การประเมินความต้านทานของหนอนไหมไทยต่อโรคแกรสเซอรี่

Determination of the resistance to grassery of Thai silkworm, *Bombyx mori*

สิริภัค สุระพร[1], เอกพจน์ ศรีฟ้า[1]

Siripuk Suraporn[1], Akeapot Srifa[1]

Received: 11 June 2018 ; Revised: 20 August 2018 ; Accepted: 18 September 2018

บทคัดย่อ

ปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยงไหมในประเทศไทยคือ โรคแกรสเซอรี่ ซึ่งมีสาเหตุจากไวรัส *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความต้านทานของหนอนไหมไทยต่อโรคแกรสเซอรี่ ใช้ไหมทดลองจำนวน 15 สายพันธุ์ ได้แก่ นางลาย นางน้อย นางตุ่ย หัวฝาย สำโรง นางสิ่ว นางเหลือง คอตั้ง กากี แพงพวย รอ.5 นค.04 สพ.2 ปช. 21 และ นนค.8 ในขั้นแรกทำการทดสอบหาค่า LC_{50} ของหนอนไหม สายพันธุ์นางลาย และสำโรง โดยการจุ่มใบหม่อนลงในสารแขวนลอย BmNPV ที่ความเข้มข้น 10^5 10^6 10^7 10^8 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร และวิเคราะห์หาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม ToxRat Standard version 3.2.1 พบว่า ค่า LC_{50} ต่อ BmNPV ของไหมนางลาย และสำโรง เท่ากับ $5.05x10^7$ และ $1.52x10^7$ผลึกต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการประเมินความต้านทานของหนอนไหม 15 สายพันธุ์ต่อโรคแกรสเซอรี่ โดยให้หนอนไหมได้รับ BmNPV ที่ความเข้มข้น 10^7ผลึกต่อมิลลิลิตร (LC_{50}) และบันทึกอัตราการตายของไหมในแต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ดัชนีอัตราการตายของหนอนไหม มาเป็นเกณฑ์ในการประเมินความต้านทานและอ่อนแอ 4 ระดับ คือ ต้านทานมาก ต้านทานปานกลาง อ่อนแอปานกลาง และอ่อนแอมาก ผลการทดลองพบว่าหนอนไหมพันธุ์ที่มีความต้านทานสูง ได้แก่ สำโรง นค.04 หัวฝาย นางลาย มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 12.66±1.20, 13.00±2.08, 14.66±0.33, 18.33±0.33 ตามลำดับ ระดับความต้านทานปานกลาง ได้แก่ นางสิ่ว แพงพวย คอตั้ง กากี รอ.05 นางตุ่ย มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 30.33±1.45, 31.33±1.20, 32.00±1.15, 33.33±1.20, 34.33±2.96, 35.33±0.33 ตามลำดับ ระดับอ่อนแอปานกลาง ได้แก่ สพ.2 นางน้อย ปช 21 มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 42.66±2.33, 43.33±0.88, 47.00±0.57 ตามลำดับ ระดับอ่อนแอมาก ได้แก่ นนค.8 และ นางเหลือง มีอัตราการตายเฉลี่ยเท่ากับ 52.00±2.64 และ 52.33±2.40 ตามลำดับ ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลเพื่อแนะนำเกษตรกรผู้เลี้ยงไหมในการปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่ต่อไป

คำสำคัญ: หนอนไหม นิวคลีโอโพลี่ฮีโดรไวรัส ความต้านทานต่อแกรสเซอรี่

Abstract

The grassery caused by *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) is the most severe disease in Thai sericultural practice. In this study, a resistance of Thai silkworm, *Bombyx mori* to grassery disease was determined. Fifteen Thai native strains, namely, Nang Lai, Nang Noi, Nang Tui, Sam Rong, Nang Seiw, Hua Fai, Nang Lueang, Kor Tung, Kaki, RE05, NK04, Pang Puay, SP2, PCh21, and NNK8, were investigated. The 3rd instar larvae of Nang Lai, and Sam Rong were used for the Lethal Concentration (LC_{50}) test. The mulberry leaves were dipped in suspensions of BmNPV at 10^5,10^6, 10^7, 10^8, 10^9 OBs/ml. LC_{50} were analyzed by ToxRat Standard Program version 3.2.1. The result showed that the LC_{50} values of Nang Lai and Sam Rong were at $5.05x10^7$ and $1.52x10^7$ OBs/ml, respectively. The resistance to grassery of all Thai silkworm strains mentioned above were determined at 10^7 OBs/ml of BmNPV (LC_{50}). The mortality of grassery infected silkworm larvae was recorded and indicated. The results revealed that there were 4

