

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ 2544

เรื่อง

การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์เบื้องต้นจากเนื้อเยื่อหลากหลายชนิดของ  
หนอนใยผัก [*Plutella xylostella* (L.)]

STUDY ON PRIMARY CELL CULTURE TECHNIQUES FROM  
VARIOUS TISSUES OF THE DIAMONDBACK MOTH

[*Plutella xylostella* (L.)]

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุนเรื่อน เพชรวัลย์

นางสาวกัญญา มงคลโกชนัน

Professor Dr. Serge Belloncik

RCH

OL

561

P55

08457

เลขหมู่..... 86114

เลขทะเบียน.....

วัน,เดือน,ปี..... 29 พ.ย. 2551

หน่วยงานที่สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12017139
i. ....

สนับสนุนทุนวิจัยโดย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ประจำปีงบประมาณ 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทคัดย่อ

เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-PX-E1 สร้างจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* (L.) โดยเฉพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรกในอาหาร TNM-FH ที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °ซ เซลล์ไลน์ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชนิด คือ เซลล์รูปกระสวย และเซลล์รูปร่างคล้ายเซลล์บุผิว ซึ่งเซลล์ทั้งสองชนิดเจริญเกาะพื้นผิวแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนประชากรเป็นสองเท่าของเซลล์ในพาสเสจที่ 2 และ 18 คือ 110.59 และ 61.22 ชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์มีความแตกต่างกันซึ่งอยู่ในช่วง 6-124 โครโมโซม การจำแนกเซลล์ไลน์ชนิดใหม่โดยเทคนิค Random amplified polymorphic DNA พบว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอมีความแตกต่างจากแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) และหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1) ซึ่งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เซลล์ไลน์ชนิดนี้สามารถเป็นเซลล์อาศัยในการจำลองตัวเองของไวรัสชนิด *Autographa californica* (AcMNPV) และ *Exoia scandens* ไชโตพลาสมิกพอลิโอโครซิสไวรัส (*EsCPV*) อย่างไรก็ตามเซลล์ไลน์ชนิดนี้ยังตอบสนองต่อสารพิษ *Bacillus thuringiensis*

## ABSTRACT

A new cell line designated KMITL-PX-E1 has been established from embryonic tissue of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). The primary cultures were seeded in TNM-FH medium supplemented with 20 % fetal bovine serum and incubated at 28 °C. The cell line consisted of a mixture of two cell types, spindle-shaped cells and epithelial-like cells, both of which grew as attached monolayers. The population doubling time at the 2<sup>nd</sup> and the 18<sup>th</sup> passages were 110.59 and 61.22 hours, respectively. The chromosome numbers varied from 6-124. Random amplified polymorphic DNA profile analysis showed that this new line from the diamondback moth differed from the profiles of the beet armyworm (SE-1) and the American cotton bollworm (KMITL-HA-E1) cell lines maintained in the laboratory. This cell line supported replication of *Autographa californica* (AcMNPV) and *Exoia scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (EsCPV). However, this cell line was sensitive to *Bacillus thuringiensis* toxin.

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนการทำงานวิจัยโดย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ซึ่งสำนักงานงบประมาณจัดสรรให้ 82,000 บาท ในปีงบประมาณ 2544 ผลที่ได้รับคือเซลล์ไลน์หนอนใยผักชนิดใหม่ในประเทศไทย ซึ่งสามารถนำไปใช้ศึกษาถึงระดับเซลล์ของหนอนชนิดนี้ได้ ทั้งนี้เนื่องจากหนอนใยผักเป็นแมลงศัตรูพืชที่ต้านทานต่อสารเคมีกำจัดศัตรูพืชหลายชนิด ในอนาคตจะทำการวิจัยต่อยอดจากผลงานวิจัยนี้ต่อไป ดังนั้นจึงขอขอบคุณคณะกรรมการทุกท่าน จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และสำนักงานงบประมาณ ที่กรุณาจัดสรรทุนวิจัยดังกล่าวให้

นอกจากนี้ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม ดร. สุดาวรรณ เขยชมศรี คุณอุทัย เกตุนุติ และ Professor Dr. Serge Belloncik ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์หนอน กระเทียม ไวรัสโรคแมลง สารพิษจากเชื้อราโรคแมลง และ *Bacillus* spp. เพื่อใช้ทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์หนอนใยผักที่สร้างได้ และทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์)

