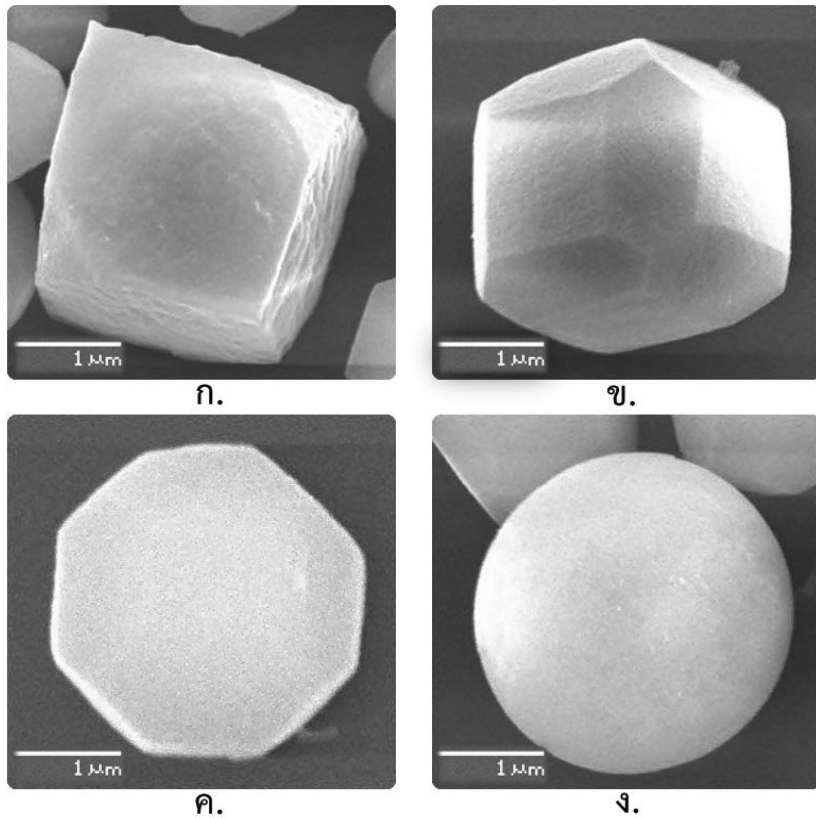
ภาพประกอบ 4.2 ลักษณะของผลึกโปรตีน (BmNPV- polyhedra) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 400 เท่า

## 4.2 สันฐานวิทยาของผลึกโปรตีน BmNPV

ศึกษารูปร่างและขนาดผลึกโปรตีน BmNPV จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ โดยใช้เกณฑ์การเก็บตัวอย่างหนอนไหมจากพื้นที่ หรือจังหวัดที่มีการเลี้ยงไหม เท่านั้น ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า ตามวิธี Adams & Wilcox (1982) เมื่อสุ่มวัดขนาดของผลึกโปรตีนจำนวน 20 ผลึก ต่อ ตัวอย่าง เพื่อเป็นตัวแทนของแต่ละพื้นที่ของการเก็บตัวอย่าง จากตัวอย่างทั้งหมด 26 จังหวัด พบว่า ผลึกโปรตีนที่พบจากหนอนไหมที่เป็นโรคแกระสเซอร์ในประเทศไทย มี 4 รูปแบบ คือ รูปลิ่มเหลี่ยม (cuboidal shape) หกเหลี่ยม (hexagonal shape) แปดเหลี่ยม (octagonal shape) และทรงกลม (globular shape) (ภาพประกอบ 4.3)

ผลการศึกษาโครงสร้างของผลึกโปรตีนลักษณะรูปลิ่มเหลี่ยมโดยการศึกษาขนาดความกว้างและความยาว (ตาราง 4.1) พบว่า ขนาดของผลึกโปรตีนรูปลิ่มเหลี่ยมมีขนาดแตกต่างกันไป ผลึกโปรตีนที่มีขนาดเล็กที่สุดโดยวัดความกว้าง และยาว คือ  $1.12 \pm 0.10$  และ  $1.26 \pm 0.03$  ไมโครเมตร ตามลำดับ และขนาดใหญ่ที่สุดกว้าง และยาว คือ  $4.57 \pm 0.00$  และ  $5.44 \pm 0.00$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบในหนอนไหมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในจังหวัดเลย และจังหวัดเชียงราย คิดเป็นร้อยละ 4.13 และ 1.35 ของรูปลิ่มเหลี่ยมทั้งหมด ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยของขนาดผลึกโปรตีนกว้าง และยาว ที่ทำการสำรวจทั่วประเทศเท่ากับ  $2.82 \pm 0.39$  และ  $3.05 \pm 0.43$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับ ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพนิช สิ้นชัยศรี (2531) ที่ศึกษาขนาดของพบผลึกโปรตีนรูปลิ่มเหลี่ยมผืนผ้าที่มีขนาดความยาวประมาณ 5 ไมโครเมตร แต่โดยทั่วไปมีขนาดความยาวเฉลี่ย 2.7 ไมโครเมตร จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบผลึกโปรตีนรูปลิ่มเหลี่ยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมพื้นที่ จังหวัดบึงกาฬ เพชรบูรณ์ กำแพงเพชร และสุโขทัย

ผลการศึกษาผลึกโปรตีนรูปหกเหลี่ยมมีค่าเฉลี่ยของขนาดผลึกโปรตีนกว้าง และยาวที่ทำการสำรวจทั่วประเทศเท่ากับ  $2.74 \pm 0.33$  และ  $2.91 \pm 0.36$  ไมโครเมตร ตามลำดับ มีขนาดกว้างและยาวเล็กที่สุด คือ  $1.90 \pm 0.46$  และ  $2.10 \pm 0.46$  ไมโครเมตร ตามลำดับ และขนาดกว้าง และยาวใหญ่ที่สุดคือ  $3.51 \pm 0.21$  และ  $3.58 \pm 0.23$  ไมโครเมตร ตามลำดับ ซึ่งพบในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในจังหวัดอุทัยธานี และจังหวัดนครราชสีมา (ตาราง 4.2) คิดเป็นร้อยละ 1.32 และ 1.32 ของรูปหกเหลี่ยมทั้งหมดที่ทำการศึกษา ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Bergold, 1953 ที่รายงานว่าผลึกโปรตีนหนอนไหมส่วนใหญ่เป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) และมีขนาดประมาณ 3 ถึง 5 ไมโครเมตร การสำรวจครั้งนี้สามารถพบผลึกโปรตีน BmNPV ทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษาในประเทศไทย



ภาพประกอบ 4.3 สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope : SEM) ก) รูปสี่เหลี่ยม ข) รูปหกเหลี่ยม ค) รูปแปดเหลี่ยม ง) ทรงกลม

ผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมเป็นผลึกโปรตีนที่ยังไม่มีการรายงานการสำรวจพบในประเทศไทย การศึกษานี้สามารถสำรวจพบผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมในพื้นที่ ที่ทำการศึกษ ได้แก่ อำนาจเจริญ ชัยภูมิ มหาสารคาม บุรีรัมย์ สกลนคร ขอนแก่น สุรินทร์ ศรีสะเกษ ร้อยเอ็ด พะเยา ตาก สุโขทัย กำแพงเพชร เชียงราย พิชญ์โลก ราชนบุรี อุทัยธานี ชุมพร และระนอง ในขณะที่เดียวกันไม่มีการตรวจพบผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมจากเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมจังหวัด เลย อุดรธานี อุบลราชธานี นครราชสีมา บึงกาฬ เพชรบูรณ์ และกาญจนบุรี ผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมมีขนาดกว้างและยาวเล็กที่สุด คือ  $2.36 \pm 0.27$  และ  $2.47 \pm 0.24$  ไมโครเมตร ตามลำดับ พบในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในจังหวัดชุมพร และผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมขนาดกว้างและยาวใหญ่ที่สุด คือ  $3.39 \pm 0.36$  และ  $3.51 \pm 0.41$  ไมโครเมตร ตามลำดับ พบในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมจังหวัดร้อยเอ็ด ผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมมีค่าเฉลี่ยของขนาดกว้าง และยาว ผลึกโปรตีนที่ทำการสำรวจทั่วประเทศเท่ากับ  $2.78 \pm 0.17$  และ  $2.92 \pm 0.18$  ไมโครเมตร ตามลำดับ (ตาราง 4.3) คิดเป็นร้อยละ 4.01 และ 5.02 ของรูปแปดเหลี่ยมทั้งหมด ในการศึกษาผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมพบเพียงบางจังหวัดเท่านั้น ทั้งนี้จากการศึกษา และค้นคว้าเอกสารงานวิจัย ยังไม่พบมีการรายงานผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมในประเทศไทย ในขณะที่ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนืองพนิช สิ้นชัยศรี (2531) ก็ไม่พบเมื่อสำรวจในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งในการรายงานในครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่มีการรายงานพบผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมในประเทศไทย

สำหรับผลึกโปรตีนรูปทรงกลมจากการรายงานส่วนใหญ่พบผลึกโปรตีนของไวรัส สกกุล Nucleopolyhedrovirus ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีการตรวจพบผลึกโปรตีนรูปทรงกลมในทุกเขตพื้นที่ ที่มีการเก็บตัวอย่าง ขนาดผลึกโปรตีนทรงกลมมีขนาดเฉลี่ย  $2.79 \pm 0.88$  ไมโครเมตร ขนาดเล็กที่สุด คือ  $1.65 \pm 0.03$  ไมโครเมตร และขนาดใหญ่ที่สุด คือ  $4.96 \pm 0.09$  ไมโครเมตร ซึ่งพบในเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในจังหวัดเลย และจังหวัดราชบุรี (ตาราง 4.4) คิดเป็นร้อยละ 0.51 และ 1.02 ของรูปทรงกลมทั้งหมด ซึ่งเป็นผลึกโปรตีนรูปทรงกลมที่มีขนาดใหญ่กว่าไวรัส สกกุล Nucleopolyhedrovirus ชนิดอื่น ตามที่ สุขลวัจน์ ว่องไวลิขิต (2551) ศึกษาสัณฐานวิทยาผลึกโปรตีนของ Nucleopolyhedrovirus จำนวน 4 ชนิด คือ HaSNPV SeMNPV SLMNPV และ TnMNPV พบว่าผลึกโปรตีน HaSNPV, SeMNPV, SLMNPV และ TnMNPV มีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 1.07, 1.25, 1.90 และ 1.78 ไมโครเมตร ตามลำดับ

โดยภาพรวมโครงสร้างของผลึกโปรตีนที่พบในพื้นที่ ที่ทำการสำรวจภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ จากพื้นที่ ที่ทำการสำรวจพบรูปสี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม แปดเหลี่ยม และรูปทรงกลม (ภาพประกอบ 4.4) และจากการศึกษาในครั้งนี้สำรวจผลึกโปรตีนที่พบมากที่สุด คือรูปทรงกลม หกเหลี่ยม สี่เหลี่ยม และแปดเหลี่ยม คิดเป็นร้อยละ 100, 100, 84.61 และ 73.07 ตามลำดับ ของพื้นที่ ที่ทำการศึกษาทั้งหมด (ภาพประกอบ 4.5)

ตาราง 4.1 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปสี่เหลี่ยม ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหมที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