---

[1] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม*

[1] *Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University*

** Corresponding author; Assistant professor Siripuk Suraporn, Email: siripuk_s@yahoo.com*

levels of resistance and susceptibility based on mean mortalities; highly resistant, medium resistant, medium susceptible, and highly susceptible.The highly resistant strains were Sam Rong, NK04, Hua Fai, Nang Lai; (12.66±1.20, 13.00±2.08, 14.66±0.33, 18.33±0.33, respectively) and the medium resistant strains were Nang Seiw, Pang Puay, Kor Tung, Kaki, RE05, Nang Tui; (30.33±1.45, 31.33±1.20, 32.00±1.15, 33.33±1.20, 34.33±2.96, 35.33±0.3, respectively). On the other hand, the medium susceptible strains were SP2, Nang Noi, PCh21; (42.66±2.33, 43.33±0.88, 47.00±0.57, respectively) and the highly susceptible strains were NNK8 and Nang Lueang; (52.00±2.64 and 52.33±2.40, respectively). The results of this study will be useful for the farmers to improve the grassery resistant silkworm strains.

Keywords: *Bombyx mori*, nucleopolyhedrovirus, grassery resistance

บทนำ

หนอนไหม (*Bombyx mori* Linn.) เป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ผลผลิตจากไหม นำมาเป็นสิ่งทอผลิตเสื้อผ้าไหมที่สวยงาม เป็นเอกลักษณ์ของไหมไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อผู้จัดการสร้างภาพยนตร์ที่ยิ่งใหญ่เรื่อง เบนเฮอร์ (Ben Hur) และ The King and I ได้สั่งผ้าไหมไทยจากบริษัท จิม ทอมป์สัน เพื่อตัดเป็นชุดแต่งตัวให้กับดาราที่แสดงเกือบทุกคน ซึ่งภาพยนตร์เรื่อง เบนเฮอร์ ได้รับรางวัลออสการ์ ถึง 11 รางวัล รวมทั้ง รางวัลออสการ์ออกแบบเครื่องแต่งกายยอดเยี่ยม[1] ยิ่งทำให้ผ้าไหมไทย เป็นที่รู้จักของคนทั่วโลกอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ผลผลิตจากไหมนำมาประยุกต์ใช้ในด้านการผลิตเครื่องสำอาง เวชภัณฑ์ทางยา และอาหารเสริมที่ผลิตจากราสกุล *Cordyceps* ที่เจริญได้ดีบนดักแด้ไหม[2,3] รังไหม มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบที่เรียกว่า เซริซิน (sericin) หรือ กาวไหม มีรายงานพบว่าไหมไทยพื้นบ้าน มีปริมาณเซริซินมากกว่าไหมสายพันธุ์ญี่ปุ่น[4] ดังนั้นไหมไทยพันธุ์พื้นบ้านจึงมีข้อได้เปรียบในแง่ของการนำไปไประยุกต์ใช้ตามวัตถุประสงค์อื่นๆ ได้เป็นอย่างดี เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของไหมให้สูงขึ้นมากกว่าการนำไปทอเป็นผ้าไหมเพียงอย่างเดียว วัฏจักรของไหมประกอบด้วย ระยะไข่ ระยะหนอนไหม (วัย 1-วัย 5) ระยะดักแด้ และระยะผีเสื้อ วงชีวิตของไหมจากระยะไข่ไหมถึงระยะผีเสื้อ ประมาณ 40-45 วัน หนอนไหมกินพืชอาหารเพียงชนิดเดียว (monophagous insect) คือใบหม่อนเท่านั้น[5]

การปลูกหม่อนเลี้ยงไหมพบได้อย่างหนาแน่นในภูมิภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยเฉพาะในพื้นที่จังหวัดมหาสารคาม ซึ่งมีการเลี้ยงไหมมากที่สุด[6,7] (Figure 1) ไหมที่นิยมเลี้ยงคือไหมพันธุ์ไทยพื้นบ้าน ซึ่งเป็นไหมประเภทที่ฟักออกเป็นตัวได้ตลอดทั้งปี (polyvoltine silkworm) จึงไม่จำเป็นต้องมีการใช้เทคโนโลยีในการฟักเทียมไข่ไหม