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	2
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 หนอนไผ่ฝัก.....	3
2.1.1 ความสำคัญและลักษณะการทำลายพืชอาศัย.....	3
2.1.2 ชีววิทยาของหนอนไผ่ฝัก.....	3
2.1.3 การควบคุมหนอนไผ่ฝัก.....	5
2.1.3.1 การควบคุมโดยใช้สารเคมี.....	5
2.1.3.2 การควบคุมโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร.....	6
2.1.3.3 การควบคุมโดยชีววิธี.....	6
2.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture).....	6
2.2.1 รังไข่ (ovary).....	7
2.2.2 เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte).....	7
2.2.3 ตัวอ่อน (embryo).....	7
2.2.4 เนื้อเยื่ออื่นๆ.....	8
2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง.....	8
2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง.....	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์.....	10
2.6 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus).....	12
2.6.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส.....	12
2.6.2 การติดเชื่อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในแมลง.....	14
2.6.3 การติดเชื่อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง.....	15
2.7 ไชโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัส.....	17
2.7.1 โครงสร้างของไชโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัส.....	18
2.7.2 การติดเชื้อไชโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัสในแมลง.....	19
2.7.3 การติดเชื้อไชโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง.....	20
2.8 เชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	21
2.8.1 โครงสร้างของแบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	21
2.8.2 การติดเชื้อ <i>Bacillus thuringiensis</i> ในแมลง.....	25
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	27
3.1 แมลง ไรต์โรคแมลง และแบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	27
3.1.1 ไช้ของหนอนไยฝัก.....	27
3.1.2 ไรต์โรคแมลงชนิดต่าง ๆ.....	27
3.1.3 สารพิษจากแบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt).....	27
3.2 อุปกรณ์.....	27
3.3 สารเคมี.....	29
3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.4.1 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture).....	31
จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนหนอนไยฝัก	
3.4.2 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง .....	32
3.4.3 การศึกษาการเจริญของเซลล์.....	32
3.4.4 การวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์.....	32
3.4.5 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์โดย RAPD.....	33

# สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ไลนั้.....	33
3.4.5.2 การสกัดดีเอ็นเอผีเสื้อหนอนใยผัก.....	34
3.4.5.3 การวิเคราะห์พันธุกรรมของเซลล์ไลนั้ KMITL-PX-E1 ..... ด้วยเทคนิค RAPD-PCR	35
3.4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวกลีโอโพลีฮีโดรไวรัส..... และไซโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัส	36
3.4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลนั้ต่อการตอบสนองของสารพิษจาก..... แบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i>	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	38
4.1 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนใยผัก.....	38
4.2 การถ่ายเซลล์.....	38
4.3 การศึกษาการเจริญของเซลล์ไลนั้ KMITL-PX-E1.....	42
4.4 การวิเคราะห์คาร์โบไฮป์.....	45
4.5 ศึกษาการจำแนกชนิดของเซลล์ไลนั้ด้วยโดยเทคนิคRAPD.....	45
4.5.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ.....	45
4.5.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ.....	47
4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวกลีโอโพลีฮีโดรไวรัส..... และไซโตพลาสมิกโพลีฮีโดรซิสไวรัส	51
4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลนั้ในการการตอบสนองของสารพิษจาก..... แบคทีเรีย <i>Bacillus thuringiensis</i>	57
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	63
บรรณานุกรม.....	65
ภาคผนวก ก.....	75
ภาคผนวก ข.....	78