ภาค	จังหวัด	ขนาดของผลึกโปรตีน BmNPV (ไมโครเมตร)	
		กว้าง	ยาว
ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลย	1.12 ± 0.10	1.26 ± 0.03
	อุดรธานี	2.49 ± 0.09	2.60 ± 0.12
	อุบลราชธานี	2.57 ± 0.43	2.79 ± 0.46
	ชัยภูมิ	2.63 ± 0.26	3.12 ± 0.40
	ศรีสะเกษ	2.66 ± 0.42	2.75 ± 0.57
	นครราชสีมา	2.80 ± 0.28	2.93 ± 0.35
	สุรินทร์	2.86 ± 0.21	3.10 ± 0.42
	ร้อยเอ็ด	2.88 ± 0.47	2.92 ± 0.42
	สกลนคร	2.99 ± 0.15	3.38 ± 0.26
	ขอนแก่น	3.16 ± 0.33	3.41 ± 0.37
	อำนาจเจริญ	3.03 ± 0.42	3.27 ± 0.41
	บุรีรัมย์	3.20 ± 0.00	3.38 ± 0.00
	มหาสารคาม	3.41 ± 0.75	3.55 ± 0.69
	บึงกาฬ	-	-
เหนือ	ตาก	2.22 ± 0.00	2.41 ± 0.00
	พะเยา	2.52 ± 0.00	2.72 ± 0.00
	พิจิตรโลก	2.88 ± 0.00	3.08 ± 0.00
	เชียงราย	4.57 ± 0.00	5.44 ± 0.00
	เพชรบูรณ์	-	-
	กำแพงเพชร	-	-
	สุโขทัย	-	-
กลาง	อุทัยธานี	2.43 ± 0.99	2.61 ± 0.91
	กาญจนบุรี	2.49 ± 0.43	2.80 ± 0.32
	ราชบุรี	3.41 ± 0.88	3.68 ± 0.96
ใต้	ระนอง	2.50 ± 0.00	2.50 ± 0.00
	ชุมพร	3.27 ± 0.19	3.49 ± 0.48

ตาราง 4.2 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปหกเหลี่ยม ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหมที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

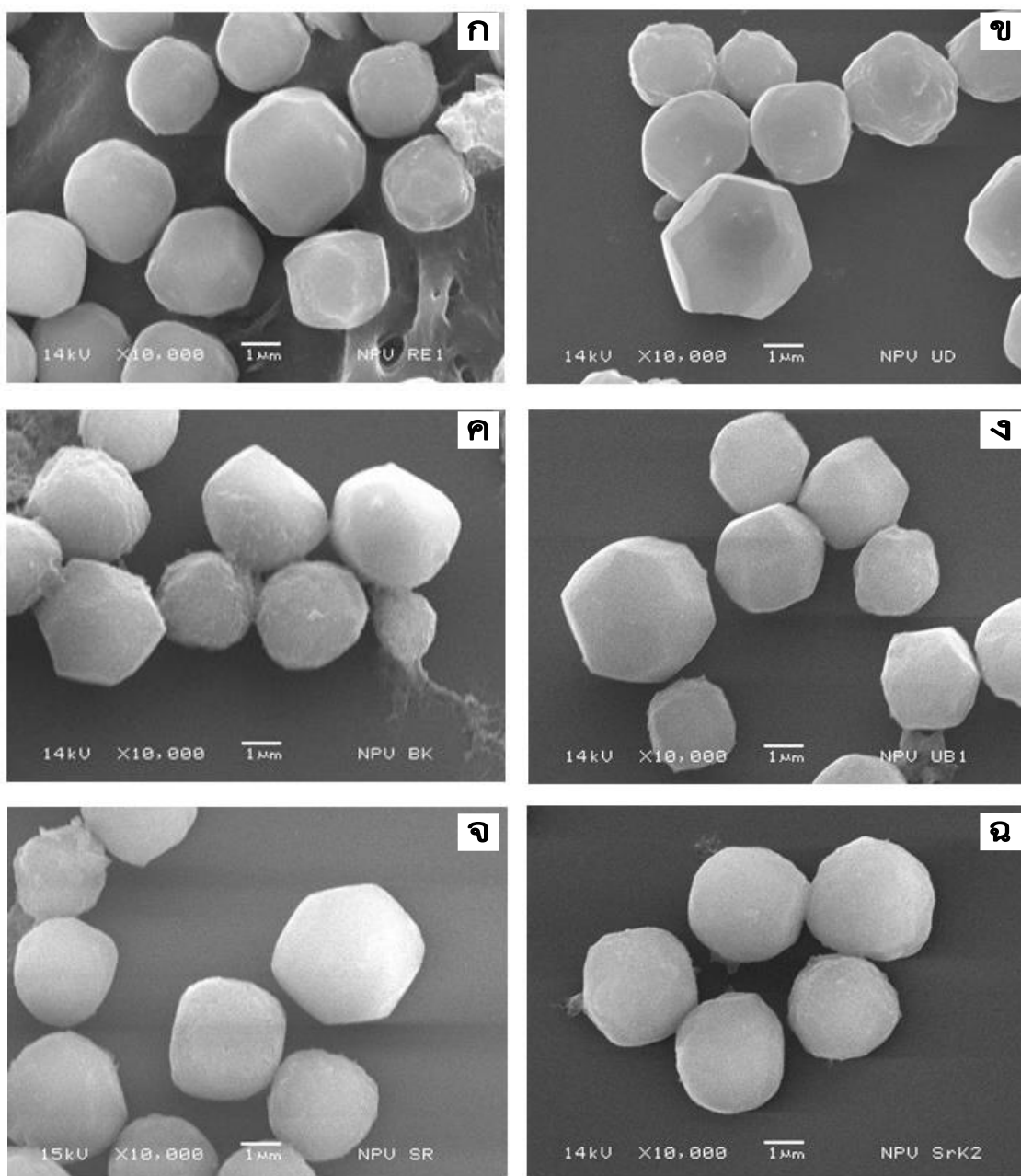
ภาค	จังหวัด	ขนาดของผลึกโปรตีน BmNPV (ไมโครเมตร)	
		กว้าง	ยาว
ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลย	2.17 ± 0.39	2.43 ± 0.37
	ร้อยเอ็ด	2.54 ± 0.25	2.71 ± 0.36
	มหาสารคาม	2.58 ± 0.18	2.77 ± 0.18
	สกลนคร	2.67 ± 0.36	2.81 ± 0.38
	บุรีรัมย์	2.73 ± 0.52	3.03 ± 0.62
	อุบลราชธานี	2.74 ± 0.34	3.03 ± 0.40
	ศรีสะเกษ	2.82 ± 0.23	3.03 ± 0.23
	บึงกาฬ	2.90 ± 0.31	3.12 ± 0.32
	ชัยภูมิ	2.91 ± 0.00	2.62 ± 0.00
	ขอนแก่น	2.94 ± 0.30	3.03 ± 0.29
	อุดรธานี	2.99 ± 0.46	3.26 ± 0.52
	อำนาจเจริญ	3.03 ± 0.56	3.07 ± 0.58
	สุรินทร์	3.15 ± 0.33	3.38 ± 0.33
	นครราชสีมา	3.51 ± 0.21	3.58 ± 0.23
เหนือ	พิษณุโลก	2.40 ± 0.30	2.53 ± 0.24
	เพชรบูรณ์	2.51 ± 0.14	2.71 ± 0.25
	กำแพงเพชร	2.52 ± 0.13	2.74 ± 0.21
	พะเยา	2.63 ± 0.27	2.76 ± 0.22
	เชียงราย	2.93 ± 0.18	3.06 ± 0.21
	สุโขทัย	3.01 ± 0.18	3.03 ± 0.33
	ตาก	3.32 ± 0.30	3.50 ± 0.00
กลาง	อุทัยธานี	1.90 ± 0.46	2.10 ± 0.46
	กาญจนบุรี	2.75 ± 0.43	3.13 ± 0.32
	ราชบุรี	2.91 ± 0.21	3.15 ± 0.19
ใต้	ระนอง	2.32 ± 0.15	2.51 ± 0.19
	ชุมพร	2.41 ± 0.22	2.80 ± 0.27

ตาราง 4.3 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปแปดเหลี่ยม ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหมที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

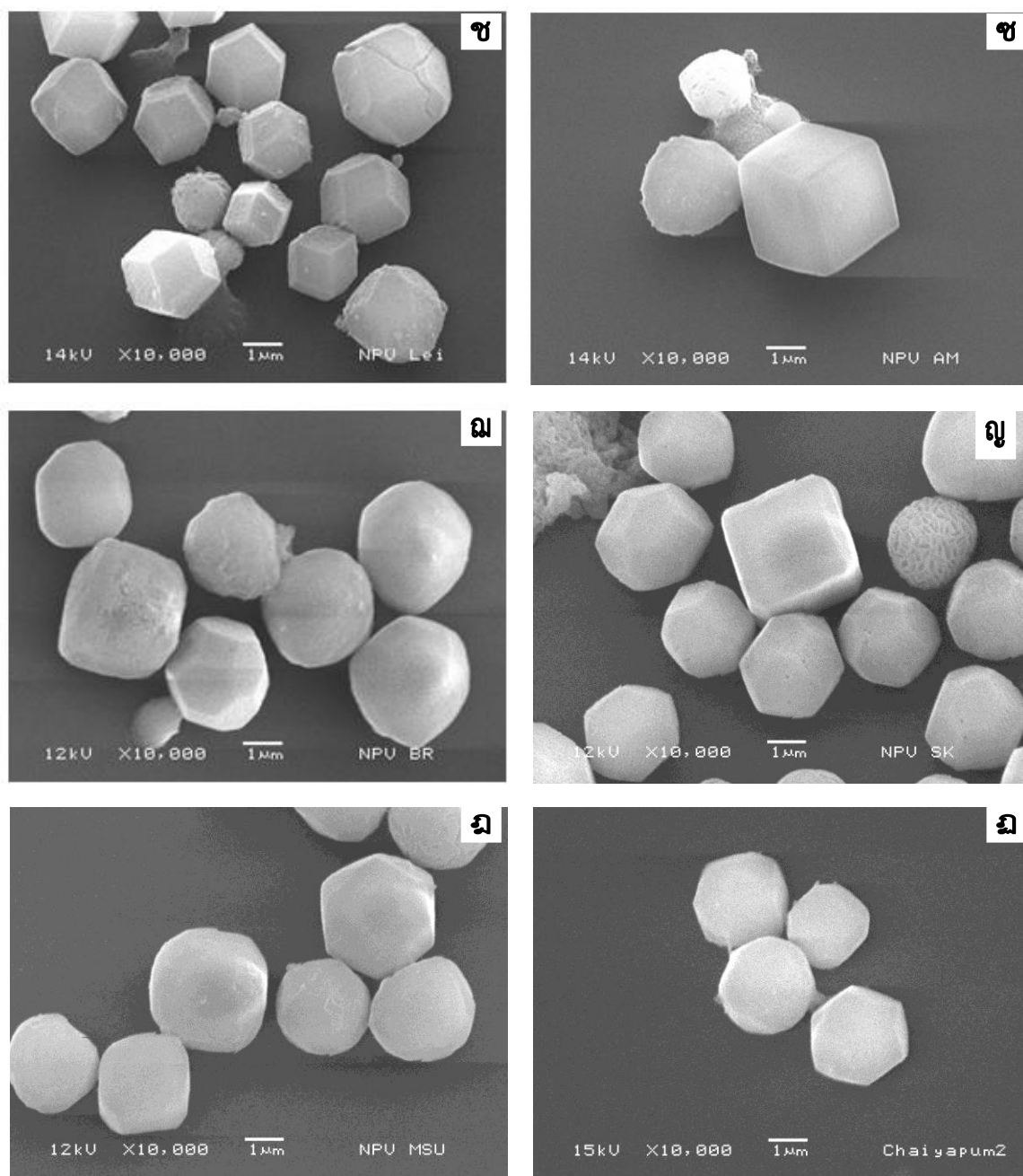
ภาค	จังหวัด	ขนาดของผลึกโปรตีน BmNPV (ไมโครเมตร)	
		กว้าง	ยาว
ตะวันออกเฉียงเหนือ	อำนาจเจริญ	2.49 ± 0.36	2.66 ± 0.31
	ชัยภูมิ	2.63 ± 0.21	2.76 ± 0.20
	มหาสารคาม	2.78 ± 0.39	2.93 ± 0.33
	บุรีรัมย์	2.86 ± 0.27	3.03 ± 0.30
	สกลนคร	2.88 ± 0.21	3.01 ± 0.16
	ขอนแก่น	2.92 ± 0.57	3.07 ± 0.53
	สุรินทร์	3.18 ± 0.00	3.40 ± 0.00
	ศรีสะเกษ	3.37 ± 0.00	3.43 ± 0.00
	ร้อยเอ็ด	3.39 ± 0.36	3.51 ± 0.41
	เลย	-	-
	อุดรธานี	-	-
	อุบลราชธานี	-	-
	นครราชสีมา	-	-
	บึงกาฬ	-	-
เหนือ	พะเยา	2.42 ± 0.68	2.49 ± 0.70
	ตาก	2.53 ± 0.15	2.67 ± 0.16
	สุโขทัย	2.61 ± 0.29	2.69 ± 0.32
	กำแพงเพชร	2.74 ± 0.29	2.93 ± 0.28
	เชียงใหม่	2.84 ± 0.66	2.93 ± 0.69
	พิษณุโลก	2.94 ± 0.47	3.03 ± 0.45
	เพชรบูรณ์	-	-
กลาง	ราชบุรี	2.61 ± 0.34	2.74 ± 0.36
	อุทัยธานี	2.80 ± 0.23	3.01 ± 0.32
	กาญจนบุรี	-	-
ใต้	ชุมพร	2.36 ± 0.27	2.47 ± 0.24
	ระนอง	2.48 ± 0.37	2.73 ± 0.48

