

การศึกษาทางโรควิทยาและโครงสร้างจุลภาคของ Nuclear polyhedrosis viruses ของแมลงในวงศ์ Noctuidae

Pathological and Ultrastructural Studies of Nuclear Polyhedrosis Viruses of Larvae of the Family Noctuidae

ทิพย์วดี อรรถธรรม¹

Tipvadee Attathom

ABSTRACT

Pathological and Ultrastructural studies of six nuclear polyhedrosis virus isolates *Trichoplusia ni*, *Autographa californica*, *Mamestra brassicae* and *Rachiplusia ou* were undertaken. Primary sites of infection for all isolates were the nuclei of fat bodies, tracheal matrix, hypodermis and hemocytes. Mid gut epithelial cells were also infected by all isolates but no polyhedra were observed. The malpighian tubules and silk gland were infected by some isolates. Ultrastructural studies of all isolates were obtained from purified preparations and ultrathin sections. Optimum purification of polyhedra of all isolates was accomplished by putrefaction, filtration and 2 steps of linear sucrose density gradient centrifugation. Virion were liberated from polyhedra by treating the polyhedra with 0.016 M Na_2CO_3 -0.1 M NaCl for 5-10 min. Nucleocapsids were liberated from virions by treating the latter with Nonidet P-40 for 30 min. Ultrastructural features of polyhedra among the virus isolates were significantly different. Variations in virion size and shape were insignificant for each isolate because the value obtained depended on the number of nucleocapsids present in each envelope. The nucleocapsids of all isolates were morphologically similar in shape but the size varied significantly between virus isolates. Data obtained from this study clearly indicate that pathological and ultrastructural studies can be used to definitively separate and identify several related insect viruses.

บทคัดย่อ

Nuclear polyhedrosis viruses รวมหกสายพันธุ์ ที่ทำให้เกิดโรคกับหนอน *Trichoplusia ni*, *Autographa californica*, *Mamestra brassicae* และ *Rachiplusia ou* ได้ถูกนำมาศึกษาทางโรควิทยาและโครงสร้างจุล

ภาค พบว่าเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์เข้าทำลายนิวเคลียสของ fat tissue, tracheal matrix, hypodermis และ hemocytes โดยจะพบผลึกโปรตีน (polyhedra) ของเชื้อไวรัสในนิวเคลียสของเซลล์และทำให้นิวเคลียสขยายใหญ่จนเต็มเซลล์ เซลล์ mid gut epithelial ก็ถูกทำลาย

¹ ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดยเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ด้วยแต่ไม่พบผลึกโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ และมีเชื้อไวรัสบางสายพันธุ์เท่านั้นที่เข้าทำลาย malpighian tubules และ silk gland ของแมลง การศึกษาโครงสร้างจุลภาคประกอบด้วยการศึกษาจากเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ และจากตัวอย่าง ultrathin sections เชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยการแยกผลึกโปรตีนจากหนอนที่เป็นโรคด้วยวิธี putrefaction, filtration และ sucrose density gradient centrifugation แยก virions ออกจากผลึกโปรตีนด้วยสารละลาย 0.016 M Na_2CO_3 -0.1M NaCl เป็นเวลา 5-10 นาที และแยก nucleocapsids ออกจาก virions ด้วยสารละลาย Nonidet P-40 เป็นเวลา 30 นาที โครงสร้างจุลภาคของผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ความแตกต่างกันของขนาดรูปร่างของ virion ไม่ถือว่ามีความสำคัญทางสถิติทั้งนี้เพราะขึ้นอยู่กับจำนวนของ nucleocapsids ในแต่ละ virion ส่วน nucleocapsids ของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์มีรูปร่างเหมือนกันแต่มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษา แสดงให้เห็นว่าข้อมูลการศึกษาทางโรควิทยาและโครงสร้างจุลภาคมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง และสามารถใช้ในการประกอบการวิเคราะห์แจกแจงหมวดหมู่ของเชื้อไวรัสของแมลงได้

กานำ

ผลวิจัยอันเนื่องมาจากการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงอย่างไม่มีขอบเขตนั้นมีมากมาย ปัจจุบันนักกีฏวิทยาจึงพยายามหาวิธีป้องกันกำจัดแมลงวิธีอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพและให้ผลดี การใช้เชื้อโรค เช่น เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส เชื้อรา เชื้อโปรโตซัว ในการกำจัดแมลงกำลังได้รับความสนใจเป็นพิเศษโดยเฉพาะอย่าง

ยั้งเชื้อไวรัส จากการศึกษาวิจัยพบว่าเชื้อไวรัสมากกว่าร้อยสายพันธุ์พบในแมลงและส่วนใหญ่ก่อ nuclear polyhedrosis virus (Martignoni and Iwai, 1977) Virus ชนิดนี้ แบ่งออกเป็นสองพวกตามลักษณะโครงสร้างคือแบบ Single embedded และแบบ Multiple embedded (Steinhaus, 1963) ในบรรดาเชื้อไวรัสที่พบเป็นโรคกับแมลงนั้นจัดว่าเชื้อไวรัสชนิด nuclear polyhedrosis virus มีแนวโน้มที่จะใช้ในการกำจัดแมลงได้ที่สุด เนื่องจากสามารถฆ่าแมลงได้ในเวลาอันรวดเร็ว และพบเป็นโรคกับแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดอย่างไรก็ตามเชื้อไวรัสที่มีรายงานว่าพบในแมลงทั้งหมดยังไม่มีมีการแจกแจงหมวดหมู่ ทั้งนี้เพราะยังไม่มีระบบอนุกรมวิธานที่สำหรับแยกไวรัสของแมลง ปัจจุบันจึงเรียกชื่อไวรัสตามชื่อแมลงที่พบเป็นโรคครั้งแรก