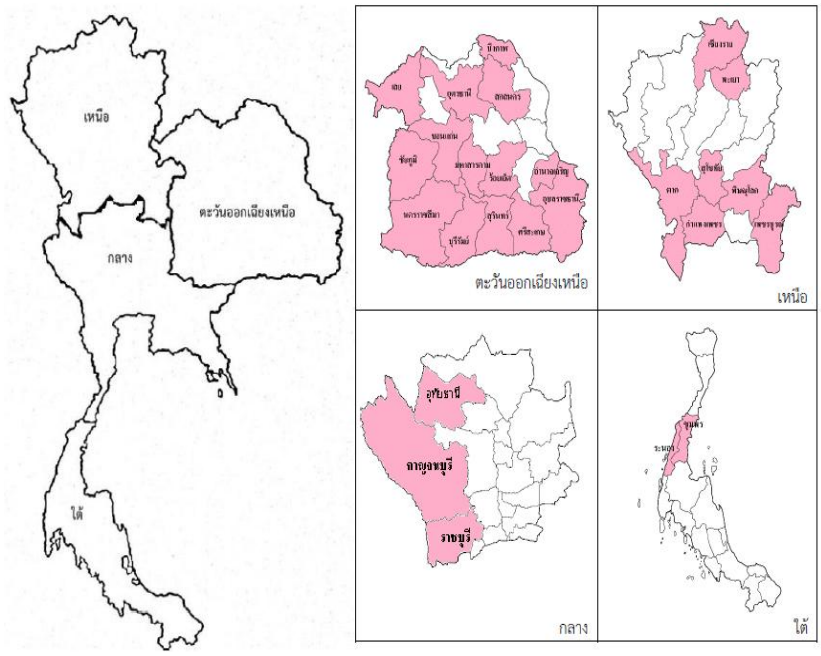
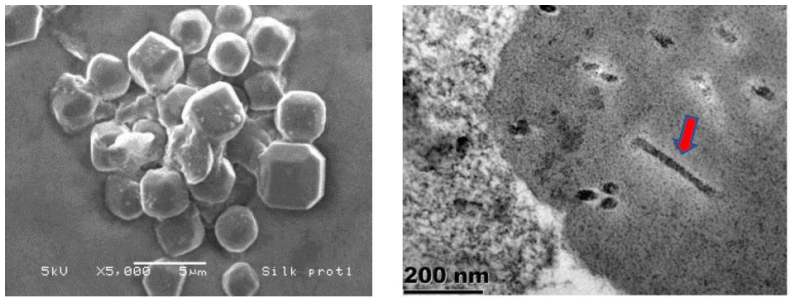


Figure 1 Map of Thailand and the Northeast region of Thailand, pink color: the sites where the silkworm, *Bombyx mori* were reared[7].

อย่างไรก็ตาม ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญในการเลี้ยงไหมคือ โรคของหนอนไหมและโรคที่สำคัญที่สุดคือโรคแกรสเซอรี่ (grassery) หรือที่เรียกตามภาษาพื้นบ้านว่าโรคเต้อ โรคกระทิ หรือ โรคตัวเหลือง เกิดจากไวรัส *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) เป็นไวรัสที่มีผลึกโปรตีนห่อหุ้ม (occlusion body: OB) (Figure 2A) ภายในผลึกโปรตีนนี้มีอนุภาคไวรัส (occlusion derived virus:ODV) อัดแน่นอยู่เป็นจำนวนมาก (Figure 2B) แกรสเซอรี่ เป็นโรคที่ทำความเสียหายให้กับอุตสาหกรรมการเลี้ยงไหมมากที่สุด[8] การระบาดของโรคเกิดขึ้นอย่างรุนแรงในทุกรุ่นของการเลี้ยงไหม และพบได้ทุกฤดูกาล หนอนไหมตายตอนวัย 5 ซึ่งเป็นระยะที่กำลังสร้างรังไหม ทำให้เกษตรกรเสียเวลาและแรงงานเลี้ยงหนอนไหม นอกจากนี้ในการเลี้ยงไหมบางรุ่นเกษตรกรไม่ได้รับผลผลิตเลย[9]



A B

Figure 2 The structure of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus(BmNPV); A) occlusion body (OB) observed under a light microscope, B) occlusion derived virus (ODV) observed under a transmission electron microscope[10]

จากปัญหาเรื่องโรคแกรสเซอรี่ ถือว่าเป็นอุปสรรคในการผลิตไหมมากที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความต้านทานของไหมพันธุ์ไทย และเพื่อคัดเลือกสายพันธ์ไหมที่ต้านทาน หรืออ่อนแอต่อการเกิดโรคแกรสเซอรี่ เพื่อเป็นข้อมูลในการแนะนำสายพันธุ์ไหมต่อเกษตรกรต่อไป พร้อมทั้งนำข้อมูลนี้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ไหมให้ต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่ต่อไป

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. แหล่งที่มาของไวรัส

ออกสำรวจการเกิดโรคแกรสเซอรี่ในหนอนไหมตามหมู่บ้านที่เกษตรกรทำการเลี้ยงไหมในจังหวัดมหาสารคาม หมู่บ้านในเขตพื้นที่อำเภอเมืองมหาสารคาม กันทรวิชัย และเชียงยืน เมื่อพบหนอนไหมที่แสดงอาการของโรคแกรสเซอรี่ นำหนอนไหมที่เป็นโรคใส่ขวดพลาสติกเพื่อนำมาแยก BmNPV สาเหตุโรคแกรสเซอรี่ให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการโรควิทยาของไหมและการตรวจวินิจฉัยโรค มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2. การเตรียมไวรัส BmNPV