ตาราง 4.4 ขนาดของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) รูปทรงกลม ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) จากตัวอย่างหนอนไหมที่แสดงอาการโรคแกรสเซอร์รี่ของแหล่งเลี้ยงไหมจำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้

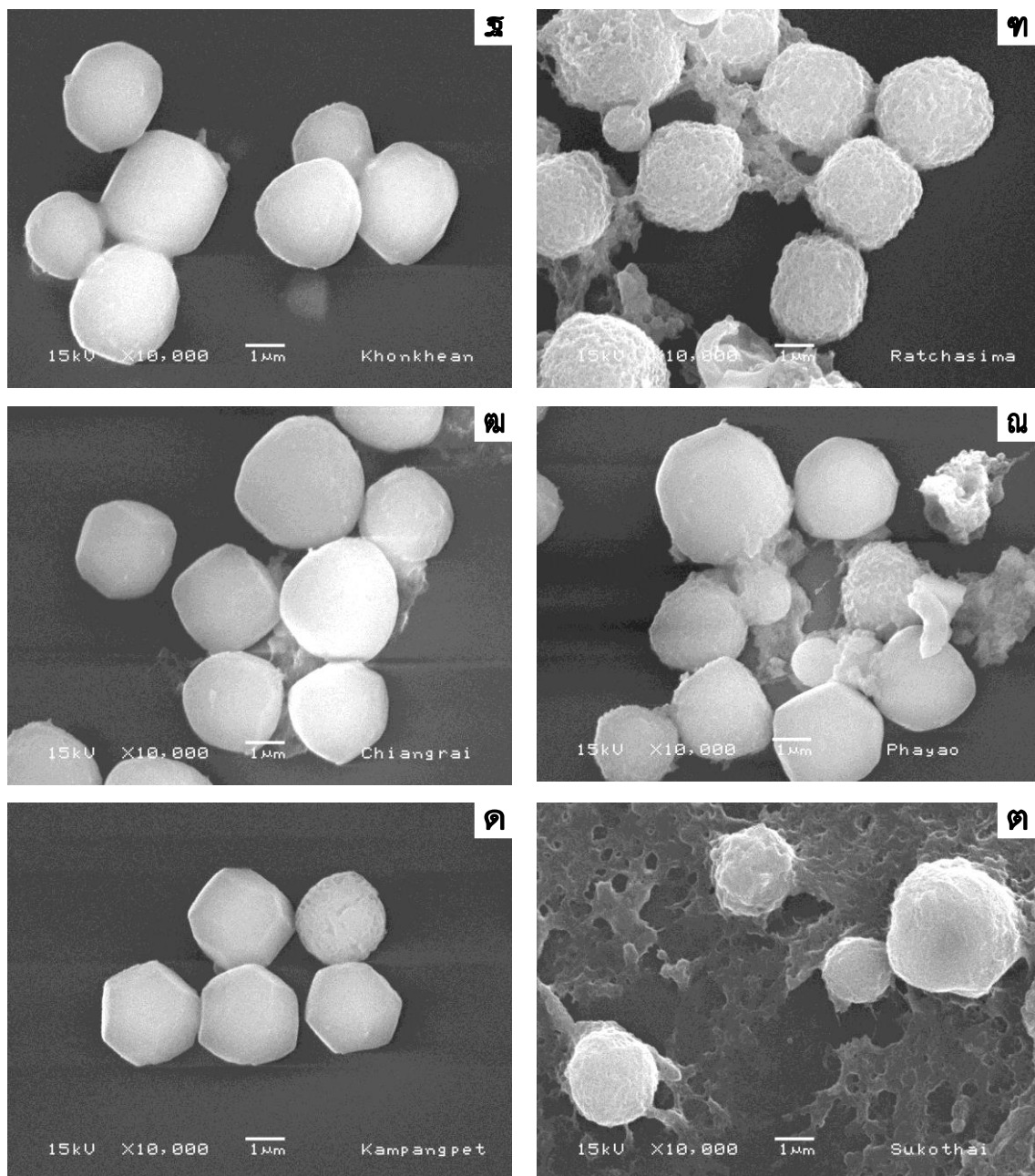
ภาค	จังหวัด	ขนาดของผลึกโปรตีน BmNPV (ไมโครเมตร)
ตะวันออกเฉียงเหนือ	เลย	1.65 ± 0.03
	มหาสารคาม	1.96 ± 0.01
	สกลนคร	2.08 ± 0.07
	อำนาจเจริญ	2.37 ± 0.04
	บุรีรัมย์	2.49 ± 0.06
	ชัยภูมิ	2.56 ± 0.03
	สุรินทร์	2.68 ± 0.09
	ขอนแก่น	2.75 ± 0.11
	อุดรธานี	2.78 ± 0.04
	ศรีสะเกษ	2.79 ± 0.02
	ร้อยเอ็ด	2.86 ± 0.06
	บึงกาฬ	2.87 ± 0.01
	อุบลราชธานี	3.08 ± 0.11
นครราชสีมา	3.22 ± 0.06	
เหนือ	พิษณุโลก	2.25 ± 0.04
	กำแพงเพชร	2.44 ± 0.04
	เพชรบูรณ์	2.47 ± 0.06
	สุโขทัย	2.89 ± 0.07
	พะเยา	2.9 ± 0.02
	เชียงราย	3.14 ± 0.02
	ตาก	3.69 ± 0.07
กลาง	กาญจนบุรี	2.68 ± 0.05
	อุทัยธานี	3.22 ± 0.09
	ราชบุรี	4.96 ± 0.09
ใต้	ระนอง	2.19 ± 0.02
	ชุมพร	3.59 ± 0.00



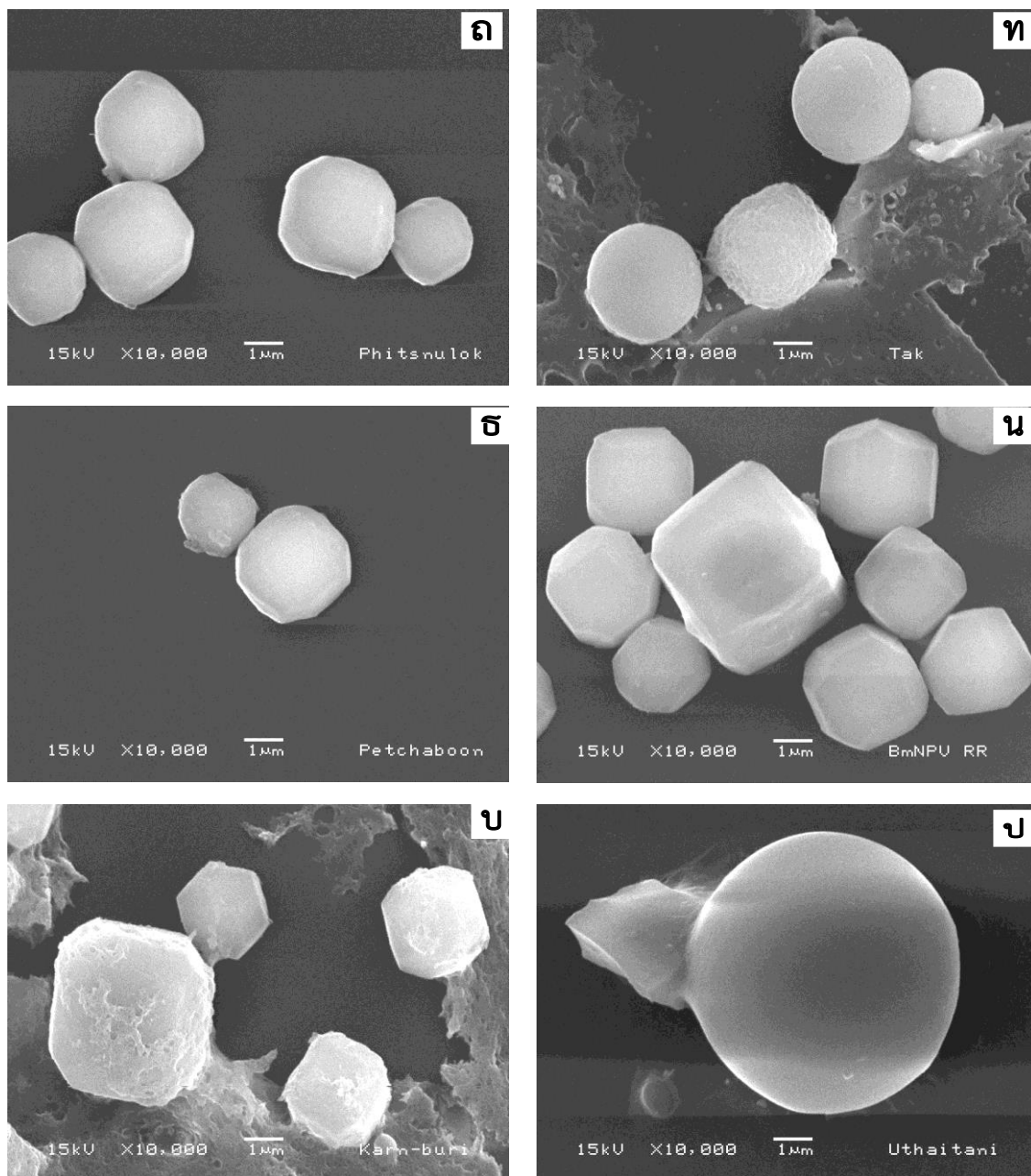
ภาพประกอบ 4.4 สัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน (BmNPV-polyhedra) จากพื้นที่ 26 จังหวัด  
 ที่ทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron  
 Microscope : SEM) ก) ร้อยเอ็ด ข) อุตรธานี ค) บึงกาฬ ง) อุบลราชธานี  
 จ) สุรินทร์ ฉ) ศรีสะเกษ



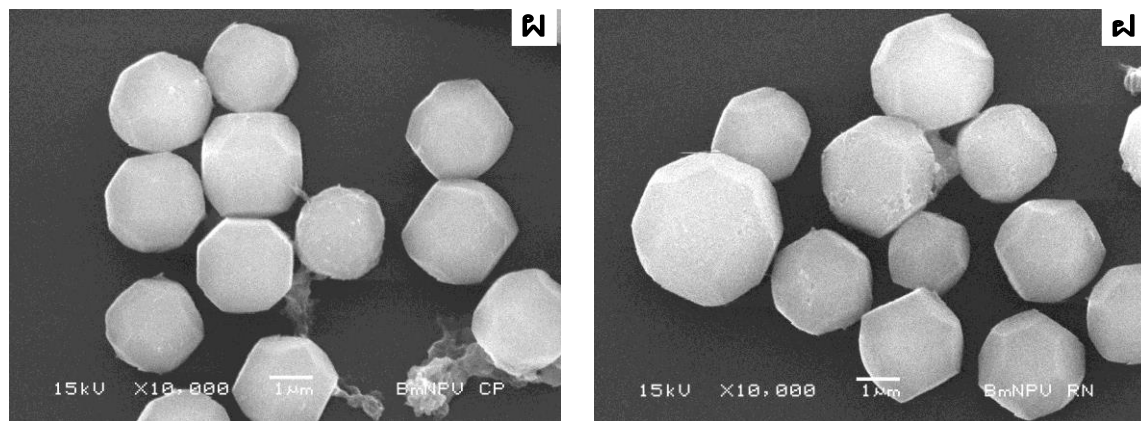
ภาพประกอบ 4.4 (ต่อ) ช) เลย ซ) อำนาจเจริญ ฅ) บุรีรัมย์ ญ) สกลนคร ฉ) มหาสารคาม  
 ฎ) ชัยภูมิ