ประวัติผู้เขียน.....81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา แVIต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงยืนยันควบคุมการสร้างผลึก โปรตีนที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	23
สายพันธุ์ต่าง ๆ	
2.2 แสดงคุณสมบัติของชนิดยีนที่ควบคุมการสร้างผลึก โปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงของ.....	24
<i>Bacillus thuringiensis</i>	
4.1 การเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน(similarity coefficient) ของ.....	50
เซลล์ไลน์หนอน ไยผัก,KMIYL-PX-E1 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม, SE-1	
เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน, KMITL-HA-E1 และผีเสื้อหนอนไยผัก	
4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) .....	57
ที่ความเข้มข้นต่างๆ	
4.3 ปริมาณ โปรตีนของสารพิษ <i>Bt</i> 3 ชนิด เมื่อเทียบกับกราฟ โปรตีนมาตรฐาน.....	58
4.4 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการ.....	60
ทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomization Design : CRD) ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด	
และชนิดของสารพิษแบคทีเรีย <i>Bt</i> 3 ชนิด	
4.5 การเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1, SE-1และ .....	61
KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษจาก <i>Bt</i> 3 สูตร	
4.6 การเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารพิษ <i>Bt</i> แต่ละสูตร ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์.....	62
KMITL-PX-E1, SE-1และKMITL-HA-E1	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ภาพแสดงระยะต่าง ๆ ของหนอนใยผัก.....	5
2.2 การวิเคราะห์ RAPD.....	11
2.3 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีดีโครไวรัสรูปแบบอิสระ (budded virus, BV) และ รูปแบบไวรัสที่อยู่ภายในเปลือกโปรตีน (occlusion driven virus, ODV)	14
2.4 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบไซโตพลาสซึม โพลีดีโครซิสไวรัส.....	19
2.5 โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์แมคที่เรีย <i>B. thuringiensis</i> .....	26
4.1 กลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนหนอนใยผักภายหลังการปลูกเซลล์ 30 วัน.....	39
4.2 แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ภายหลังการปลูกกลุ่มเซลล์ เริ่มแรกเป็นเวลา 60 วัน.....	40
4.3 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสเสจที่ 3 อายุ 48 วัน.....	41
4.4 การเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสเสจที่ 11 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ TNM-FH.....	43
ที่มีค่า pH 6.2 6.4 และ 6.6	
4.5 ระยะเวลาที่เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสเสจที่ 2 และ 18 เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (population doubling time)	44
4.6 แสดงลักษณะโครโมโซมในระยะเมตาเฟสของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1.....	46
พาสเสจที่ 11	
4.7 กราฟแสดงจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1.....	46
4.8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ A02.....	47
4.9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ A04.....	48
4.10 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ B01.....	49
4.11 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 อายุ 5 วัน ภายหลังการถ่ายเซลล์.....	52
4.12 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังการปลูกเชื้อ <i>AcMNPV</i> 6 วัน และ.....	53
ปรากฏผลึกโปรตีน (OBs) ภายในนิวเคลียสของเซลล์	
4.13 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังการปลูกเชื้อ <i>GmMNPV</i> 6 วัน พบลักษณะของ.....	54
cytopathic effect แต่ไม่พบผลึกโปรตีนภายในนิวเคลียสของเซลล์	
4.14 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังการปลูกเชื้อ <i>EsCPV</i> 4 วัน และ.....	55
ปรากฏผลึกโปรตีน (OBs) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์	

## สารบัญรูป(ต่อ)

รูป	หน้า
4.15 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังจากปลูกเชื้อ <i>EsCPV</i> 8 วัน และ.....56 ปรากฏผลึกโปรตีน (OBs) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จำนวนมาก	
4.16 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA.....58	
4.17 ภาพแสดงการเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ปกติ และ.....62 เซลล์ไลน์ที่ได้รับสารพิษ <i>B. thuringiensis</i>	



# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หนอนใยผัก (Diamondback moth) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผักคะน้า ผักกาดขาว ผักกาดหัว กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก การระบาดของหนอนใยผักสามารถสร้างความเสียหายได้ในทุกท้องถิ่นและทุกฤดูกาล เนื่องจากหนอนใยผักเป็นแมลงที่มีวงจรชีวิตสั้นและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว แมติ่ตัวหนึ่งสามารถวางไข่ได้ 40-400 ฟอง (พิสมัย ชวลิตวงษ์พร. 2538) ผลของการใช้สารเคมีสังเคราะห์เป็นยาฆ่าแมลงในการควบคุมแมลงชนิดนี้อย่างต่อเนื่องมาเป็นเวลานาน กลับทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของหนอนใยผัก เพราะสารเคมีที่เคยใช้ไม่สามารถป้องกันการทำลายของแมลงชนิดนี้ได้อีกต่อไป นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดผลเสียหายต่าง ๆ ตามมา เช่น ปัญหามลพิษในสิ่งแวดล้อม ปัญหาด้านสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวไม่ใช่วิธีการที่ดีที่สุดในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบต่าง ๆ เช่น การนำเชื้อไวรัสโรคแมลงนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus, NPV) มาพัฒนาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชบางชนิด เพื่อเป็นการลดการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช โดยคาดหวังว่าจะเป็นการลดปัญหามลภาวะเป็นพิษ ปัญหาพิษตกค้างบนผลผลิตทางการเกษตร ปัญหาการใช้สารเคมีสูงซึ่งส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิต และปัญหาแมลงสร้างความต้านต่อสารเคมี เป็นต้น