บดหนอนไหมที่เป็นโรคให้ละเอียด นำของเหลวกรองผ่านสำลี 2-3 ชั้น ในกรวยกรอง ทำการเก็บสารแขวนลอย BmNPV แล้วนำมาเพิ่มปริมาณ โดยจุ่มใบหม่อนในสารแขวนลอย BmNPV ให้หนอนไหมกิน เมื่อหนอนไหมแสดงอาการของโรคแกรสเซอรี่ ใช้กรรไกรตัดขาเทียมของหนอนไหม นำของเหลว (haemolymph) ไปตรวจหาผลึกโปรตีน (occlusion body: OB) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทำการนับจำนวนผลึกโปรตีนด้วยเครื่องนับ (haemacytometer) เพื่อหาความเข้มข้นของสารแขวนลอยผลึกโปรตีนสำหรับการทดลองต่อไป

3. การเลี้ยงหนอนไหมเพื่อการทดลอง

จากวิจัยนี้ใช้หนอนไหมพันธุ์ไทย 15 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์นางลาย นางน้อย นางตุ่ย หัวฝาย สำโรง นางสิ่ว นางเหลือง คอตั้ง กากี แพงพวย รอ.5นค.04 สพ.2 ปช.21 และ นนค.8 โดยนำไข่ไหมมากกที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน เมื่อไหมฟักออกเป็นตัวอ่อนเข้าสู่ระยะหนอน เลี้ยงหนอนไหมด้วยใบหม่อนวันละ 3 ครั้ง นำหนอนไหมวัย1-วัย 5 ในแต่ละสายพันธุ์ ทำการทดลองเพื่อประเมินหาความต้านทานต่อไป

3.1 การทดสอบค่า LC_{50} ในหนอนไหมพันธุ์นางลาย และสำโรง

เตรียมสารแขวนลอยผลึกโปรตีน (OB) ทั้งหมด 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร โดยทำการเจือจางสารแขวนลอยผลึกโปรตีน BmNPV ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ทำการตัดใบหม่อนให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 2×2 เซนติเมตร จากนั้นนำไปจุ่มลงในสารแขวนลอย BmNPV ที่ความเข้มข้น 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร และนำไปให้หนอนไหมกิน เป็นการให้ BmNPV แก่หนอนไหม เพียง 1 ครั้งเท่านั้น

ให้หนอนไหมทดลองอดอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้หนอนไหมเกิดความอยากกินอาหาร ซึ่งจะทำให้หนอนไหมได้รับ BmNPV ได้อย่างเต็มที่ วางแผนแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) โดยการแบ่งหนอนไปออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุมโดยให้หนอนไหมกินใบหม่อนจุ่มน้ำกลั่น ใช้หนอนไหมจำนวน 70 ตัว สำหรับกลุ่มทดลอง ใช้หนอนไหมจำนวน 35 ตัวต่อซ้ำ และทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ บันทึกหนอนไหมที่ตายจากสาเหตุโรคแกรสเซอรี่ ในระยะเวลา 12 วัน นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม ToxRat Standard Version 3.2.1 (ToxRat Solutions GmbH, 2005)

3.2 การทดสอบความต้านทานต่อ BmNPV กับหนอนไหมไทย 15 สายพันธุ์

ทดสอบความต้านทานต่อ BmNPV ในหนอนไหมพันธุ์ไทย 15 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์นางลาย นางน้อย นางตุ่ย หัวฝาย สำโรง นางสิ่ว นางเหลือง คอตั้ง กากี แพงพวย รอ.5 นค.04 สพ.2 ปช.21 และ นนค.8 ที่ระดับความเข้มข้นของสารแขวนลอยผลึกโปรตีน 10^7 ผลึกต่อมิลลิลิตร โดยเตรียม BmNPV ในรูปสารแขวนลอย ตามกรรมวิธีการทดลองในหัวข้อการทดสอบค่า LC_{50} ตามที่ได้กล่าวมาในข้างต้น วางแผนแบบการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยใช้หนอนไหมทดลอง จำนวน 300 ตัวต่อหนอนไหม 1 สายพันธุ์ และทำ 3 ซ้ำๆ ละ 100 ตัว

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way Analysis of Variance) เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของอัตราการตายของหนอนไหมแต่ละสายพันธุ์ระหว่างกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยใบหม่อนตามปกติ หากตรวจสอบพบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแล้วใช้การทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 16