ภาพประกอบ 4.4 (ต่อ) ข) ขอนแก่น จ) นครราชสีมา ฉ) เชียงราย ณ) พะเยา ด) กำแพงเพชร  
 ต) สุโขทัย

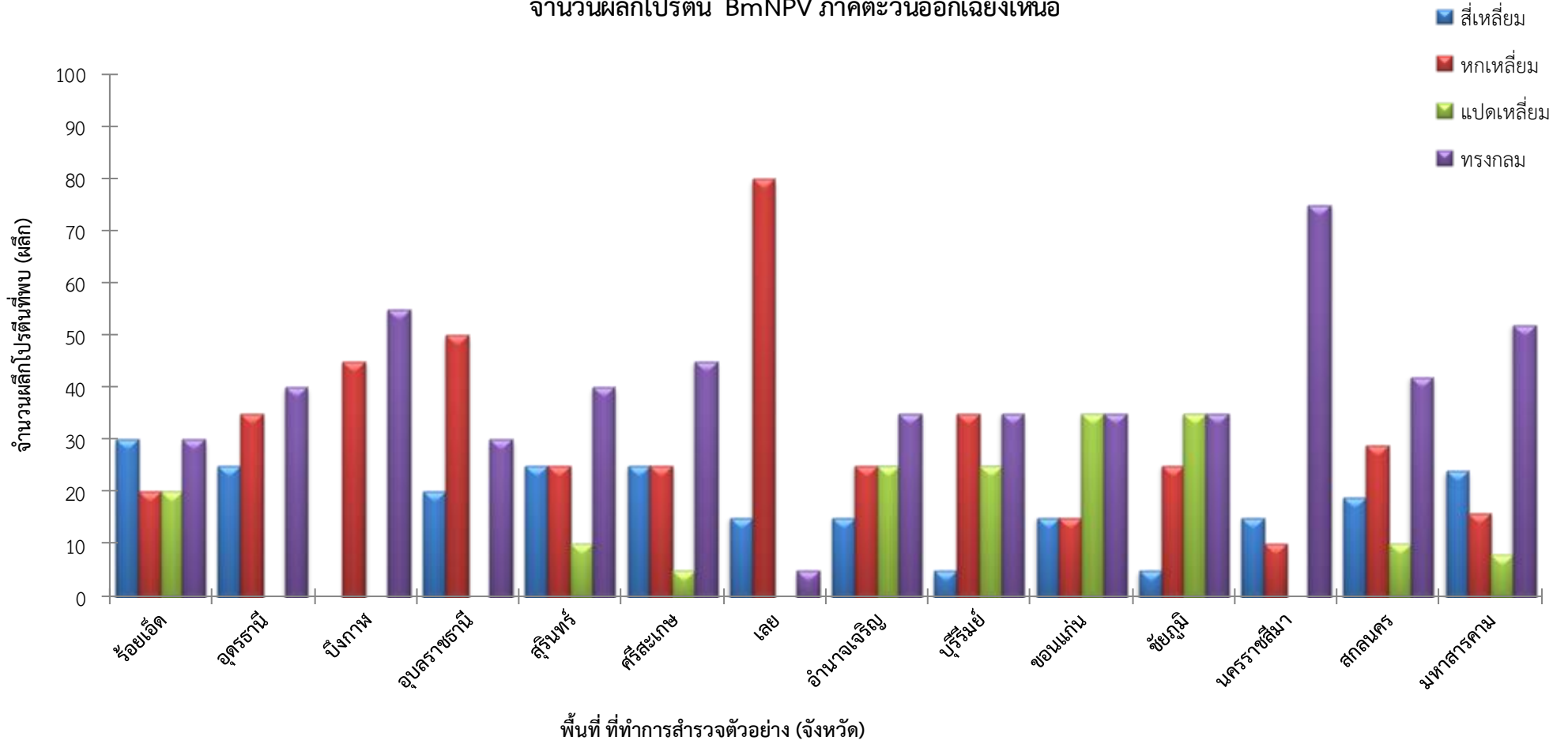


ภาพประกอบ 4.4 (ต่อ) ก) พิษณุโลก ข) ตาก ค) เพชรบูรณ์ ง) ราชบุรี จ) กาญจนบุรี  
ฉ) อุทัยธานี



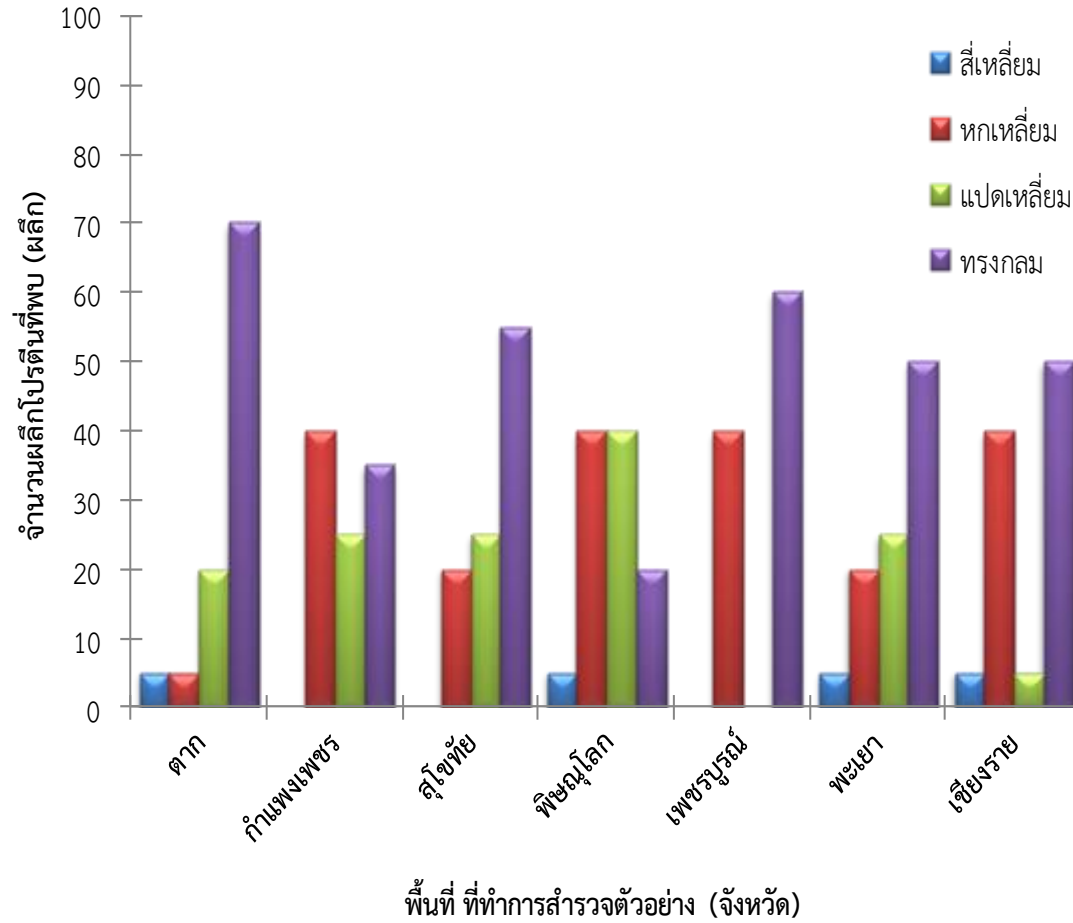
ภาพประกอบ 4.4 (ต่อ) ผ) ชุ่มพร ฝ) ระนอง

### จำนวนผลึกโปรตีน BmNPV ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ



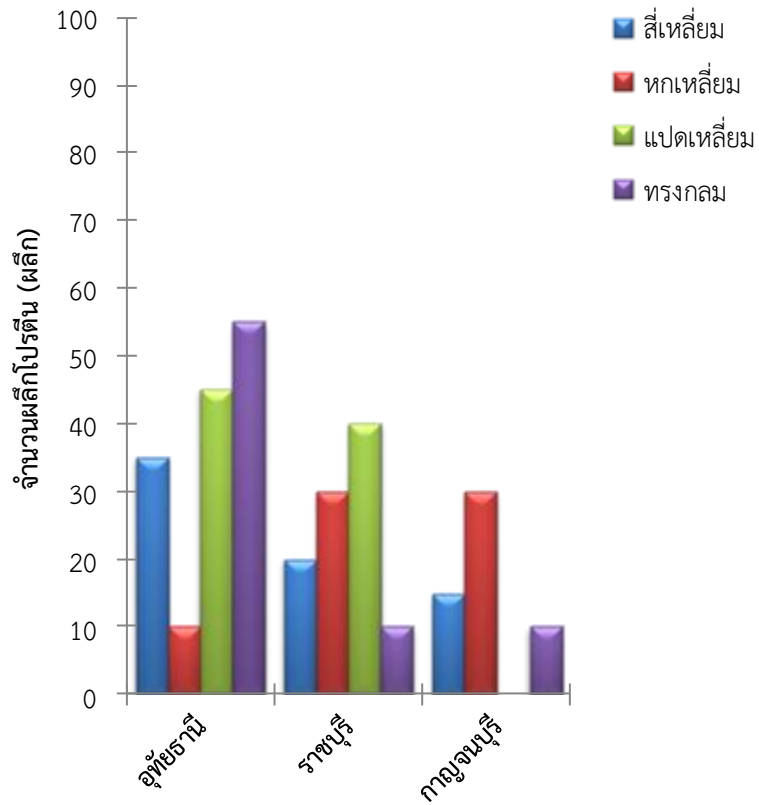
ภาพประกอบ 4.5 แสดงจำนวนผลึกโปรตีนแต่ละรูปร่างของผลึกโปรตีน BmNPV จากจำนวน 100 ผลึก/พื้นที่

### จำนวนผลึกโปรตีน BmNPV ภาคเหนือ



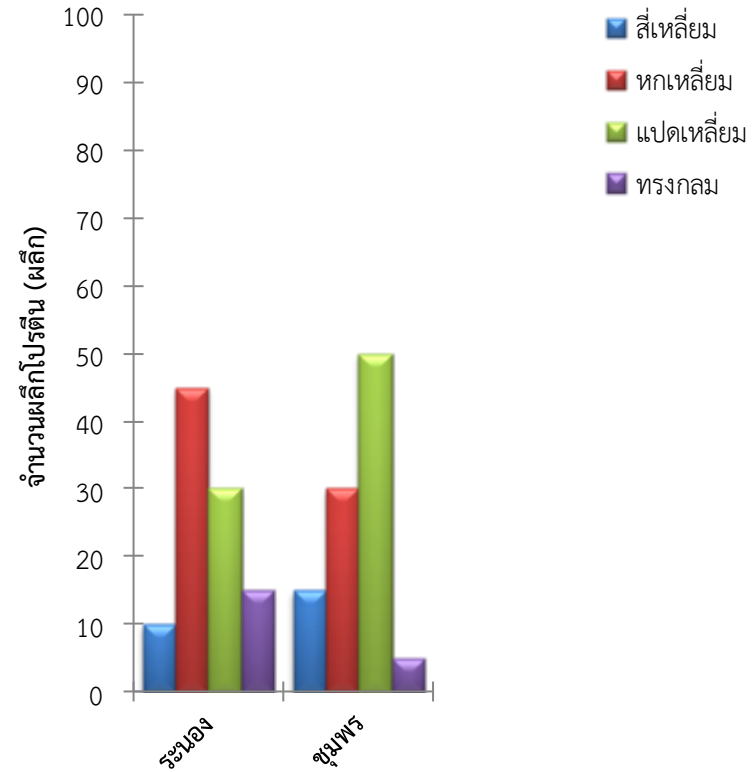
ภาพประกอบ 4.5 (ต่อ)

จำนวนผลึกโปรตีน BmNPV ภาคกลาง



พื้นที่ ที่ทำการสำรวจตัวอย่าง (จังหวัด)

จำนวนผลึกโปรตีน BmNPV ภาคใต้



พื้นที่ ที่ทำการเก็บตัวอย่าง (จังหวัด)