การศึกษานี้ประกอบด้วยการคัดเลือกเชื้อไวรัสหกสายพันธุ์ สามสายพันธุ์พบใน *Autographa californica* *Mamestra brassicae* และ *Rachiplusia ou* และอีกสามสายพันธุ์พบ *Trichoplusia ni* ในสถานที่ต่างๆ กัน มาทำการศึกษาเปรียบเทียบโรควิทยาและโครงสร้างจุลภาค วัตถุประสงค์เพื่อเก็บรวบรวมเป็นข้อมูลในการวิเคราะห์แจกแจงเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ และเพื่อแสดงให้เห็นว่าการศึกษาทางโรควิทยาและโครงสร้างจุลภาคของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มีความสำคัญมากน้อยเพียงใดในการจัดระบบอนุกรมวิธานของเชื้อไวรัสของแมลง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพิ่ม ปริมาณของเชื้อไวรัส ในห้องปฏิบัติการ

เชื้อไวรัสสามสายพันธุ์จาก *A. californica*, *M. brassicae*, *R. ou* และอีกหนึ่งสายพันธุ์จาก *T. in* เป็นไวรัสแบบ Multiple embedded ซึ่ง

จะใช้อักษรย่อในเนื้อเรื่องว่า AcMEV, MbMEV, RoMEV และ TnMEV ตามลำดับ ส่วนเชื้อไวรัสที่สกัดจาก *T.ni* เป็นแบบ Single embedded ใช้อักษรย่อว่า TnSEV₁ และ TnSEV₂ เชื้อไวรัสทั้งหมดได้รับการเพาะเชื้อเพิ่มปริมาณในหนอนคืบกะหล่ำปลี *T. ni* ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเทียม (Shorey and Hale, 1965) หนอนในวัยที่สี่จะถูกนำมาเลี้ยงบนอาหารเทียมที่ผสมด้วยเชื้อไวรัส เมื่อหนอนแสดงอาการเป็นโรคจะถูกเก็บรวบรวมใส่ถุงและปล่อยทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 เดือน ซึ่งจะทำให้ผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสตกตะกอนอยู่กับถั่ว

2. การศึกษาทางโรควิทยา

นำหนอนที่แสดงอาการเป็นโรคมาตัดเป็นปล้องๆ ใส่ลงในน้ำยา Bouin's นาน 48-72 ชั่วโมง แล้วแช่ใน ethanol ที่ความเข้มข้น 50, 70, 80, 95, และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นานครั้งละ 15-30 นาที ผ่านลงใน butanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่ลงในส่วนผสมของ paraplast : butanol 1 : 2 และ 2 : 1 อย่างละ 2 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วใส่ลงใน paraplast บริสุทธิ์ในต้อบ อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง embed ด้วย paraplast ในเบ้าพลาสติก ตัดตัวอย่างที่เตรียมหนา 7 ไมโครเมตรด้วย rotary microtome ย้อมสีด้วยวิธีของ Hamm (1966) และนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทัศน์

3. การศึกษาทางโครงสร้างจุลภาค

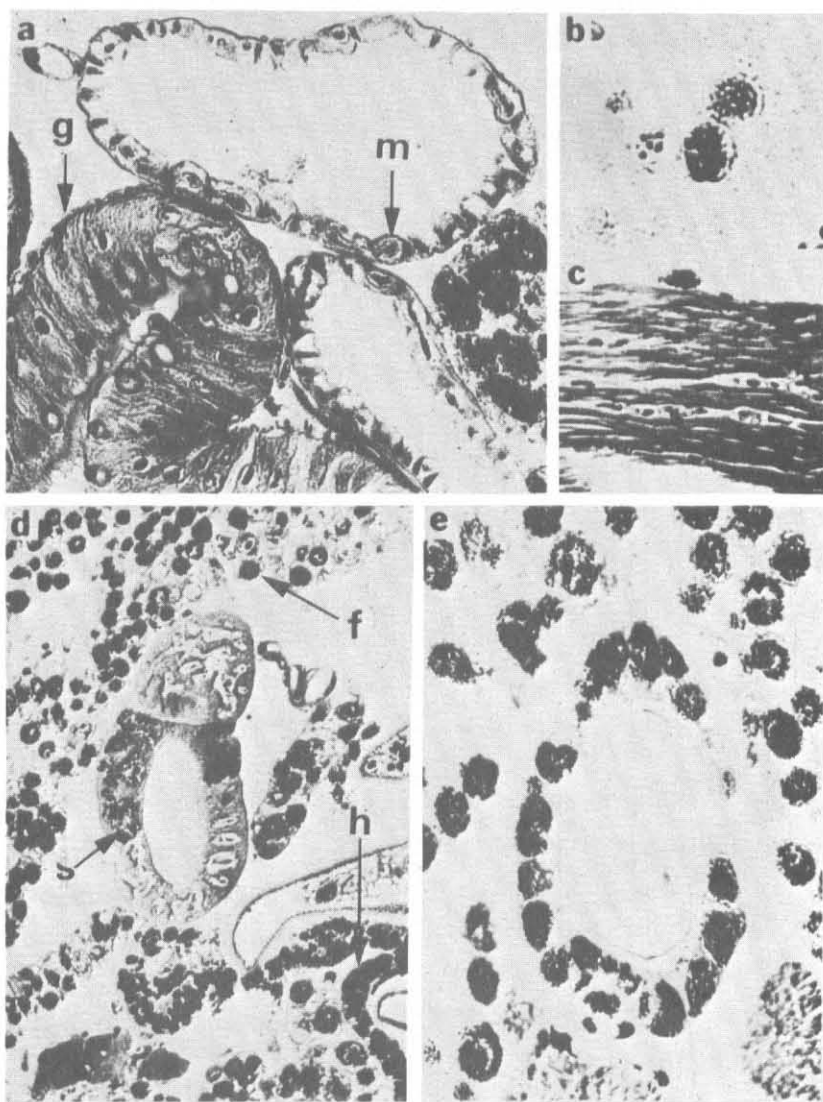
ประกอบด้วยการศึกษาโครงสร้างจุลภาคของ polyhedra, virion และ nucleocapsid ของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน

ก. ศึกษาโครงสร้างจุลภาคจากตัวอย่างบริสุทธิ์

กรองผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสที่ตกตะกอนอยู่กับถั่วด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น ทำให้บริสุทธิ์ด้วยการปั่นใน sucrose density gradient ที่เตรียมเป็นชั้นๆ ด้วยน้ำตาล sucrose จากความเข้มข้น 40 ถึง 65% (w/w) ความเข้มข้นห่างกันชั้นละ 5% ปั่นด้วยความเร็ว 20,000 rpm นาน 1 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียสในหัว rotor Beckman SW 27 เมื่อเก็บชั้นของผลึกโปรตีนแล้วตกตะกอนด้วยการปั่นด้วยความเร็ว 6,000 rpm นาน 10 นาที ใน Sorvall^(R) GLC-2 Centrifuge ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีข้างต้นซ้ำอีกครั้งหนึ่ง นำสารแขวนลอยผลึกโปรตีนมา dialyzed ข้ามกั้นด้วยน้ำกลั่นเพื่อละลายน้ำตาลออก จะได้ผลึกโปรตีนบริสุทธิ์เพื่อการศึกษาต่อไป แยก virions ออกจากผลึกโปรตีนด้วยวิธีการของ McCarthy and Liu (1976) แล้วแยก nucleocapsids ออกจาก virions โดยการ treat ด้วย 0.4% (v/v) Nonidet P-40 นาน 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ตกตะกอน nucleocapsids ด้วยการปั่นด้วยความเร็ว 35,000 rpm นาน 3 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส ในหัว rotor Beckman Type 35 ทำให้บริสุทธิ์โดยปั่นใน sucrose density gradient ความเข้มข้นของน้ำตาล 30-45% (w/w) 2 ครั้ง เก็บชั้นของ nucleocapsids ด้วย ISCO UA-5 density gradient fractionator แล้ว dialyzed ในน้ำกลั่นนาน 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส จะได้ nucleocapsid บริสุทธิ์ เก็บที่ -60 องศาเซลเซียส

ผลึกโปรตีนบริสุทธิ์ศึกษาจาก shadow cast preparation ด้วยการ shadow ตัวอย่างด้วย palladium ส่วน nucleocapsids ศึกษาจากการทำ negatively stained ด้วย 2% phosphotungstic acid (PTA) pH 6.8-7.0

ข. ศึกษาจากเนื้อเยื่อของแมลงที่เป็นโรค
ผ่าเอาไขมัน (adipose tissue) ของหนอนที่เป็นโรคนาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3-5



- ภาพที่ 1 เนื้อเยื่อของหนอนผีเสื้อกระทืบ *Trichoplusia ni* ที่ถูก infect ด้วยเชื้อไวรัส
- เซลล์ของ mid gut epithelial (g) และ malpighian tubules (m) ถูก infect ด้วย NPV ของ *R. ou* (RoMEV). 300x
 - เซลล์เม็ดเลือด (hemocytes) ถูก infect ด้วย NPV ของ *T. ni* (TnMEV). 750x
 - เซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cells) ถูก infect ด้วย NPV ของ *A. californica* (AcMEV) 265x
 - Fat body (f), hypodermis (h), และ silk gland (s) ถูก infect ด้วย NPV ของ *M. brassicae* (MbMEV). 120x
 - เซลล์ของ tracheole ถูก infect ด้วย NPV ของ *M. brassicae* (MbMEV). 300x

มม. ใส่ลงใน 3% glutaraldehyde เตรียมใน buffer นาน 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M sodium cacodylate buffer แล้ว post-fixed ใน 1.0% osmium tetroxide เตรียมใน buffer ล้างด้วย buffer หลายครั้ง ผ่านลงใน ethanol ที่ 50, 70, 80, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นานครั้งละ 30 นาที แล้วแช่ใน propylene oxide และ embed ในส่วนผสมของ Epon-Araldite (Mollenhauer, 1964) ตัดตัวอย่างที่เตรียมหนา 600–700 Å ด้วย ultramicrotome ย้อมสีด้วย 1% aqueous uranyl acetate นาน 10–15 นาที และ 1% lead citrate นาน 1–2 นาที

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาทางโรควิทยา

หนอนเป็นโรคอันเกิดจากเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์จะแสดงอาการคล้ายคลึงกันคือ ที่ส่วนท้องมีลักษณะเป็นจ้ำๆ สีขาวซึ่งจะแผ่ขยายบริเวณออกจนกระทั่งตัวหนอนทั้งตัวเป็นสีขาวครีม หนอนจะเซื่องซึมและอ่อนแอลง ไม่กินอาหาร ไม่ตอบสนองต่อแรงกระตุ้น ตัวหนอนบวม และหดสั้นกว่าเดิม ก่อนตายหนอนจะบินขึ้นไปฟาดภาชนะที่เลี้ยงหนอน และห้อยหัวลงมาโดยเกาะกับภาชนะด้วยขาเทียม ทารกหนอนจะเปลี่ยนเป็นสีดำอย่างรวดเร็ว ผนังลำตัวเมื่อแตะบ่อยๆ จะแตกและอวัยวะภายในซึ่งเหลวและเต็มไปด้วยผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสก็จะไหลออกมา ผลจากการศึกษาเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายด้วยเชื้อไวรัสได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 เนื้อเยื่อที่ถูกทำลายอย่างหนักด้วยเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์คือ fat body, tracheal matrix, hypodermis และ hemocytes ซึ่งจะเห็นผลึกโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์