ผลการทดลอง

1. ลักษณะของหนอนไหมพันธุ์ไทยที่ใช้ทดลอง

งานวิจัยนี้ใช้ไหมไทย ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมเลี้ยง เพราะมีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และเป็นพันธุ์ที่หน่วยราชการส่งเสริมให้มีการเลี้ยง อย่างต่อเนื่อง เพราะไหมไทย เป็นพันธุ์ที่สามารถฟักออกได้ตลอดปี เกษตรกรจึงเลี้ยงไหมได้ตลอดทั้งปี[11] ไหมไทยมีเอกลักษณ์ที่ชัดเจน โดดเด่นคือรังไหมสีเหลืองสด รังไหมมีขนาดเล็ก เส้นใยสั้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเลี้ยงไหมพันธุ์ไทยของ สมหญิง ชูประยูร และคณะ 2538[12] ลักษณะเฉพาะของไหมพันธุ์ไทยที่ได้จากผลการทดลองในครั้งนี้ จำนวน 15 สายพันธุ์ พันธุ์นางลายหนอนไหมมีลายขาวคาดตำตลอดลำตัว รังไหมสีเหลือง หัวป้าน ท้ายแหลม อายุหนอนไหม 20 วัน และความยาวเส้นใยต่อรัง 258–313 เมตร (Figure 3A) นางน้อย หนอนไหมสีขาวนวล รังไหมสีเหลือง หัวป้าน ท้ายแหลม อายุหนอนไหม 20 วัน และความยาวเส้นใยต่อรัง 312–410 เมตร (Figure 3B) นางตุ่ย หนอนไหมสีเหลือง รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม21 วัน และความยาวเส้นใยต่อรัง 278 เมตร (Figure 3C) สำโรงหนอนไหมสีขาวลำตัวมีจุดประ (Mark) รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3D) นางสิ่วหนอนไหมมีลักษณะสีขาวอมเขียว รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม อายุหนอนไหม 22 วัน และความยาวเส้นใยต่อรัง 372 เมตร (Figure 3E) หัวฝายหนอนไหมลำตัวสีขาวมีจุดประ สีดำ รังสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3F) กากีหนอนไหมลำตัวสีขาว อายุหนอนไหม 20 วัน รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3G) แพงพวย หนอนไหมลำตัวขาวปลอด อายุหนอนไหม 20 วัน รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3H) นางเหลืองหนอนไหมมีลำตัวสีเหลือง อายุหนอนไหม 19 วัน รังสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3I) รอ.5 หนอนไหมลำตัวขาว รังสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3J) นค.04 หนอนไหมลำตัวสีขาวนวล รังไหมสีขาว หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3K) คอตั้งตัวหนอนสีขาวนวล ชอบชูคอ รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3L) สพ.2 ลักษณะลำตัวสีขาวขุ่นหรือขาวอมเหลือง มีจุดประ สีดำ และรังไหมมีสีเหลือง (Figure 3M) ปช. 21 ลำตัวหนอนไหมสีขาวนวล รังสีเหลืองอ่อน หัว และท้ายป้าน (Figure 3N) นนค.8 หนอนไหมลำตัวสีขาวนวล รังไหมสีเหลือง หัวป้านท้ายแหลม (Figure 3O)

อาการของโรคแกรสเซอรี่ในไหมทดลอง 15 สายพันธุ์

หลังจากที่หนอนไหมได้รับ BmNPV จะแสดงอาการของโรคแกรสเซอรี่ กล่าวคือ มีอาการซึดเหลือง หรือเต้อ กินใบหม่อนได้น้อย มีการเคลื่อนไหวช้า และปีนป่ายขึ้นสู่ที่สูง หรือเรียกอาการนี้ว่า tree top disease[13]ผนังลำตัวเปราะ บางเมื่อสะกิด มีของเหลวสีเหลืองขุ่นไหลออกมา เนื่องจากมีผลึกโปรตีนจำนวนมากอยู่ในน้ำเลือดหนอนไหม ซึ่งอาการดังกล่าวเกิดกับหนอนไหมทดลอง ทั้ง 15 สายพันธุ์ คือ นางลาย นางน้อย นางตุ่ย สำโรง นางสิ่ว หัวฝาย นางเหลือง คอตั้ง กากี รอ.05 นค04 แพงพวย สพ.2 ปช.21 และ นนค.8 (Figure 4A-4O) ตามลำดับ

การทดสอบความรุนแรงของ BmNPV (LC_{50})

เพื่อศึกษาความรุนแรงของ BmNPV ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการหาค่า LC_{50} จากการทดสอบกับหนอนไหม พันธุ์นางลาย และ สำโรง โดยให้หนอนไหมวัย 3 ได้รับ BmNPV โดยการจุ่มใบหม่อนลงในสารแขวนลอย BmNPV ที่มีความเข้มข้น 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร พบว่าหนอนไหมเริ่มแสดงอาการของโรคแกรสเซอรี่ ภายใน 4-5 วัน การวัดค่า LC_{50} ทำโดยการจดบันทึกข้อมูลจำนวนหนอนไหมที่ตาย (mortality) ในช่วง 12 วัน หลังจากได้รับ BmNPV ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการทดสอบจำนวน 2 ครั้ง (รุ่น) พบว่าความเข้มข้นของ BmNPV ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อจำนวนการตายของหนอนไหมเพิ่มขึ้น พบอัตราการตายในหนอนไหม นางลายที่ความเข้มข้นของ BmNPV 10^5 10^6 10^7 10^8 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร เป็นร้อยละ 6.15, 16.15, 23.35, 59.05 และ 82.35 ตามลำดับ ส่วนอัตราการตายของหนอนไหมพันธุ์สำโรงที่ความเข้มข้น ของ BmNPV 10^5 10^6 10^7 10^8 10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร เป็นร้อยละ 14.17, 23.80, 38.60, 67.70 และ 90.45 ตามลำดับ (Table 1)