ภาพประกอบ 4.5 (ต่อ)

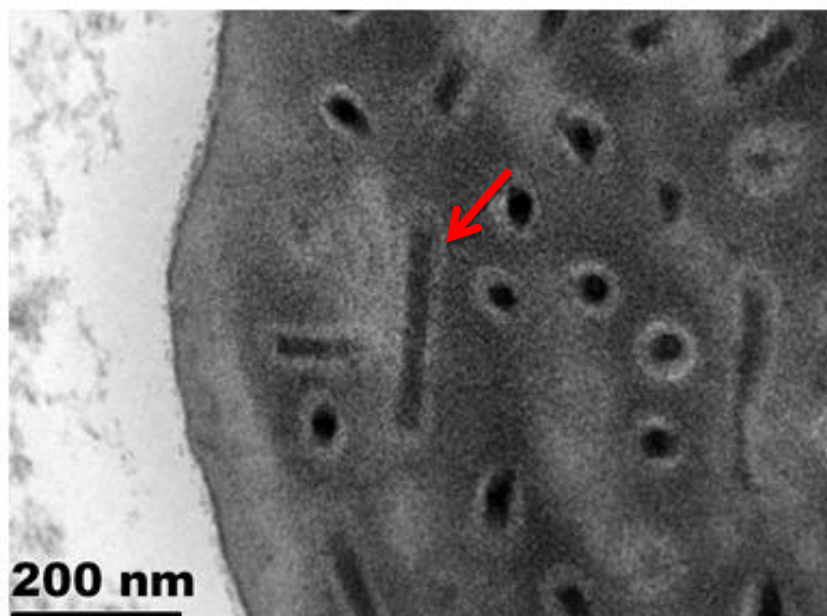
### 4.3 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid)

ผลการศึกษารูปร่าง และจำนวนของอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน จากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีนมีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod – shaped) มีผนังล้อมรอบซึ่ง เรียกว่า envelope และมีจำนวนอนุภาคไวรัสฝังตัวแบบอนุภาคเดี่ยว คือ นิวคลีโอแคพซิด 1 แห่ง ต่อ อนุภาค ฝังตัวกระจุกกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีน จัดเป็น single – nucleopolyhedrovirus (SNPV) (ภาพประกอบ 4.6 ก) และอนุภาคไวรัสที่มีนิวคลีโอแคพซิด ตั้งแต่ 2 ถึง 8 แห่ง ต่อ อนุภาค ฝังตัวอยู่ภายในผลึกโปรตีน จัดเป็น multiple – nucleopolyhedrovirus (MNPV) (ภาพประกอบ 4.6 ข)

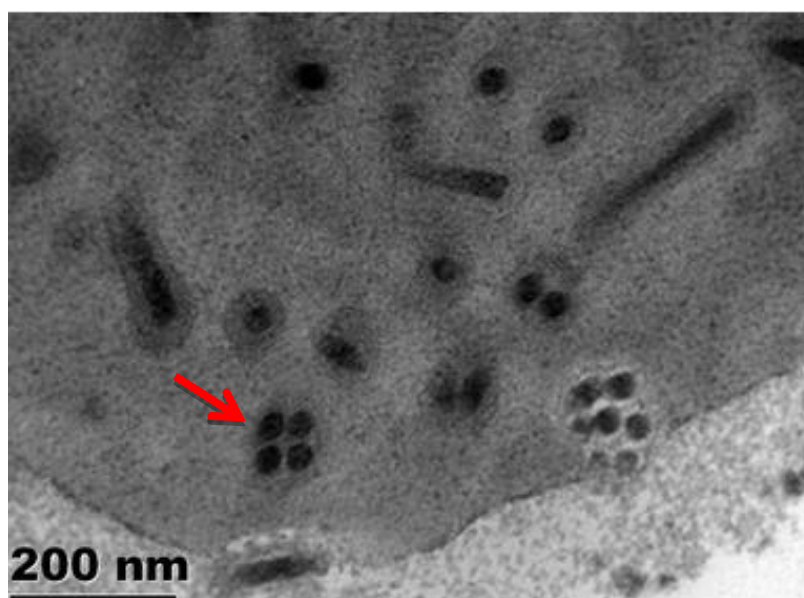
Single – nucleopolyhedrovirus พบที่จังหวัดร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น เชียงราย พะเยา กำแพงเพชร ตาก อุทัยธานี ราชบุรี และ กาญจนบุรี มีขนาดความกว้าง และยาวเฉลี่ย  $22.6 \pm 5.93 \times 227.2 \pm 56.33$  นาโนเมตร (ตาราง 4.5) คิดเป็นร้อยละ 38.46 ของพื้นที่ ที่ทำการศึกษา โดยอนุภาคไวรัสที่มีขนาดกว้างที่สุด คือ  $40 \pm 0.00$  นาโนเมตร พบที่จังหวัดอุทัยธานี และอนุภาคไวรัสที่ยาวที่สุด พบที่จังหวัดกาญจนบุรี คือ  $284 \pm 29.39$  นาโนเมตร

Multiple – nucleopolyhedrovirus อนุภาคไวรัสมีขนาดความกว้าง และยาว เฉลี่ย  $28.93 \pm 7.61 \times 232.53 \pm 19.64$  นาโนเมตร พบอนุภาคไวรัสชนิดนี้ที่จังหวัดอุดรธานี บึงกาฬ อุบลราชธานี สุรินทร์ ศรีสะเกษ เลย อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ สกลนคร ชัยภูมิ นครราชสีมา สุโขทัย พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ชุมพร และระนอง คิดเป็นร้อยละ 61.53 ของพื้นที่ ที่ทำการศึกษา โดยมีขนาดกว้างที่สุด คือ  $40 \pm 0.00$  นาโนเมตร พบที่จังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ สุโขทัย และระนอง และอนุภาคไวรัสยาวที่สุด พบที่จังหวัดอุบลราชธานี คือ  $256 \pm 14.96$  นาโนเมตร

ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพนิช สิ้นชัยศรี (2531) ที่อธิบายว่าใน NPV ของหนอนไหม วิริออน เกือบทั้งหมดเป็น Single – embedded แต่สอดคล้องกับการรายงานของ Bergold (1953) คือ NPV ของหนอนไหมมี Nucleocapsid ถึง 7 แห่ง และ Khosaka และคณะ (1971) ที่พบอนุภาคไวรัสที่หนอนตรง ขนาด  $80 \times 330$  นาโนเมตร และ ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพนิช สิ้นชัยศรี (2531) ที่รายงานพบอนุภาคไวรัสขนาดค่อนข้างยาว เฉลี่ย 340 นาโนเมตร และกว้างประมาณ 45 นาโนเมตร



ก.

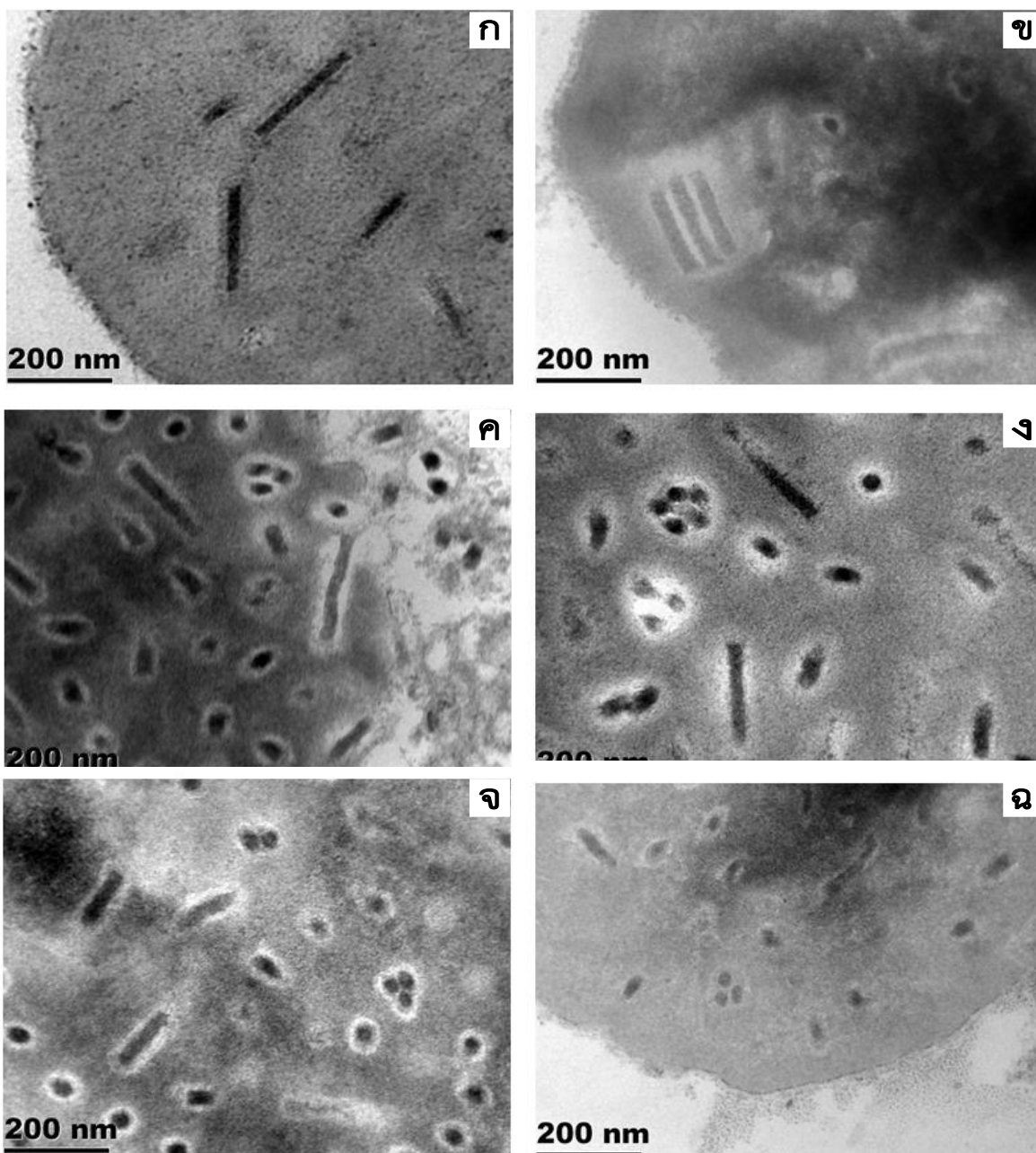


ข.