เหล่านี้ติดสีแดงสด จากการย้อมสีตามวิธีของ Hamm (1966) (ภาพที่ 1 b, d, e) เซลล์ของ mid gut ถูก infect ด้วยเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ โดยจะเห็นนิวเคลียสขยายใหญ่ แต่ไม่พบผลึกโปรตีนในนิวเคลียส (ภาพที่ 1 a) ส่วน malpighian tubules ของแมลงถูก infect ด้วยเชื้อ AcMEV, TnSEV₂, MbMEV และ RoMEV แต่ไม่พบผลึกโปรตีนในนิวเคลียสเช่นกัน (ภาพที่ 1 a) พบว่าเชื้อไวรัส AcMEV, TnMEV, MbMEV และ RoMEV ยังเข้าทำลายเซลล์กล้ามเนื้อด้วย สังเกตได้จากนิวเคลียสของเซลล์ขยายใหญ่ขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 1 c) สำหรับ silk gland ของแมลงถูกทำลายด้วยเชื้อไวรัสเพียงสายพันธุ์เดียวคือ MbMEV และพบผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสในนิวเคลียสของเซลล์ด้วย (ภาพที่ 1 d)

จากการศึกษาพบว่าความเฉพาะเจาะจงของเนื้อเยื่อที่ถูก infect (tissue specificity) ด้วยเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกันมาก Vail และ Jay (1973) ได้ให้ข้อคิดว่า บางทีเนื้อเยื่อทุกชนิดของหนอนก็บ่งชี้ว่า ปลีสสามารถเป็นที่สำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสได้ การที่ไม่พบเนื้อเยื่อบางชนิดถูก infect ในการศึกษานี้อาจมาจากเหตุผลหลายประการคือ 1. เซลล์ของเนื้อเยื่อบางชนิดมีขนาดเล็กมาก และมีโครงสร้างที่ซับซ้อนยากแก่การวิเคราะห์หาเชื้อไวรัสในเซลล์ 2. ในขณะที่เตรียมตัวอย่างเซลล์บางเซลล์อาจจะแตกสลายทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ชนิดของเนื้อเยื่อได้ 3. การเกิดโรคไม่ได้เป็นไปอย่างสม่ำเสมอในแต่ละเนื้อเยื่อ หากเงื่อนไขเตรียมตัวอย่างจากบริเวณที่ไม่แสดงอาการของโรคก็ทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้ 4. การไม่สร้างผลึกโปรตีนในเนื้อเยื่อบางชนิดที่ถูก infect ทำให้ยากแก่การศึกษา

ตารางที่ 1 ความเฉพาะเจาะจงของเนื้อเยื่อที่ถูก infect (tissue specificity) ของเชื้อไวรัส
งทหสยพณัในหนอน *Trichoplusia ni*

เนื้อเยื่อ ^a	AcMEV	TnMEV	TnSEV ₁	TnSEV ₂	MbMEV	RoMEV
fat body	++	++	++	++	++	++
tracheal matrix	++	++	++	++	++	++
hypodermis	++	++	++	++	++	++
hemocytes	++	++	++	++	++	++
mid gut	+	+	+	+	+	+
malpighian tubules	+	-	-	+	+	+
muscle	+	+	-	-	+	+
silk gland	-	-	-	-	++	-

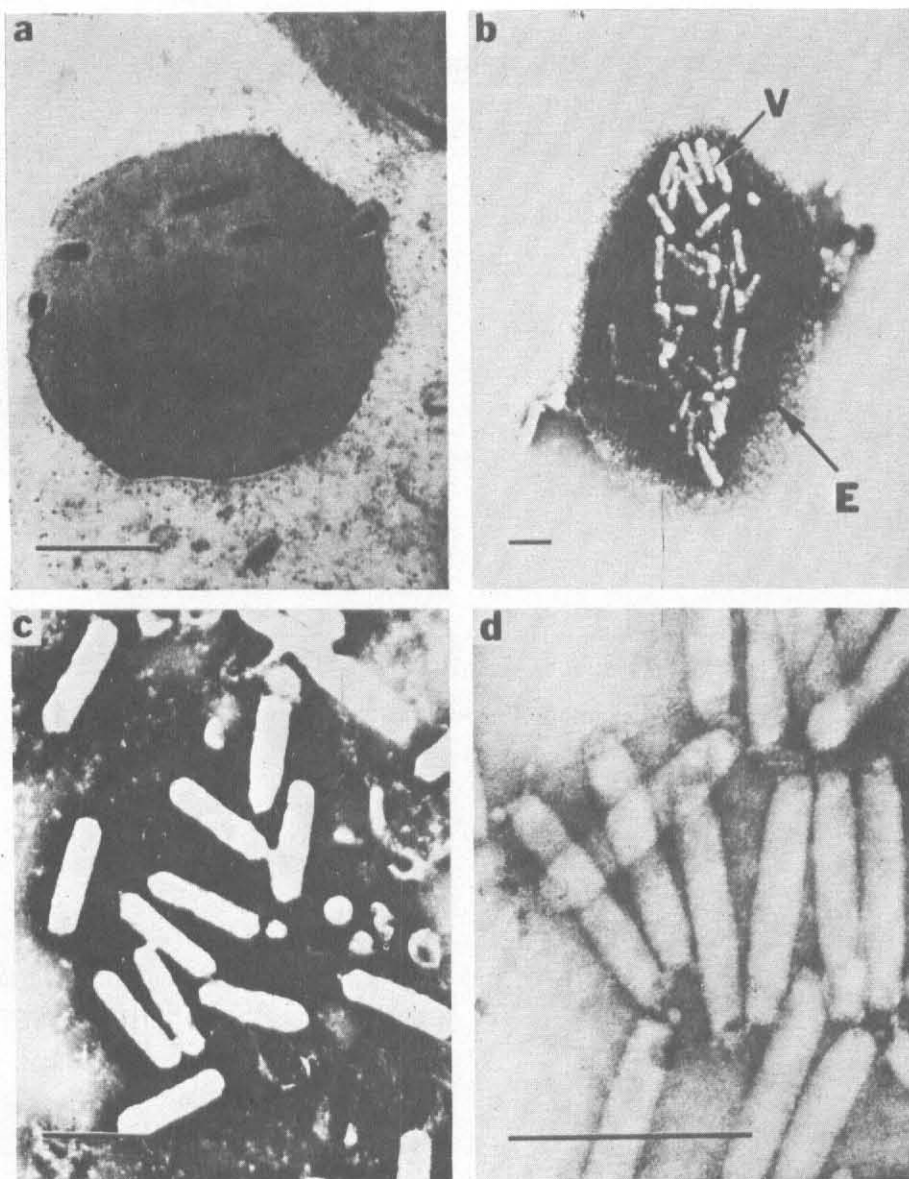
a ++ = มีผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสในนิวเคลียส
 + = เนื้อเยื่อถูก infect แต่ไม่พบผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัส
 - = เนื้อเยื่อไม่ถูก infect