การคำนวณหาค่า LC_{50} โดยโปรแกรม ToxRat Standard Version 3.2.1 พบว่าค่า LC_{50} ของ BmNPV ต่อหนอนไหมอยู่ที่ ระดับความเข้มข้น 10^7 ผลึกต่อมิลลิลิตร โดยหนอนไหมสายพันธุ์นางลาย มีค่า LC_{50} เท่ากับ 5.05×10^7 ผลึกต่อมิลลิลิตร และพันธุ์สำโรง เท่ากับ 1.52×10^7 ผลึกต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นจึงนำ ค่า LC_{50} ของ BmNPV ที่ 10^7 ผลึกต่อมิลลิลิตร ไปประเมินความต้านทาน และอ่อนแอกับหนอนไหม 15 สายพันธุ์ เป็นลำดับต่อไป

การประเมินความต้านทานต่อ BmNPV สาเหตุโรคแกรสเซอรี่

จากการทดสอบความต้านทานต่อ BmNPV ในหนอนไหมพันธุ์ไทย 15 สายพันธุ์ ได้แก่ นางลาย นางน้อย นางตุ่ย หัวฝาย สำโรง นางสิ่ว นางเหลือง คอตั้ง กากี แพงพวย รอ.5 นค.04 สพ.2 ปช.21 และ นนค.8 โดยแบ่งหนอนไหมออกเป็น 2 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุม เลี้ยงหนอนไหมโดยการให้กินใบหม่อนตามปกติ และกลุ่มหนอนไหมที่ได้รับสารแขวนลอย BmNPV ที่ระดับความเข้มข้น 10^7ผลึกต่อมิลลิลิตร (LC_{50}) จากนั้นนับจำนวนหนอนไหมที่ตายในแต่ละวันจนถึงระยะหนอนไหมทำรัง นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการตายและเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของความต้านทานต่อ BmNPV ในหนอนไหม 15 สายพันธุ์ (Table 3) สามารถประเมินความต้านทาน และอ่อนแอ ของหนอนไหมไทยต่อ BmNPV โดยใช้ค่าร้อยละการตายเฉลี่ยของหนอนไหม คือ ต้านทานมาก (highly resistance: 20-40%) ต้านทานปานกลาง (medium resistance: 41-60%) อ่อนแอปานกลาง (medium resistance: 61-80%) และอ่อนแอมาก (highly susceptible: 81-100%) โดยพบว่าหนอนไหมพันธุ์ที่มีความต้านทานสูง ได้แก่ สำโรง นค.04 หัวฝาย นางลาย เท่ากับ 12.66±1.20, 13.00±2.08, 14.66±0.33, 18.33±0.33,ตามลำดับ ระดับความต้านทานปานกลาง ได้แก่ นางสิ่ว แพงพวย คอตั้ง กากี รอ.05 นางตุ่ย เท่ากับ 30.33±1.45, 31.33±1.20, 32.00±1.15, 33.33±1.20, 34.33±2.96, 35.33±0.33 ตามลำดับ ระดับอ่อนแอปานกลาง ได้แก่ สพ.2 นางน้อย ปช 21 เท่ากับ 42.66±2.33, 43.33±0.88, 47.00±0.57 ตามลำดับ ระดับอ่อนแอมาก ได้แก่ นนค.8 และนางเหลือง เท่ากับ 52.00±2.64 และ 52.33±2.40 ตามลำดับ

Figure 3 Thai silkworm, *Bombyx mori* strains, A; Nang Lai, B; Nang Noi, C; Nang Tui, D; Sam Rong, E; Nang Seiw, F;Hua Fai, G; Kaki, H; Pang Puay, I; Nang Leuang, J;RE05, K;NK04, L;Kor Tung, M; SP2, N;PCh21, O;NNK8