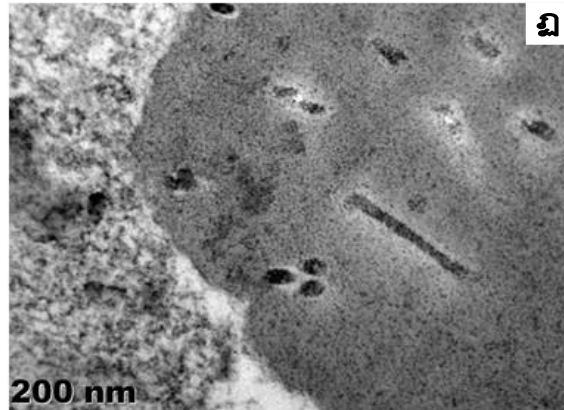
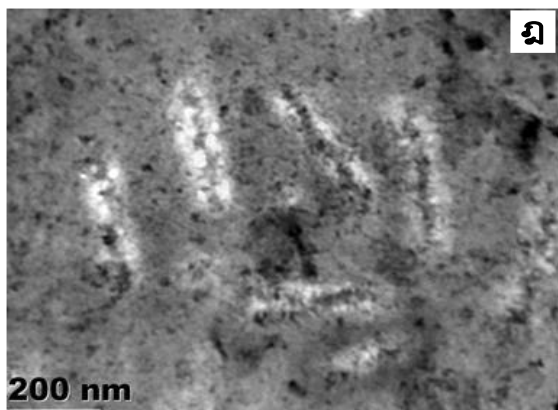
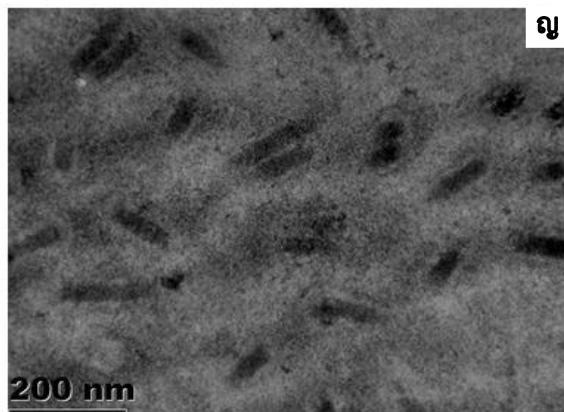
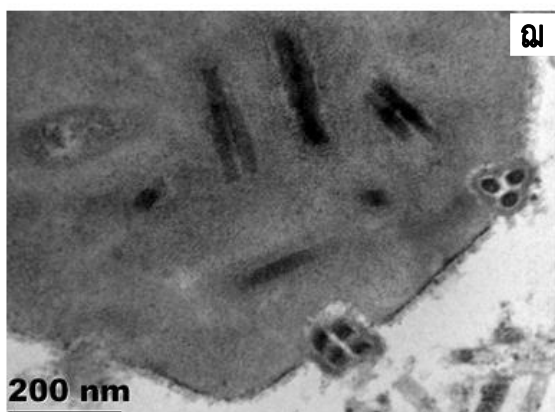
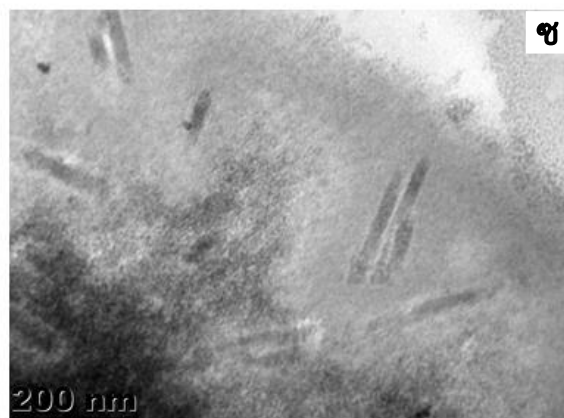
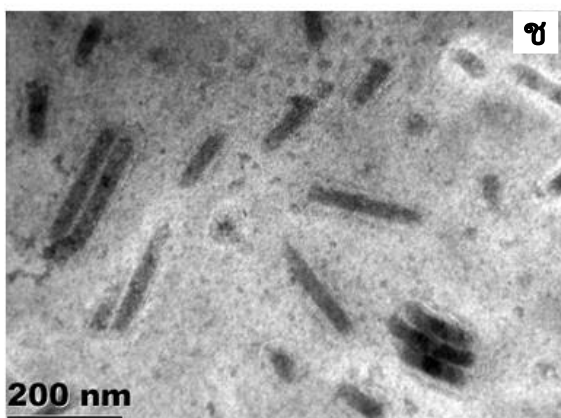
ภาพประกอบ 4.6 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM)  
 ก) แสดงจำนวนอนุภาคไวรัสแบบ single – nucleopolyhedrovirus (สรชี้)  
 ข) แสดงจำนวนอนุภาคไวรัสแบบ multiple – nucleopolyhedrovirus (สรชี้)

ตาราง 4.5 ขนาดความกว้าง และความยาว ของอนุภาคไวรัส BmNPV วัดจากอนุภาคไวรัส จำนวน 5 อนุภาค ต่อ พื้นที่ จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

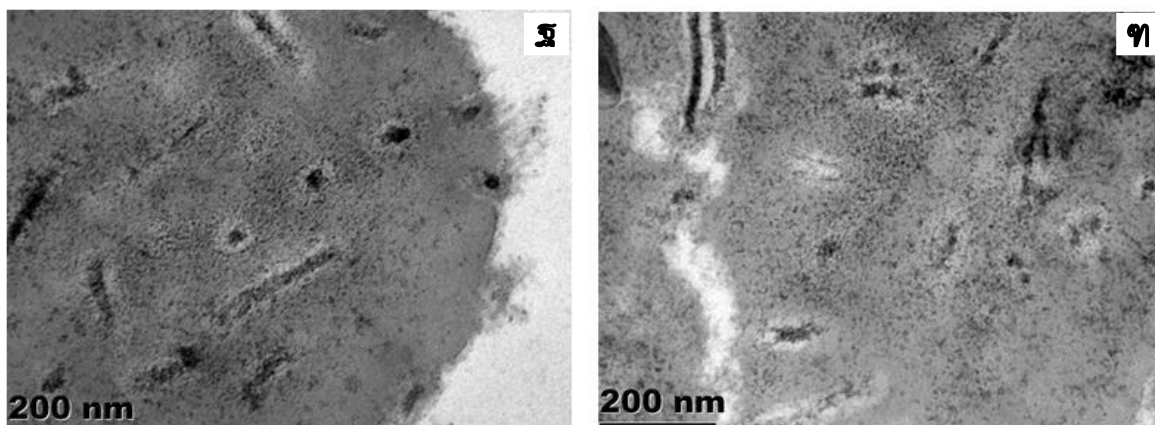
พื้นที่ที่ทำการสำรวจ	ขนาดของอนุภาคไวรัส BmNPV		ชนิดของ BmNPV		
	กว้าง (นาโนเมตร)	ยาว (นาโนเมตร)	SNPV	MNPV	
ภาค ตะวันออกเฉียงเหนือ	ร้อยเอ็ด	20 ± 0.00	248 ± 16.00	✓	-
	อุดรธานี	30 ± 0.00	224 ± 42.70	-	✓
	บึงกาฬ	20 ± 0.00	224 ± 23.32	-	✓
	อุบลราชธานี	40 ± 0.00	256 ± 14.96	-	✓
	สุรินทร์	40 ± 0.00	232 ± 20.39	-	✓
	ศรีสะเกษ	20 ± 0.00	228 ± 16.00	-	✓
	เลย	30 ± 0.00	228 ± 27.12	-	✓
	อำนาจเจริญ	24 ± 8.00	244 ± 26.53	-	✓
	บุรีรัมย์	30 ± 0.00	228 ± 16.00	-	✓
	สกลนคร	20 ± 0.00	180 ± 17.88	-	✓
	มหาสารคาม	20 ± 0.00	272 ± 9.79	✓	-
	ชัยภูมิ	20 ± 0.00	248 ± 27.12	-	✓
	ขอนแก่น	24 ± 4.89	248 ± 41.18	✓	-
	นครราชสีมา	26 ± 4.89	248 ± 24.00	-	✓
ภาคเหนือ	เชียงราย	20 ± 0.00	208 ± 43.08	✓	-
	พะเยา	20 ± 0.00	200 ± 71.55	✓	-
	กำแพงเพชร	20 ± 0.00	224 ± 57.13	✓	-
	สุโขทัย	40 ± 0.00	248 ± 57.41	-	✓
	พิษณุโลก	30 ± 0.00	204 ± 55.71	-	✓
	ตาก	22 ± 4.00	256 ± 34.40	✓	-
ภาคกลาง	เพชรบูรณ์	30 ± 0.00	216 ± 29.39	-	✓
	ราชบุรี	20 ± 0.00	256 ± 14.96	✓	-
	กาญจนบุรี	20 ± 0.00	284 ± 29.39	✓	-
ภาคใต้	อุทัยธานี	40 ± 0.00	76 ± 19.59	✓	-
	ชุมพร	24 ± 4.89	240 ± 28.28	-	✓
	ระนอง	40 ± 0.00	256 ± 46.30	-	✓



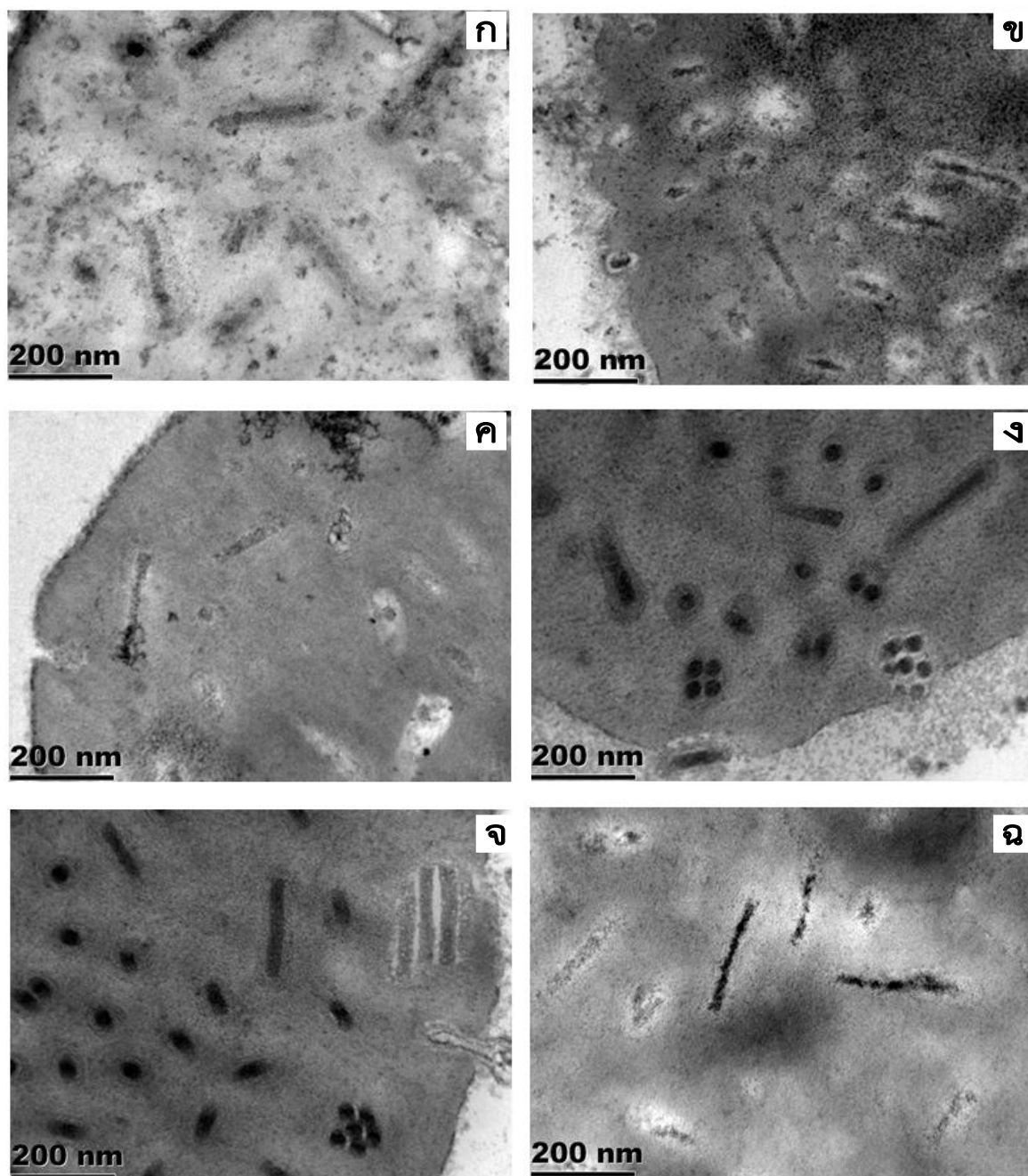
ภาพประกอบ 4.7 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาควัฒนออกเฉียงเหนือ จาก การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ก) ร้อยเอ็ด ข) อุดรธานี ค) บึงกาฬ ง) อุบลราชธานี จ) สุรินทร์ ฉ) ศรีสะเกษ



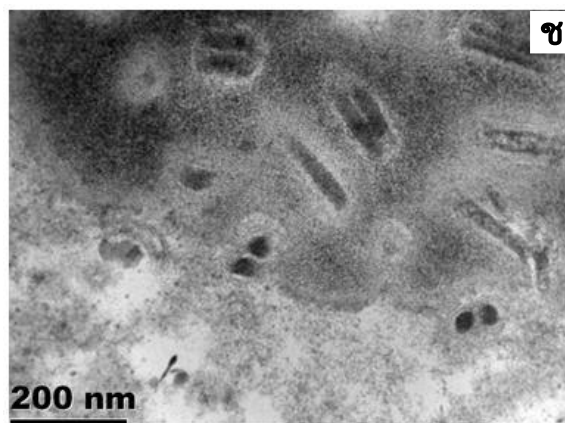
ภาพประกอบ 4.7 (ต่อ) ซ) เลย ซ) อำนาจเจริญ ณ) บุรีรัมย์ ณ) สกลนคร ณ) มหาสารคาม  
ณ) ชัยภูมิ