2. การศึกษาทางโครงสร้างจุลภาค

วิธีทำเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ใช้ในการศึกษานี้ใช้ได้ผลกับเชื้อไวรัสทั้งหสยพณั (ภาพที่ 2) การทงหนอนที่เป็นโรคให้เน่าเป็นเวลา 1 เดือน ช่วยในการขจัดทรากหนอนออกไปได้มาก เมื่อผ่านการปั่นด้วย sucrose density gradient อีก 2 ครั้ง ก็จะได้ผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์ (ภาพที่ 3) ได้มีรายงานการ purify ผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสด้วยวิธีการต่างๆ (Van der Geest, 1968 และ Harrap and Longworth 1974) แต่วิธีเหล่านี้มักจะต้องใช้สารเคมีและเครื่องมือทดสอบซับซ้อน วิธีที่ใช้ในการศึกษานี้จึงนับว่าเป็นวิธีที่ง่ายและมีประสิทธิภาพ และเกิดการสูญเสียน้อยที่สุด ระหว่างการ purify การแยก virions ออกจาก polyhedra โดยใช้สารละลายที่เป็นด่าง ซึ่งได้แก่ Na_2CO_3 -NaCl

(ภาพที่ 2 b, c) พบว่าความเข้มข้นของสารละลายและเวลาที่ใช้ในการ treat เป็นปัจจัยที่สำคัญ ความเข้มข้นที่สูงเกินกว่า 0.016 M Na_2CO_3 -0.1 M NaCl และเวลานานเกินกว่า 10 นาที มีผลในการทำลาย virions และ nucleocapsids จากการทดลองพบว่าสารละลายต่าง 0.016 M Na_2CO_3 -0.1 M NaCl และเวลาที่ใช้ treat คือ 5 นาที เป็นสภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับแยก virions ออกจากผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสทั้งหสยพณั การใช้ Nonidet P-40 แยก nucleocapsids ออกจาก virions นับว่าได้ผลดี และเมื่อผ่าน sucrose density gradient สองครั้งก็จะแยก nucleocapsids ที่แตกสลายไม่สมบูรณ์ออกไป ทำให้ได้ nucleocapsids ที่สมบูรณ์และบริสุทธิ์ (ภาพที่ 2 d และภาพ 4 c,d)

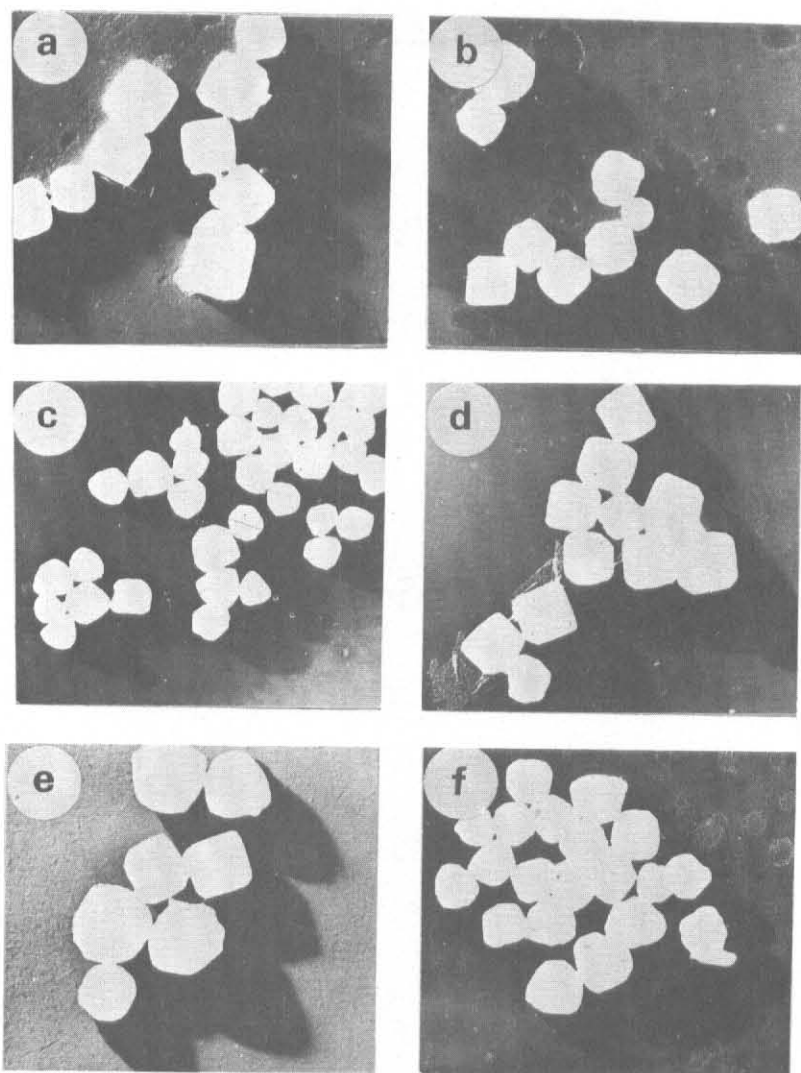
ก. การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของผลึกโปรตีน (polyhedra)