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) และเซลล์ไลน์ (cell line) จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryonated egg) ของหนอนใยผัก การใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนเพื่อสร้างเซลล์ไลน์นั้นมีข้อดีคือเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อชนิดนี้มีความหลากหลาย และปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้มีความพอเพียงต่อการปลูกเซลล์เริ่มแรก (Sato. 1989 ; Vaughn. 1994) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการทดสอบความอ่อนแอของเซลล์ไลน์ต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus, NPV) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกเซลล์ไลน์ที่สามารถใช้ผลิตไวรัสโรคแมลงในห้องปฏิบัติการต่อไป

## 1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) โดยใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryonated egg) ของหนอนใยผัก
2. เพื่อพัฒนาเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ของหนอนใยผัก
3. เพื่อศึกษาคูณลักษณะบางประการของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ เช่น ลักษณะรูปร่าง การเจริญของเซลล์ ลักษณะและจำนวนโครโมโซม
4. เพื่อทดสอบความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงบางชนิดเช่น *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (*HaSNPV*), *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*AcMNPV*), *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (*GmMNPV*), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*), *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus (*HaCPV*)
5. เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อสารพิษบางชนิดที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาคูณลักษณะของเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นมาได้จากระยะไข่ของหนอนใยผัก
2. เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus) ไซโตพลาสติกโพลีฮีโดรซิสไวรัส (cytoplasmic polyhedrosis virus) สารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) เพื่อใช้ในการควบคุมหนอนใยผัก

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเทคนิคการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกและเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของหนอนใยผัก ศึกษาคุณลักษณะบางประการของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ ตลอดจนศึกษาความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงบางชนิด

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ของหนอนใยผัก
2. เพื่อใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์แมลงมีประโยชน์ต่อการป้องกันกำจัด
3. เพื่อใช้ในงานเพิ่มปริมาณไวรัสโรคแมลงในหลอดทดลอง
4. สามารถใช้ในงานทดสอบความเป็นพิษของโรคแมลงและสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ
5. เพื่อใช้ศึกษาถึงกลไกการต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงในระดับเซลล์

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 หนอนใยผัก

หนอนใยผักมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plutella xylostella* (Linnaeus) ชื่อสามัญ diamondback moth, cabbage plutella, short hole worm และ small cabbage moth แต่นิยมเรียก diamondback moth จัดอยู่ใน Family Yponomeutidae Order Lepidoptera