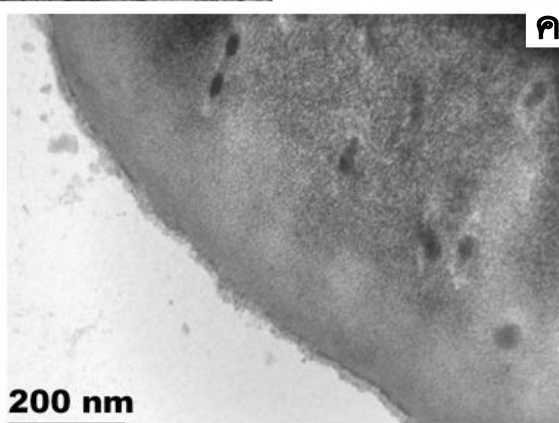
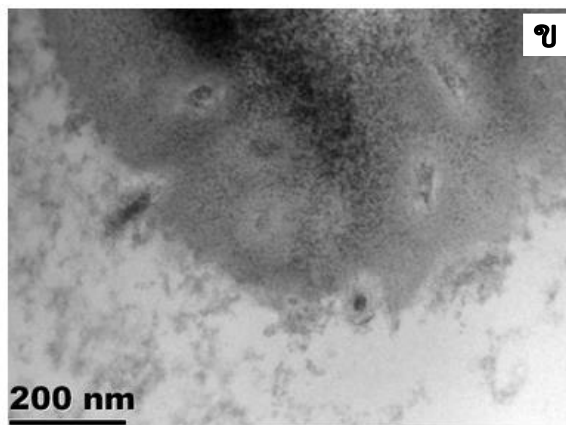
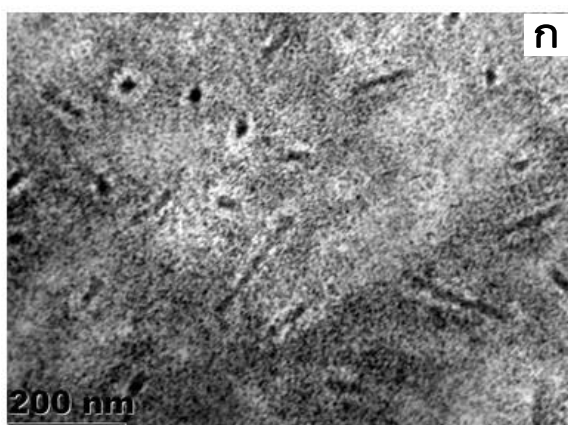
ภาพประกอบ 4.7 (ต่อ) จ) ขอนแก่น ก) นครราชสีมา



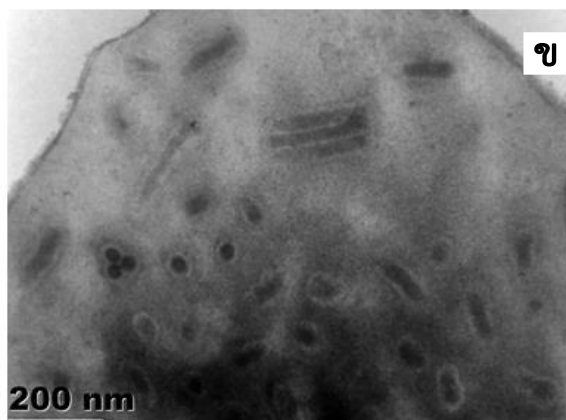
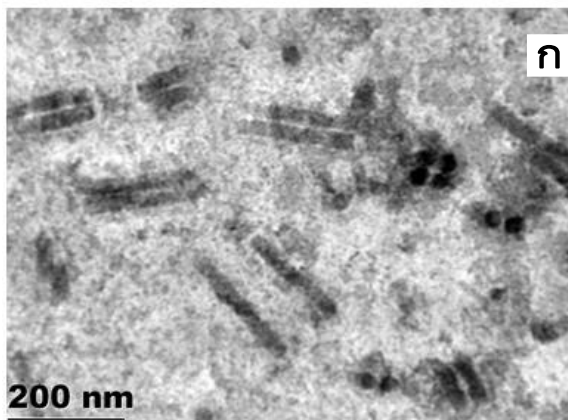
ภาพประกอบ 4.8 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาคเหนือ จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ก) เชียงราย ข) พะเยา ค) กำแพงเพชร ง) สุโขทัย จ) พิษณุโลก ฉ) ตาก



ภาพประกอบ 4.8 (ต่อ) ซ) เพชรบูรณ์



ภาพประกอบ 4.9 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาคกลาง จากการศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ก) ราชบุรี ข) กาญจนบุรี ค) อุทัยธานี



ภาพประกอบ 4.10 โครงสร้างอนุภาคไวรัส (BmNPV – nucleocapsid) ภาควัสดุ จากการศึกษาด้วย กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ก) ชุมพร ข) ระนอง

## บทที่ 5

### สรุปผล

จากการออกสำรวจและศึกษาหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์รี่ จากหนอนไหมของเกษตรกรที่เลี้ยงไหม จำนวน 26 จังหวัด ในเขตพื้นที่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ พบว่า ลักษณะการเลี้ยงไหมของเกษตรกรเป็นแบบดั้งเดิม ซึ่งเป็นการเลี้ยงไหมแบบครอบครัวเดียว และการเลี้ยงเป็นกลุ่มหรือแบบสหกรณ์ พันธุ์ไหมที่นิยมเลี้ยง ได้แก่ นางสีว นางตุ่น นางลาย นางน้อย ซึ่งเป็นไหมไทยพื้นเมือง รังไหมมีขนาดเล็ก สีเหลือง และพบอาการของโรคแกรสเซอร์รี่ ในหนอนไหมวัย 4 ถึง วัย 5 คือ หนอนไหมมีลักษณะตัวซีดเหลือง หรือ ขาวชून หยดกินใบหม่อน มีพฤติกรรมไต่ขึ้นตามกระดังหรือที่สูงของภาชนะที่เลี้ยง ผันงลำตัวเพราะและแตก ปล่อน้ำเลือดสีเหลืองชून ซึ่งมีผลึกโปรตีนปนอยู่เป็นจำนวนมาก หนอนไหมจะแสดงอาการของโรคให้เห็นก่อนเข้าจ่อสร้างรัง แล้วตายภายใน 4 ถึง 7 วัน

จากการศึกษาสัณฐานวิทยาของผลึกโปรตีน BmNPV จากหนอนไหมที่เป็นโรคแกรสเซอร์รี่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าผลึกโปรตีน BmNPV ในประเทศไทย มี 4 รูปแบบ คือ รูปสี่เหลี่ยม (cuboidal shape) หกเหลี่ยม (hexagonal shape) แปดเหลี่ยม (octagonal shape) และรูปทรงกลม (globular shape) ผลึกโปรตีนที่พบมากที่สุด คือ รูปทรงกลม หกเหลี่ยม สี่เหลี่ยม และแปดเหลี่ยม คิดเป็น 100, 100, 84.61 และ 73.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

และการศึกษารูปร่าง และจำนวนของอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัสมีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผนังล้อมรอบ เรียกว่า envelope และมีจำนวนอนุภาคไวรัส ที่มีนิวคลีโอแคพซิด จำนวน 1 แท่ง ต่อ อนุภาค ฝัगतัวกระจัดกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีน จัดเป็น single – embedded NPV และนิวคลีโอแคพซิด จำนวน 2 ถึง 8 แท่ง ต่อ อนุภาค ฝัगतัวอยู่ภายในผลึกโปรตีน จัดเป็น multible – embedded NPV

ในการศึกษารังนี้พบโครงสร้างของผลึกโปรตีนเป็นรูปแปดเหลี่ยม ซึ่งยังไม่มีรายงานมาก่อนว่าพบโครงสร้างของผลึกโปรตีนรูปแปดเหลี่ยมของหนอนไหมในประเทศไทย และอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน BmNPV ในประเทศไทย มีทั้งชนิด SNPV และ MNPV เพราะสามารถพบอนุภาคไวรัสทั้ง 2 ชนิดในพื้นที่ ที่ทำการสำรวจ คิดเป็นร้อยละ 38.46 และ 61.53 ตามลำดับ ดังนั้นลักษณะทางภูมิอากาศ และภูมิศาสตร์ ไม่มีผลต่อสัณฐานวิทยาของ BmNPV

เอกสารอ้างอิง

## เอกสารอ้างอิง

- กมลทิพย์ กสิภาร์. (2550). *อนุกรมวิธาน*. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยราชภัฏนครราชสีมา.
- กรมศุลกากร. (2555). *สรุปมูลค่านำเข้า-ส่งออกครึ่งใหม่ เส้นไหม ผ้าไหม และผลิตภัณฑ์ไหม (ม.ค.-ก.ย. 2555)*. กรุงเทพฯ: กลุ่มเศรษฐกิจการค้า สำนักพัฒนาถ่ายทอดเทคโนโลยีฯ กรมหม่อนไหม.
- กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา. (2548). *เทคโนโลยีการใช้ไวรัสเอ็นพีวีทดแทนสารเคมีควบคุมแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ: สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- จิราภา กุลสาริน. (2554). *การผลิตหม่อนไหม*. เชียงใหม่: สาขาวิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2538). *แมลงที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร*. กรุงเทพฯ: กรมส่งเสริมการเกษตร.
- . (2549). *ไวรัสของแมลง : นิวเคลียโอโพลีอีโตรไวรัส*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- . (2535). *โรควิทยาของแมลง*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม และเนื่องพนิช สินชัยศรี. (2531). นิวเคลียโอโพลีอีโตรไวรัสของหนอนไหม *Bombyx mori* ที่พบในประเทศไทย. *วารสารวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ*, 20(2).
- ทิพย์วดี อรรถธรรม และพิสสุวรรณ พูลพล. (2527). นิวเคลียโอโพลีอีโตรไวรัสของหนอนคืบ *กะหล่ำปลีในประเทศไทย*. รายงานผลการวิจัย กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- . (2531). นิวเคลียโอโพลีอีโตรไวรัสของหนอนไหม. กรุงเทพฯ: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม และศิรินันท์ เอี่ยมประภา. (2526). *สัณฐานวิทยา โครงสร้างจุลภาคและโรควิทยาของนิวเคลียโอโพลีอีโตรไวรัสของหนอนกระทู้หอม Spodoptera exigua*. รายงานค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2526. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม และสุดาวรรณ เขยชมศรี. (2530). *เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช*. นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- ธงชัย สิทธิสงคราม และสุเมณี รักสังข์. (2529). *การสำรวจความเสียหายและฤดูกาลเกิดโรคแกรสเซอร์รี่ของหนอนไหมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2529. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร.
- ประหยัด ทีฆาวงศ์. (2551). *โรคแมลงศัตรูไหมและการป้องกันกำจัด*. กรุงเทพฯ: ศูนย์การจัดการความรู้ด้านการเกษตรเพื่อการพัฒนา สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.
- พรรณนภา ศักดิ์สูง และชาญชัย ถาวรอนุกุลกิจ. (2540). *วิเคราะห์อุปสรรคปัญหา ในการพัฒนาหม่อนไหม*. กรุงเทพฯ: ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