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนของ single embedded virus (TnSEV₁) ในหนอนลิ้มกระหำปดี *Trichoplusia ni*

- Ultrathin section ของผลึกโปรตีน (polyhedra)
- ผลึกโปรตีนหลังจากถูก treat ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง $\text{NaCO}_3\text{-NaCl}$
- virions ที่หลุดออกจากผลึกโปรตีนหลังการ treat ด้วยสารละลายที่เป็นด่าง
- nucleocapsids บริสุทธิ์ที่ได้จากการ treat virion ด้วย Nonidet P-40

รูป b, c, d ถ่ายจากตัวอย่าง negatively stained ด้วย 2% phosphotungstic acid. V, virion; E, polyhedral envelope. Bar=300 nm



ภาพที่ 3 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนของผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์จากตัวอย่างบริสุทธิ์ ถ่ายภาพจาก shadow cast preparation

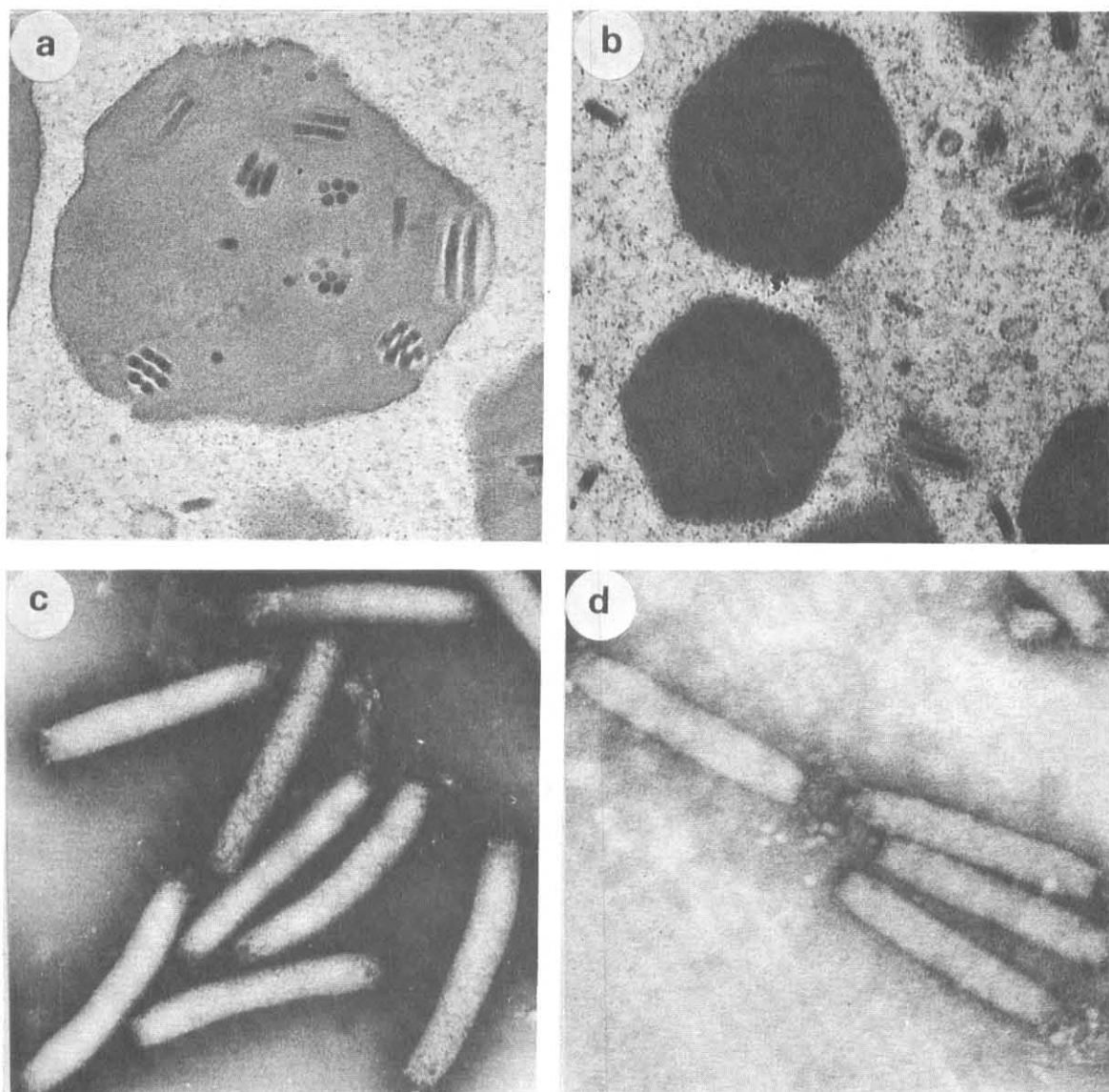
- a) *A. californica* (AcMEV)
- b) *T. ni* (TnMEV)
- c) *T. ni* (TnSEV₁)
- d) *T. ni* (TnSEV₂)
- e) *M. brassicae* (MbMEV)
- f) *R. ou* (RoMEV)