#### 2.1.1 ความสำคัญและลักษณะการทำลายพืชอาศัย

หนอนใยผักเป็นแมลงศัตรูสำคัญที่สุดของพืชตระกูลกะหล่ำ ได้แก่ กะหล่ำปลี กะหล่ำดอก คะน้า ผักกาดเขียวปลี ผักกาดขาวปลี กวางตุ้ง บรอกโคลี เป็นต้น มักพบระบาดทั่วไปตามแหล่งปลูกทั่วโลก เช่น อเมริกาเหนือ ทางใต้ของอเมริกาใต้ แอฟริกาใต้ ยุโรป เอเชียอาคเนย์ อินเดีย ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ (Hardy, 1938) ในประเทศไทยพบระบาดรุนแรงในช่วงฤดูหนาวต่อร้อน (ปิยรัตน์ เขียนมีสุขและจักรพงษ์ พิริยพล. 2534) หนอนมักจะเริ่มระบาดมากตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนในระยะเวลาอากาศเริ่มเย็นและเพิ่มความรุนแรงขึ้นเรื่อย ๆ จะระบาดมากในช่วงอากาศเริ่มอบอุ่นขึ้นในช่วงปลายเดือนมกราคมจนถึงเดือนเมษายน การระบาดมักจะลดความรุนแรงหากมีฝนติดต่อกันหลายวัน โดยตัวหนอนจะกัดกินผิวด้านล่างใบ เมื่อหนอนโตขึ้นจะกัดกินด้านบนใบพืชทำให้เกิดเป็นรูโหว่ ใบเป็นรูพรุนทั่วทั้งใบ และชอบเข้าไปกัดกินในยอดผักที่กำลังเจริญเติบโต ทำให้ยอดเสีย ตัวหนอนที่ออกจากไข่ใหม่ ๆ จะแยกย้ายกันออกทำลายพืช ซึ่งสังเกตเห็นรอยทำลายแตกต่างจากหนอนชนิดอื่น โดยจะทะทะกินเนื้อใบส่วนที่เป็นสีเขียวได้ใบเหลือแต่เยื่อสีขาวโปร่งไว้ให้เห็นด้านบนใบ ซึ่งถ้าหากมีการระบาดมาก ๆ ส่วนของใบเหล่านี้จะแห้งพรุนโปร่ง จนบางครั้งเหลือแต่ก้านใบ ถ้าหนอนใยผักระบาดในระยะผักโตเต็มที่ มีดอกหรือติดฝักอ่อน หนอนก็จะกัดทะทะ และเจาะทั้งดอก และฝักอ่อนเข้าไปทำความเสียหายจนอาจจะไม่สามารถเก็บเมล็ดพันธุ์ได้เลย ถ้าอากาศแห้งและร้อนจัดความเสียหายจะรุนแรงมากขึ้น ระบาดได้รวดเร็วและสร้างความต้านทานต่อยาฆ่าแมลงได้รวดเร็วและหลายชนิดจึงยากต่อการป้องกัน (อนันต์ สกุศลเดิม. 2540)

#### 2.1.2 ชีวิตวิทยาของหนอนใยผัก

หนอนใยผักมีวงจรชีวิตแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ ระยะไข่ ระยะหนอนมี 4 วัย ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย

ระยะไข่ ไข่สีเหลือง หนอนใยผักจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวบนใบพืชอาหาร หรือวางเป็น

กลุ่มเล็ก ๆ เรียงติดกัน 2-5 ฟอง ไข่มีขนาดเล็กประมาณ 0.44 x 0.22 มิลลิเมตร ก่อนข้างแบนและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยาริ สีเหลืองอ่อนเป็นมัน (Ho. 1965) ระยะไข่ 3-4 วัน เมื่อไข่ใกล้ฟักออกเป็นตัวจะมีสีเหลืองเข้ม มองเห็นส่วนหัวของตัวอ่อนเป็นสีดำอยู่ภายใน ซึ่งตัวหนอนจะขดอเป็นรูปตัวซี (C) อยู่ภายในไข่นั้น (ณรรฐพล วัลลภลักษณ์. 2526) (รูปที่ 2.1 ก)

ระยะหนอน มี 4 วัย ตัวหนอนเมื่อโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ลักษณะของตัวหนอนส่วนหัวและส่วนท้ายแหลม ตัวเรียวยาว ส่วนท้ายจะมีปมยื่น 2 แฉก สีลำตัวอาจเป็นสีเขียวหรือเขียวปนเหลือง เมื่อหนอนถูกรบกวนจะดิ้นและทิ้งตัวห้อยลงสู่พื้นดินหรือหลบซ่อนตามส่วนล่างของผักทันทีโดยการชักใย จึงเรียกว่า หนอนใยผัก ระยะหนอนจะใช้เวลาประมาณ 8-10 วัน (รูปที่ 2.1 ข)

ระยะดักแด้ หนอนใยผักจะเข้าดักแด้โดยมีใยบาง ๆ คล้ายใยไหมหุ้มอยู่ ดักแด้มีสีเหลืองเขียว ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร ก่อนจะเป็นตัวเต็มวัย 1-2 วัน ดักแด้และจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลถึงดำน้ำตาลก่อนจะเป็นตัวเต็มวัย 1-2 วัน ระยะดักแด้ประมาณ 3-4 วัน (รูปที่ 2.1 ค)