- เพทาย บุญยรัตพันธุ์ และรัตนสุณี สุขพนิชนันท์. (2557). *ชีววิทยา 1. แอคทีฟพรีนซ์*. กรุงเทพฯ. มาลี ตั้งระเบียบ. (2536). *การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อนิวเคลียรีโพลีฮีโดรซิสไวรัส สาเหตุโรคแกรสเซอร์รี่ของหนอนไหมในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- มัลลิกา แก้ววิเศษ. (2548). *การตรวจสอบเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ของหนอนไหม Bombyx mori ด้วยเทคนิค PCR*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ยุพดี เผ่าพันธุ์. (2557). *กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอน*. [ออนไลน์]. ได้จาก: [www2.rdi.ku.ac.th/newweb/cl/documents/semelectronsourc\\_onweb](http://www2.rdi.ku.ac.th/newweb/cl/documents/semelectronsourc_onweb) [สืบค้นเมื่อ 2558].
- ศุภย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ ศรีษะเกษ. (2548). *ไหมเกี่ยวกับไหม*. ศรีษะเกษ: ศุภย์หม่อนไหมเฉลิมพระเกียรติสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์ พระบรมราชินีนาถ
- สิริภักดิ์ สุระพร. (2552). *โรควิทยาของไหมและการตรวจวินิจฉัยโรค*. เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 0203472. มหาสารคาม: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- สิริภักดิ์ สุระพร, ภาณุวรรณ จันทาญ, จิราภา บุติมาลย์, มีทุรีย์ เวียนแก่น้อย และวารภรณ์ สุทธิสา. (2548). *การเกิดโรคแกรสเซอร์รี่ของหนอนไหมที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมและใบหม่อน*. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*, 24(2), 27 – 32.
- สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต. (2551). *การตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ PCR-Based Typing*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาของเซลล์และโมเลกุล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญชลี พัดมีเทศ. (2538). *หม่อนไหม*. นครราชสีมา: ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- อารีย์ งามศิริวัฒนกุล. (2539). *ไหมและผลิตภัณฑ์ไหม*. กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการลงทุน.
- อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. (2531). *เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเบื้องต้น*. กรุงเทพฯ: ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลางบางเขน สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Adams, J. R., Goodwin, R. H. and Wilcox, T. A. (1997). Electron microscopic investigation on invasion and replication of insect baculoviruses *in vivo* and *in vitro*. *Biology Cell*, 28, 261 – 268.
- Adams, J. R. and Wilcox, T. A. (1982). Scanning electronmicroscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. *Journal Invertebrates Pathology*, 40, 12-20.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez – Ferber, M. and Possee, R. D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202, 586 – 605.

- Bergold, G. H. (1947). Die Isolierung des Polyeder – Virus and die Natur der Polyeder. *Z. Naturforsch. Teil B*, 2, 122 – 143.
- . (1963). Fine structure of some insect viruses. *Journal Insect Pathology*, 5(11), 111 – 128.
- . (1963). The molecular structure of some insect virus inclusion bodies. *J. Ultrastr. Res.*, 8, 360 – 378.
- Bilimoria, S. L. (1986). Taxonomy and identification of baculoviruses. In Grandos, R.F. and Federici, B.A. (Eds.). *The biology of baculoviruses vol : Biological properties and molecular biology*. p. 37-60. Florida: CRC Press.
- Brancahão, R. M. C., Souza, V. B. V. and Soares, M. A. M. (2002). Infecção causada por Nucleopolyhedrovirus nas células gordurosas de *Bombyx mori* L. 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Arq. Inst. Biol.*, 69, 57–63.
- Bozzola, J. J. and Russell, L. D. (1992). *Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologists*. Boston: Jones and Bartlett Publishing.
- Cheng, X.W., Carner, G.R. and Fescemyer, H. W. (1998). Polyhedrin sequence determines the tetrahedral shape of occlusion bodies in *thysanoplusia orichalcea* single – nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 79, 2549 – 2556.
- Cheryl, I. M., Piwnica-Worms, H., Grünwald, S., Romanow, W. G., Francis, N. and Hua-Ying, F. (2004). *Overview of the Baculovirus Expression System*. n.p.: n.p.
- Cornalina, E. (1856). Monografia del bombice del gelso. *Mem. R. Istit. Lombardo Sci. Lett. Arte.*, 6, 3 – 387.
- Dimmock, N. J., Easton Andrew, J. and Leppard, K. (2007). *Introduction to Modern Virology*. 6th ed. n.p.: Blackwell Publishing.
- Dow, J. A. (1984). Extremely high pH in biological systems: a model for carbonate transport. *Am. J. Physiol.*, 246, R633 – R636.
- Faulkner, P. (1981). Baculovirus. In Davidson, E.W. (Ed.), *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. p. 3 – 33. Allanheld, Osmun: Totowa Nj.
- Federici, B. A. (1997). Baculovirus pathogenesis. In L. K. Miller. (ed.). *The Baculoviruses* p. 33 – 59. New York: Plenum Press.
- Fernandez, M. A., Ribeiro, L. F. C., Brancahão, R. M. C. and Torquato, E. F. B. (2009). Susceptibility of the *Bombyx mori* cardia cells to Nucleopolyhedrovirus, multiple subgroup, BmMNPV. *Journal of Invertebrate Pathology*, 100, 195 – 198.

- Friesen, P. D. (1993). Invertebrate transposable elements in the baculovirus genome: characterization and significance. In Beckage, N. E., Thompson, S. N. and Federici, B. A. (Eds.). *Parasites and pathogens of insects*. p. 147 – 178. San Diego: Academic Press.
- Friesen, P. D. and Miller, L. K. (1986). The regulation of baculovirus gene expression. In Doerffer, W. and Boehm, P. (Eds.). *The Molecular Biology of Baculoviruses*. Berlin: Springer – Verlag. p. 31 – 49.
- Gomi, S., Majima, K. and Maeda, K. (1999). Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 80, 1323 – 1337.
- Goodman, D., Ollikainen, N. and Sholley, C. (2007). Baculovirus Phylogeny Based on Genome Rearrangement. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 69 – 82.
- Granados, R. R. and Lawler, K. A. (1981). In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. *Virology*, 108, 297 – 308.
- Himeno, M., Yasuda, S., Khosaka, T. and Onoder, K. (1968). The fine structure of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Invertebr. Pathol.* 11, 516 – 519.
- Hong, H. K., Woo, S. D., Choi, J. Y., Lee, H. K., Kim, M. H., Le, Y. H. and Kang, S. K. (2000). Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Archives of Virology*, 145, 2351 – 2361.
- Hughes, K. M. (1972). Fine structure and development of two polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.*, 19, 198 – 207.
- Jakubowska, A., Oers, M. M. V., Ziemnicka, J., Lipa, J. J. and Vlak, J. M. (2005). Molecular characterization of *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus from Poland. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(1), 64-68.
- Katsuma, S., Noguchi, Y., Shimada, T., Nagata, M., Kobayashi, M. and Maeda, S. (1999). Molecular characterization of baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus polyhedron mutants. *Archives of Virology*, 144, 1275 – 1285.
- Kawanishi, C. Y., Summers, M. D., Stoltz, D. B. and Arnott, H. J. (1972). Entry of an insect virus *in vivo* by fusion of viral envelope and microvillus membrane. *J. Invertebr. Pathol.*, 20, 104 – 108.
- Kogan, P. H. and Blissard, G. W. (1994). A baculovirus *gp64* early promoter is activated by host transcription factor binding to CACGTG and GATA elements. *J. Virol.*, 68, 813 – 822.
- Koslov, E. A. and Alexeenko, I. P. (1967). Electron microscopic investigation of the structure of the nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 9, 413 – 419.
- Khosaka, T., Himeno, M. and Onoder, K. (1971). Separation and structure of component of nuclear polyhedrosis virus of the silkworm. *J. Virol*, 7(2), 267 – 273.

- Kumpratueang, S. (1998). *Development of DNA probe for early detection of grassery disease of silkworm*. Master Thesis. Kaseetsart university. Bangkok. Thailand.
- Lu, A. and Miller, L. K. (1997). Regulation of baculovirus late and very late gene expression. In Miller, L. K. (ed.). *The Baculoviruses*. p. 193 – 211. New York and London: Plenum Press.
- Maesyri, A. (1856). *Fragmmenti anatomici fisiologici e pathologici sul baco da seta (Bombyx mori Linn.)* Pavia: Fratelli Fusi.
- Manimegalai, R., Adhithya, S. and Shanmugam. R. (2013). Morphological and Biochemical Characterization of Bacterial and Viral Pathogens Infecting Mulberry Silkworm, *Bombyx mori* L. *Indian Journal of Trends in Biosciences*. 6(4), 407 – 411.
- Miller, L. K. (1996). Insect viruses. In Field, B. N., Knipe, D. M. and Howley, P. M. (Eds.). *Fields Virology*. p. 533 – 556. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers.
- Morris, T. D. and Miller, L. K. (1994). Mutational analysis of a baculovirus major late promoter. *Gene.*, 140, 147 – 153.
- Moser, B. A., Becnel, J. J., White, S. E., Afonso, C., Kutish, G., Shanker, S. and Almira, E. (2001). Morphological and molecular evidence that *Culex nigripalpus* baculovirus is an unusual member of the family Baculoviridae. *J. Gen. Virol.*, 82, 283 – 297.
- Nappi, A. J. and Hammill, T. M. (1975). Viral release and membrane acquisition by budding through the nuclear envelop of hemocytes of the qypsy moth, *Porthetria dispar*. *J. Invertebr. Pathol.*, 26, 387 – 392.
- Ohkawa, T., Volkman, L. E. and Welch, M. D. (2010). Actin – based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface. *J. Cell Biol.*, 190, 187 – 195.
- Pereira, E. P., Conte, H., Ribeiro, L. F. C., Zanatta, D. B., Bravo, J.P., Fernandez, M. A. and Brancalhão, R. M. C. (2008). Cytopathological process by multiplenucleopolyhedrovirus in the testis of *Bombyx mori* L., 1758 (Lepidoptera: Bombycidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(1), 1-7.
- Rahman, M. M. and Gopinathan, K. P. (2004). Systemic and *in vitro* infection process of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.*, 101, 109 – 118.
- Russell, R. L., Funk, C. J. and Rohrmann, G. F. (1997). Association of a baculovirus – encoded protein with the capsid basal region. *Virology*, 227, 142 – 152.
- Shapiro, A. M., Becnel, J. J. and White, S. E. (2004). A nucleopolyhedrovirus from *Uranotaenia sapphirina* (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 86, 96 – 103.
- Sciocco, A., Bideshi, D. K., Johnson, J. J. and Federici, B. A. (2009). *Nucleopolyhedrovirus from the Western Avocado Leafroller. Amorbia cuneana*: Isolation and characterization of a potential viral control agent.

- Van Regenmortel, M. H. V. and Fauquet, C. (2000). *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, California: Academic Press.
- Veda, K. (1997). *Silkworm rearing (Translated from Japanese)*. United States of America Science publishers.
- Vega, E. F. and Kaya, K. F. (2012). *Insect Pathology*. 2nd Ed. Printed and bound in China: Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Vlak, J. M., Klinkenberg, F. A., Zaal, K. J. M., Usmany, M., Klinge – Roode, E. C., Geervliet, J. B. F., Roosien, J. and van Lent, J. W. M. (1988). Functionnal studies on the p10 geng of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10 – beta – galactosidase fusion gene. *J. Gen. Virol.*, 69, 765 – 776.

ต้นฉบับไม่ปรากฏข้อมูล

ประวัติย่อผู้วิจัย

## ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ นามสกุล นางสาววัชรพร ปัตลา  
วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 5 พฤศจิกายน พ.ศ. 2531  
จังหวัด และประเทศที่เกิด จังหวัดกาฬสินธุ์ ประเทศไทย  
ประวัติการศึกษา  
พ.ศ. 2547 มัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนบัวขาว อำเภอกุฉินารายณ์  
จังหวัดกาฬสินธุ์  
พ.ศ. 2550 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนบัวขาว อำเภอกุฉินารายณ์  
จังหวัดกาฬสินธุ์  
พ.ศ. 2554 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร  
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม  
พ.ศ. 2558 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาชีววิทยา  
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม  
ตำแหน่ง สถานที่ทำงาน -  
ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 110 หมู่ 11 บ้านกุดหว้า ตำบลกุดหว้า  
อำเภอกุฉินารายณ์ จังหวัดกาฬสินธุ์ 46110  
รางวัลเรียนดี ทุนวิจัย และทุนการศึกษา -

### ผลงานวิจัย

วัชรพร ปัตลา, วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์ และสิริภักดิ์ สุระพร. (2558). สันฐานวิทยาของผลึกโปรตีน BmNPV จากหนอนไหมในประเทศไทย. วารสารวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 8(1), 73-90.