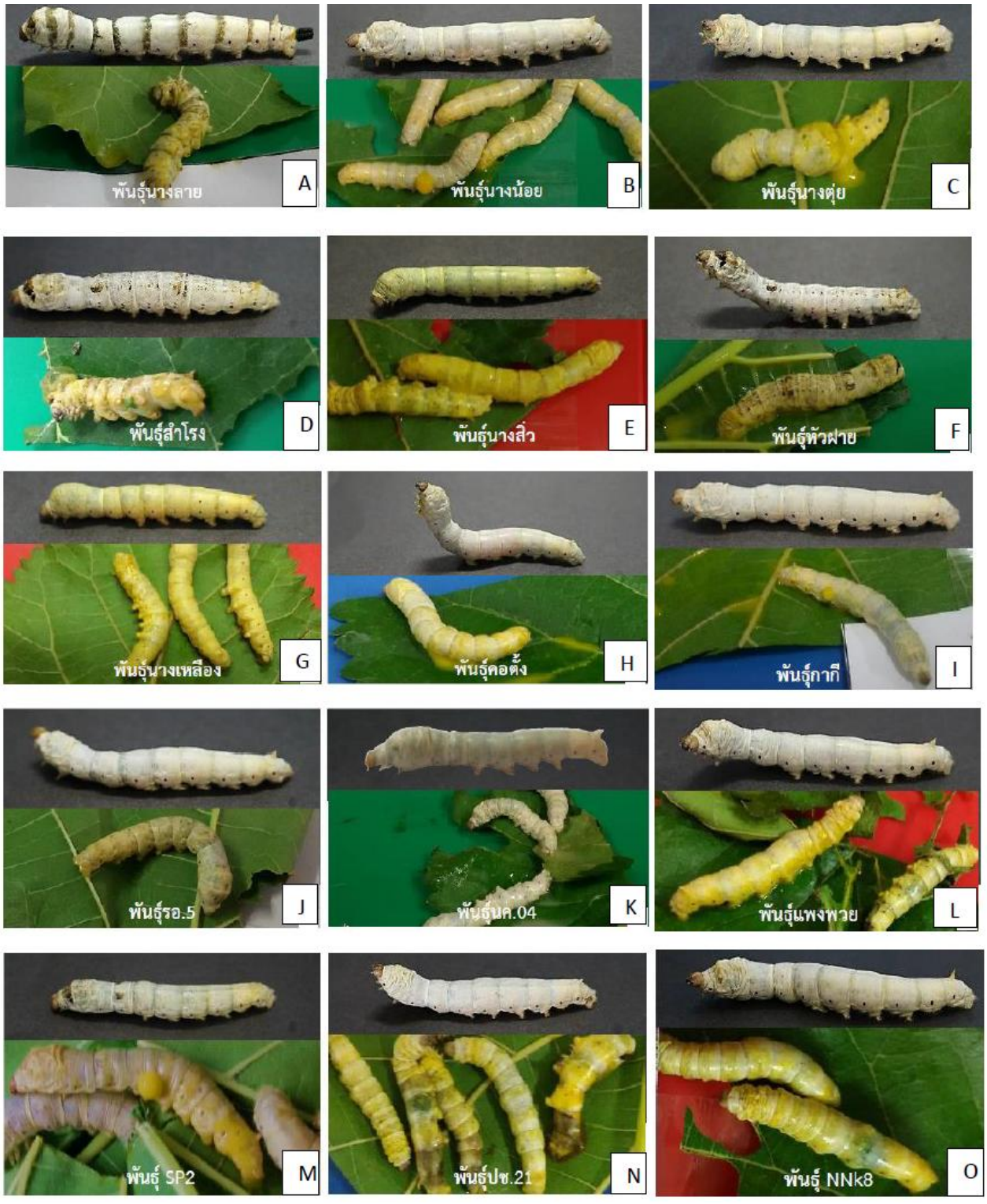


Figure 4. The grassery infected silkworm, *Bombyx mori* (lower) and healthy silkworm larvae (upper), A; Nang Lai, B; Nang Noi, C; Nang Tui, D; Sam Rong, E; Nang Seiw, F;Hua Fai, G;Nang Lueang, H; Kor Tung, I; Kaki, J;RE05, K;NK04, L;Pung Puay, M; SP2, N;PCh21, O; NNK8

วิจารณ์ผลการทดลองและสรุป

โรคแกรสเซอรี่ มีสาเหตุจากนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส เป็นโรคที่มีความรุนแรงทำให้ผลผลิตลดลงโดยเฉพาะพบในไหมประเภทที่ฟักออกได้ตลอดทั้งปี เช่น ในประเทศไทย และอินเดีย[14] การระบาดของโรคพบได้ตลอดทั้งปี แต่ในช่วงฤดูร้อนและฤดูฝนจะเกิดการระบาดของโรคมากที่สุด[8] การเข้าทำลายและการเกิดโรคจะเป็นลักษณะแอบแฝง (latent infection)[15] เมื่อหนอนไหมได้รับก่อโรคในระยะเริ่มแรก อาจไม่แสดงอาการของโรคให้ปรากฏ แต่จะแสดงอาการให้เห็นชัดเจนในระยะหนอนไหมทำรังคือหนอนไหมวัย 5