ตัวเต็มวัย ผีเสื้อหนอนใยผักจัดเป็นผีเสื้อกลางคืน มีขนาดเล็ก อาศัยอยู่ตามใต้ใบพืชผัก ลำตัวมีสีเทาอ่อน ความยาวประมาณ 6-7 มิลลิเมตร มีหนวดเป็นแบบเส้นด้าย แต่ละปล้องจะมีสีดำสลับขาว ปีกคู่หน้ามีรอยแถบสีเหลืองขาวตามความยาวของลำตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม 3 อัน เมื่อมองทางด้านข้างของลำตัว ตัวผู้มีสีเข้มกว่าตัวเมีย บริเวณขอบปีกคู่หลังมีลักษณะเป็นแถบสีเหลือง (Hue. 1965) ส่วนหลังมีแถบสีเหลืองส้ม เป็นรูปหลายเหลี่ยมเหมือนเพชรที่เจียรนัย จึงมีชื่อสามัญเป็นภาษาอังกฤษว่า diamondback moth (Harcourt. 1957) อายุของตัวเต็มวัยประมาณ 5-7 วัน ตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวสามารถวางไข่ได้ประมาณ 40-400 ฟอง (พิสมัย ชวลิตวงษ์พร. 2538) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ได้รับแสง อุณหภูมิ อายุของตัวเต็มวัย และชนิดของอาหารในระยะหนอน (Harcourt. 1957) (รูปที่ 2.1 ง)



ก. ระยะไข่



ข. ระยะหนอน



ค. ระยะดักแด้



ง. ตัวเต็มวัย

รูปที่ 2.1 ภาพแสดงระยะต่างๆ ของหนอนใยผัก

### 2.1.3 การควบคุมหนอนใยผัก

#### 2.1.3.1 การควบคุมโดยใช้สารเคมี

มีรายงานว่าหนอนใยผักมีปัญหาในการป้องกันกำจัดมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารเคมีเพราะหนอนนี้สร้างความต้านทานต่อสารเคมีได้เร็วในแหล่งที่มีการใช้ยาเสมอๆ ทำให้สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันกำจัดได้ผลเพียงในระยะสั้น (ฉรรฐพล วัลลิลักษณ์. 2526) ในประเทศอินโดนีเซียมีรายงานครั้งแรกว่าหนอนใยผักต้านทานต่อยาฆ่าแมลงชนิด DDT (Ankersmith. 1953) ไม่เฉพาะยาฆ่าแมลงชนิด DDT เท่านั้นแต่หนอนใยผักยังต้านทานต่อยาฆ่าแมลงประเภทคลอรีเนต ไฮโดรคาร์บอน(chlorinated hydrocarbons) ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphates) คาร์บาเมต (carbamates) สารสังเคราะห์ไพริทรอยด์ (synthetic pyrethroids) เบนซอลฟีนอล ยูเรีย (benzylphenyl ureas) (Sun *et al.* 1978 ; Sudderuddin and Kok. 1979 ; Cheng. 1981 ; Liu *et al.* 1982 ; Ohasawa *et al.* 1985 ; Chen and Sun. 1986 ; Griggs and Talekar. 1986 ; Pering *et al.* 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.3.2 การควบคุมโดยใช้สารสกัดจากสมุนไพร

สารสกัดจากสมุนไพรบางชนิดสามารถนำมาใช้ในการป้องกันกำจัด หนอนใยผักได้ จากรายงานของอุดมพร แพ่งนคร (2539) นำเอารากหญ้าแฝกชนิดหอม *Vertiver zizaniodes* (L.) มาสกัดสารออกฤทธิ์ในรูปของน้ำมันหอมระเหยด้วยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ และนำสารที่สกัดได้มาทดสอบกับหนอนใยผักวัย 3 ทั้ง 2 วิธีคือ ถูกตัวตาย และกินตาย พบว่า สารสกัดจากหญ้าแฝกที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้หนอนใยผักตาย 37.14 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีถูกตัวตาย และ 51.52 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีกินตาย ความเข้มข้นของสารสกัดตั้งแต่ 30 เปอร์เซ็นต์ ลงมาไม่มีผลต่อการตายของหนอน Sinchaisri *et al.* (1988) ได้ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืช 8 ชนิด เพื่อเป็นสารขับไล่หนอนใยผัก และพบว่าพืชที่มีสารออกฤทธิ์ในการขับไล่ได้ดี คือ หนุมานประสานกาย และตะไคร้หอม