ตารางที่ 2 ขนาดของ polyhedra และ virions ของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ วัดจากภาพอิเล็กตรอนของตัวอย่างที่เตรียมจาก ultrathin sections

เชื้อไวรัส	Polyhedra (Um)		Virions			
			Lengthn (nm)		Width (nm)	
<i>A. californica</i> (AcMEV)	2.1 ± 0.12^a	A ^b	367.0 ± 19.72^a	A ^b	175.1 ± 34.04^a	A ^b
<i>T. ni</i> (TnMEV)	1.4 ± 0.10	B	344.8 ± 14.46	AB	149.3 ± 24.18	B
<i>T. ni</i> (TnSEV ₁)	0.7 ± 0.08	E	304.8 ± 9.66	C	81.9 ± 8.74	D
<i>T. ni</i> (TnSEV ₂)	2.1 ± 0.19	A	346.5 ± 26.13	AB	86.4 ± 9.24	D
<i>M. brassicae</i> (MbMEV)	1.2 ± 0.21	D	327.8 ± 20.89	B	166.7 ± 47.57	A
<i>R. ou</i> (RoMEV)	1.3 ± 0.16	C	290.8 ± 13.04	C	127.5 ± 31.59	C

a ค่า mean $\pm$ standard deviation คำนวณจากการวัดห้าสิบครั้ง

b อักษร A, B, C, D แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกัน และอยู่ในแนวตั้งเดียวกัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายอิเล็กตรอนของเชื้อไวรัสในหนอนผีเสื้อกระด้าง, *Trichoplusia ni*

- a) ผลึกโปรตีนของ NPV ของ *T. ni* (TnMEV) แบบ multiple embedded จากตัวอย่าง ultrathin sections. 45,000x
- b) ผลึกโปรตีนของ NPV ของ *T. ni* (TnSEV₁) แบบ single embedded จากตัวอย่าง ultrathin sections. 45,000x
- c) nucleocapsid ของ NPV ของ *T. ni* (TnMEV) จากตัวอย่าง negatively stained. 55,000x
- d) nucleocapsid ของ NPV ของ *T. ni* (TnSEV₁) จากตัวอย่าง negatively stained. 55,000x

ตารางที่ 3 ขนาดของ nucleocapsids ของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์ วัดจากภาพถ่ายอิเล็กตรอนของตัวอย่างที่เตรียมโดย negatively stained และ ultrathin sections

เชื้อไวรัส	Negatively stained				Ultrathin section			
	Length (nm)		Width (nm)		Length (nm)		Width (nm)	
<i>A. californica</i> (AcMEV)	300.4 ± 5.26 ^a	C ^b	49.1 ± 2.32 ^a	BC ^b	282.4 ± 15.53 ^a	B ^b	37.1 ± 5.27 ^a	A ^b
<i>T. ni</i> (TnMEV)	315.5 ± 8.92	B	49.2 ± 2.51	BC	252.8 ± 12.37	C	37.2 ± 6.37	A
<i>T. ni</i> (TnSEV ₁)	298.5 ± 6.69	C	48.6 ± 2.96	BC	227.7 ± 12.62	E	33.5 ± 5.14	B
<i>T. ni</i> (TnSEV ₂)	298.3 ± 6.77	C	49.7 ± 2.82	B	296.9 ± 15.70	A	33.7 ± 1.39	B
<i>M. brassicae</i> (MbMEV)	341.4 ± 19.84	A	55.4 ± 3.53	A	280.7 ± 17.07	B	30.6 ± 3.77	C
<i>R. ou</i>	293.1 ± 5.67	D	48.4 ± 2.43	C	238.3 ± 13.74	D	23.1 ± 1.62	D

a ค่า mean ± standard deviation คำนวณจากการวัดห้าสิบครั้ง

b อักษร A, B, C, D, E แสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติโดย Duncan's new multiple range test ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันและอยู่ในแนวตั้งเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี shadow-cast ทำให้เห็นรูปร่างของ polyhedra ได้ชัดเจนกว่าวิธีอื่นๆ จะเห็นได้ว่า polyhedra ของ AcMEV, TnMEV และ TnSEV₂ มีรูปร่างคล้ายคลึงกัน คือเป็นสเหลี่ยม (cuboidal) และมีมุมตัดเห็นได้ (ภาพที่ 3 a, b, d) polyhedra ของ TnSEV₁ มีรูปร่างที่ไม่แน่นอนในตัวอย่าง shadow-cost อย่างไรก็ตามภาพถ่ายอิเล็กตรอนจากตัวอย่าง ultrathin section แสดงให้เห็นว่าส่วนใหญ่ polyhedra ของ TnSEV₁ เป็นรูปหกเหลี่ยม (hexagonal) (ภาพที่ 4 b) ส่วน polyhedra ของ TnSEV₁ และ RoMEV นั้นมีรูปร่างต่างๆ หลากลักษณะคือเป็นรูปเกือบกลม รูปแหลมข้างหนึ่งคล้ายทรงปริมาตร (ภาพที่ 3 e, f) ส่วนขนาดของผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์วัดจากผลึกโปรตีนที่เจริญเต็มที่ โดยดูจากทึบ membrane ล้อมรอบค่าของ mean diameters และ standard deviation ของผลึกโปรตีนของทั้งหกสายพันธุ์แสดงไว้ในตารางที่ 2 และแสดงความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์วาเรียนซ์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test จะเห็นได้ว่า polyhedra ของ AcMEV และ TnSEV₂ มีขนาดใกล้เคียงและใหญ่กว่าไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ polyhedra ของ TnSEV₁ มีขนาดเล็กสุด ส่วน polyhedra ของไวรัสสายพันธุ์อื่นๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ข. การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของ virions