ในการประเมินหาความต้านทานของหนอนไหมไทยที่มีการเลี้ยงตลอดทั้งปีที่ศูนย์นวัตกรรมไหม มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จำนวน 15 สายพันธุ์ ต่อการต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่ พบระดับการต้านทานต่อโรคมากที่สุด สำโรง นค. 04 หัวฝาย และนางลาย ในขณะที่หนอนไหมสายพันธุ์ นนค. 8 และนางเหลืองมีความอ่อนแอที่สุด ถึงแม้หนอนไหมที่นำมาทดลองจัดเป็นไหมประเภทฟักออกตลอดทั้งปี แต่ก็มีระดับความต้านทาน และอ่อนแอต่อโรคแกรสเซอรี่ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ปัจจัยที่เกี่ยวข้องต่อการต้านทาน เช่น ระบบภูมิคุ้มกัน ค่าความเป็นกรด ด่างในกระเพาะอาหารของหนอนไหม ยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานต่อ BmNPV สาเหตุโรคแกรสเซอรี่แตกต่างกัน[16]

ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์ และมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเลือกสายพันธุ์ที่มีความต้านทานต่อโรคแกรสเซอรี่มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลิตไหมให้ได้ปริมาณมาก และให้มีคุณภาพของเส้นไหมที่ดี รวมทั้งทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ไหมนำข้อมูลความต้านทานและอ่อนแอของหนอนไหมไทย ต่อการเกิดโรคแกรสเซอรี่นี้ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ไหมพันธุ์ไทยที่ต้านทานต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Dr. Johannes Jehle, Institute of Biological Cotrol, Darmstatd ประเทศสหพันธรัฐเยอรมนี ที่ให้ความอนุเคราะห์วิเคราะห์โปรแกรม ToxRat Standard สำหรับหาค่า LC_{50} งานวิจัยนี้เป็นผลงานวิจัยส่วนหนึ่งที่ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2559 (ว.ช 59)

เอกสารอ้างอิง

1. เพลิง ภูผา. แกะรอย จิม ทอมป์สัน ราชาไหมไทย และเบื้องหลังตำนานอันยิ่งใหญ่ของเส้นทางไหมไทย สำนักพิมพ์ไพลิน กรุงเทพฯ; 2544. 112 หน้า
2. สิริภัค สุระพร และ วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์. การเจริญของเชื้อรา *Cordyceps* sp. บนดักแด้ไหม วิทยาสารกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2552; 7(1):1-9.
3. ยอดหทัย เทพธารานนท์. รายงานวิจัยเรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเชื้อราแมลงสกุล *Cordyceps* ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ; 2545.
4. Kawakuchi H. Structure and character of silk fiber. *In* General remarks of sericulture. Department of Engineering, Seian College of Art and Design. Kyoto, Japan; 1996.
5. Tazima Y. The Silkworm: an Important. Laboratory Tool. Kodansha Ltd., Tokyo. Japan; 1978.
6. พรรณนภา ศักดิ์สูง และชาญชัย ถาวรอนุกูลกิจ.วิเคราะห์อุปสรรค ปัญหา ในการพัฒนาหม่อนไหมศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติสถาบันพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ; 2540.
7. วัชราพร ปัตลา วันวิสาข์ ศิริวัฒนเมธานนท์ และสิริภัค สุระพร. สัณฐานวิทยาของ BmNPV ของหนอนไหมในประเทศไทย วารสารวิจัย มสด. 2558; 8(1): 75-89.
8. Kumpratueang S. Development of DNA probe for early detection of grassery disease of silkworm, *Bombyx mori*. M.S thesis. Kasetsart University, Bangkok, Thailand; 1998.
9. ทิพย์วดี อรรถธรรม สุพัฒน์ อรรถธรรม มงคล อุดโท สิริภัค คำประเทือง. การสร้างตัวตรวจสอบสำหรับตรวจหาโรคแกรสเซอรี่ในระยะเริ่มแรก งานประชุมสัมนาวิชาการครั้งที่ 32 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน. 2538; 257-271.
10. สิริภัค สุระพร. ปริศนาโรคเต้อในไหมหนอนไหมไทย วารสารวิทยาศาสตร์หนองคาย มข. 2553; 5(1-2): 38-44.
11. วิโรจน์ แก้วเรือง. หม่อนไหมพืชและสัตว์สารพัดประโยชน์. คณะกรมการถ่ายทอดเทคโนโลยี สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ; 2540.
12. สมหญิง ชูประยูร สฤษดิพร ชูประยูร และพรทิพย์ สุคนธสิงห์. การปลูกหม่อนเลี้ยงไหม เอกสารวิชาการที่ 13. กรมส่งเสริมการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่ง ประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ; 2538.
13. ทิพย์วดี อรรถธรรม. ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน กรุงเทพฯ; 2549.

14. Dandin S.B. Handbook of sericulture technologies. Central Silk Board. Bangalore. India; 2000.
15. Himeno M., Matsubara, F. and Hayashiya K. The occult virus of nuclear polyhedrosis virus of silkworm larvae, *Bombyx mori*. Journal of Invertebrate Pathology; 1973 . 22:436-445.
16. Buhroo Z.I. Disease resistance in silkworm. Asian Journal of Science and Technology. 2013,4(11):157-166.