### 2.1.3.3 การควบคุมโดยชีววิธี

ในธรรมชาติศัตรูของหนอนใยผักที่พบคือแตนเบียน ได้แก่ แตนเบียน หนอน *Costesia plutella* Kurdjumov (Hymenoptora : Braconidae) แตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* Viggiani และ *Trichogrammatoidae bactrae* Nagaraja (Hymenoptora :Trichogrammatidae) (ปิยรัตน์ เขียนมีสุขและคณะ 2542) อนันต์ สกฤตเดิม (2540) ใช้แตนเบียนไข่ (*Trichogrammatoidae bactrae* Nagaraja) อัตรา 60,000 ตัวต่อไร่ แตนเบียนหนอน (*C. plutella*) อัตรา 10,000 ตัวต่อไร่ ปล่อย 3 ครั้งร่วมกับเชื้อแบคทีเรียจะควบคุมประชากรหนอนใยผักให้อยู่ในระดับต่ำได้

นอกจากนี้การควบคุมปริมาณประชากรหนอนใยผักในประเทศไทย ยังมีการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หรือ *Bt* พิสมัย ชวลิตวงษ์พร (2538) กล่าวว่า มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก โดยเมื่อหนอนกินเชื้อแบคทีเรียเข้าไปสารพิษจะออกฤทธิ์ทำให้แมลงหยุดกินอาหารและตายอย่างรวดเร็ว สารพิษ *Bt* ที่ทำการค้า ได้แก่ ฟลอร์แบค รูริไซด์ แบคโทสบิน เซนทารี เคลฟิน หรือ ควาก สารพิษ *Bt* เหล่านี้ไม่เป็นพิษต่อตัวเบียนไข่ของหนอนใยผัก แต่ Shelton *et al.* (1993) พบว่าหนอนใยผักมีความต้านทานต่อ *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*

## 2.1 การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture)

ในปี ค.ศ. 1915 Goldschmidt และ ค.ศ. 1935 Trager รายงานการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของแมลงกลุ่มผีเสื้อ ปี ค.ศ. 1959 Gaw และคณะ และ ค.ศ. 1962 Grace ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของแมลงได้สำเร็จ จนถึงปัจจุบันได้มีเซลล์ไลน์ของแมลงกลุ่มผีเสื้อมากกว่า 400 ชนิด ซึ่งแหล่งเนื้อเยื่อนำมาสร้างเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มแรก ได้แก่ รังไข่ (ovary) เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) ตัวอ่อน (embryo)

เอกสารและเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.1 รังไข่ (ovary)

Grace (1962). เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงโดยใช้เนื้อเยื่อรังไข่จากดักแด้ของ *Antheraea eucalypti* เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้นสำหรับสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกในอาหารสูตร Wyatt ที่เสริมด้วยวิตามินบี ซึ่งพัฒนาเป็นเซลล์ไลน์ได้สำเร็จเป็นครั้งแรก และนับว่าเป็นเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่ได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง Stanley and Vaughn. (1968) และ Vaughn. (1994) กล่าวว่าเนื้อเยื่อจากรังไข่เป็นแหล่งของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ดีที่สุดเหมาะสำหรับสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก เซลล์มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้เซลล์ที่ได้จะมีรูปร่างหลายแบบ

ศุภาวรรณ เขยชมศรี และคณะ (2542) สร้างเซลล์ไลน์ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน โดยใช้เนื้อเยื่อรังไข่ของตัวเต็มวัยเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มแรก เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ที่ได้คือ GLGC-HA-52