virions ของเชื้อไวรัสที่เป็นแบบ single embedded มีรูปร่างคล้ายกันคือ bacilliform shape (ภาพที่ 4 b) แต่ virions ของเชื้อไวรัสแบบ multiple embedded นั้นขึ้นอยู่กับจำนวน nucleocapsids ในแต่ละ virions ซึ่งมีแตกต่างกันตั้งแต่ 1 ถึง 19 nucleocapsids ซึ่งทำให้ virions มีรูปร่างต่างกันออกไป (ภาพ 4 a) จากการวัดขนาดของ virions พบว่า virions ของ

AcMEV มีขนาดยาวที่สุดและของ MbMEV ยาวเป็นที่สอง ซึ่งสัมพันธ์กับความกว้างของ virions ของทั้ง 2 สายพันธุ์พอดี (ตารางที่ 2) ความกว้างของ virions ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของ virions ว่าเป็นแบบ single embedded หรือแบบ multiple embedded อย่างไรก็ตาม virions ที่เป็นแบบเดียวกันก็ยังมีมีความยาวและความกว้างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ความกว้างและความยาวของ virions ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์และความแตกต่างกันแสดงไว้ในตารางที่ 2

ค. การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของ nucleocapsids

nucleocapsids ของเชื้อไวรัสทั้งหกสายพันธุ์มีรูปร่างเหมือนกันคือ rod-shaped (ภาพที่ 4 c,d) สำหรับขนาดของ nucleocapsids แตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) เป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับ nucleocapsids ที่วัดจากภาพถ่ายอิเล็กตรอนจาก negatively stained มีขนาดใหญ่กว่าที่วัดจากภาพถ่ายอิเล็กตรอนจาก ultrathin sections ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการ บวมของ nucleocapsids เมื่อถูกปล่อยออกมาจาก virions ดังนั้นขนาดของ nucleocapsids ที่วัดจากตัวอย่าง ultrathin sections อาจมีความเที่ยงตรงกว่า เพราะไม่ได้ผ่านการ treat ด้วยสารเคมีต่างๆ ตอนทำให้บริสุทธิ์เหมือนตัวอย่างจาก negatively stained ซึ่งพบว่า nucleocapsids ของ TnSEV₂ มีขนาดใหญ่ที่สุด และ TnSEV₁ มีขนาดเล็กที่สุด

จากการศึกษาเห็นได้ว่ารูปร่างและขนาดของ polyhedra, virions และ nucleocapsids เป็นลักษณะประจำของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ ไม่ขึ้นอยู่กับ host เพราะถึงแม้จะใช้ host ชนิดเดียวกัน ขนาดและรูปร่างของส่วนประกอบของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ก็ยังคงแตกต่างกันอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติ ขนาดและรูปร่างของ polyhedra มีความสำคัญในการใช้เป็นข้อมูลอันหนึ่งในการจำแนกชนิดของเชื้อ แต่อาจใช้ประโยชน์จากรูปร่างของ virions และ nucleocapsids ได้น้อยกว่าขนาด ทั้งนี้เพราะรูปร่างของ virions ขึ้นอยู่กับจำนวน nucleocapsids ในแต่ละ virions และรูปร่างของ nucleocapsids ในแต่ละสายพันธุ์ก็เหมือนกันจนยากแก่การใช้จำแนกแฉกแรงชนิดของเชื้อ แต่ขนาดของ nucleocapsids ของไวรัสทั้งหกสายพันธุ์มีความแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งข้อมูลนี้อาจจะนำมาเป็นประโยชน์ในการจำแนกชนิดของไวรัสของแมลงได้

เอกสารอ้างอิง

- Bergold, G.H. 1963. The nature of nuclear polyhedrosis viruses. In "Insect Pathology, An Advanced treatise" (E.A. Steinhaus, ed.), Vol. I, Chap. 13, pp. 413-456. Academic Press, N.Y.
- Hamm, J.J. 1966. A modified azan staining technique for inclusion body viruses. J. Invertebr. Pathol. 8 : 125-126.
- Harrap, K.A. and J.F. Longworth 1974. An evaluation of purification methods for baculoviruses. J. Invertebr. Pathol. 24 : 55-62.
- Martignoni, M.E. and P.J. Iwai, 1977. A catalog of viral diseases of insects and mites. Second edition, USDA Forest Service General Technical Report PNW-40.
- McCarthy, W.J. and S.Y. Liv. 1976. Electrophoretic and serological characterization of *Porthetria dispar* polyhedron protein. J. Invertebr. Pathol. 28 : 57-65.
- Mollenhauer, H.H. 1964. Plastic mixtures for use in electron microscopy. Stain Technol. 39 : 111-114.
- Shorey, H.H. and R.L. Hale. 1965. Mass-rearing of the larvae of nine noctuid species on a simple artificial medium. J. Econ. Entomol. 58 : 522-524.
- Vail, P.V. and D.L. Jay. 1973. Pathology of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in alternate hosts. J. Invertebr. Pathol. 21 : 198-204.
- van der Geest, L.P.S. 1968. A method for the purification of polyhedra. J. Invertebr. Pathol. 11 : 502.