### 2.2.2 เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte)

Grace (1954) ได้สร้างเซลล์ไลน์จากเซลล์เม็ดเลือดของหนอนไหม *Bombyx mori* แต่เซลล์มีชีวิตรอดในระยะเวลาที่สั้น ต่อมา Mitsuhashi (1966) ได้สร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเซลล์เม็ดเลือดของดักแด้หนอนกอข้าว *Chilo suppressalis* และพบว่ากลุ่มเซลล์เริ่มแรกมีเซลล์ลักษณะแตกต่างกันประมาณ 7 ชนิด หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ มีเพียงเซลล์เม็ดเลือด 2 ชนิด เท่านั้น คือ โปรฮีโมไซต์ (prohemocytes) และพลาสมาโตไซต์ (plasmatocytes) ที่สามารถยึดเกาะภาชนะเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังรายงานว่าการเลี้ยงเซลล์เริ่มแรกที่ได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานถึง 12 เดือน Chao and Ball (1971) ได้ทำการศึกษาในลักษณะเช่นเดียวกันนี้โดยใช้แมลงชนิด *Samia cynthia* และได้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน Keddie et al. (1995) ได้สร้างเซลล์ไลน์ 3 ชนิด คือ UA Md-203 UA Md-210 และ UA Md-221 ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของ *Malacosoma disstria* เป็นหนอนที่พบในอเมริกาเหนือ ทำลายต้นโอ๊ค และต้นยี่ห่วย

### 2.2.3 ตัวอ่อน (embryo)

Miltenburger et al. (1984) สร้างเซลล์ไลน์จากตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryos) ของแมลง *Cydia pomonella* โดยใช้ระยะไข่ที่มีอายุประมาณ 2 – 3 วัน จำนวน 200 ฟอง เป็นกลุ่มเซลล์เริ่มแรก และพบว่ามี 32 การเพาะเลี้ยงจากทั้งหมด 35 การเพาะเลี้ยงที่เจริญดีจนทำการถ่ายเซลล์ (subculture) และทำการทดลองถ่ายเซลล์หลายวิธี ได้แก่ การเขย่า (shaking) การใช้ปิเปต (pipetting) การขูด (scraping) และการใช้เอนไซม์ย่อยให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง พบว่าการถ่ายเซลล์โดยวิธีที่ต่างกันมีผลต่อรูปร่างของเซลล์ในพาสเสจต่อไป เช่นการถ่ายเซลล์โดยวิธีการขูดเซลล์ทำให้เซลล์ชนิดคล้ายเส้นใย (fibroblast-like) หายไป

Lee and Hou (1992) พัฒนาเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักในได้ห้วนได้สำเร็จ และเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักที่ได้มีชื่อว่า PX-1187 โดยเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ อายุ 2 วัน และใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ปรับปรุงมาจากสูตรของ Hink ประกอบด้วยอาหารชนิด Grace ปริมาตร 75 มิลลิลิตร เสริมด้วยแลคทาบูมินไฮโดรไลเซต (lactalbumin hydrolysate) 0.3 กรัม ทีซี ยีสต์โทเลต (TC- yeastolat) 0.3 กรัม ไข่ที่กรองแล้วปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซีรัม (Fetal bovine serum) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยเพนิซิลลินจี (penicillin G) สเตรปโตมัยซิน เอส (streptomycin S) และนิสเตติน (nystatin) ใส่ลงในอาหาร ปริมาตร 100 มิลลิเมตร ปรับค่า pH ของอาหารเท่ากับ 6.4

## 2.2.4 เนื้อเยื่ออื่น ๆ

Lynn *et al.* (1982) ประสบความสำเร็จในการสร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อปีกของหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* (IAL-TND1) เป็นครั้งแรก ต่อมา Lynn and Oberlander (1983) ทำการศึกษาและสร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อปีกของแมลงชนิด *Spodoptera frugiperda* (IAL-SFD1) และ *Plodia interpunctella* (IAL-PID1) ได้สำเร็จเช่นกัน

นอกจากนี้ Mitsuhashi (1981 and 1983) สามารถสร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อไขมัน (fat body) ของแมลงหนอนกระทู้กะหล่ำชนิด *Mamestra brassicae* และหนอนกระทู้ชนิด *lucania separata* ต่อมา Inoue and Mitsuhashi (1985) ได้ทำการคัดแยกเซลล์ไลน์ที่สร้างจากหนอนกระทู้กะหล่ำได้ถึง 5 ชนิด ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทดลอง

## 2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีส่วนประกอบหลัก คือ กรดอะมิโน (Amino acid) กรดอินทรีย์ (organic acid) เกลือ (salts) น้ำตาล (sugars) วิตามิน (vitamin) และธาตุอาหารรอง (trace element) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีค่า pH ประมาณ 6.2-6.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงไม่จำเป็นต้องใช้ CO<sub>2</sub> ปัจจุบันอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ทำการค้ามีทั้งรูปแบบอาหารเหลวและเป็นผง อาหารเลี้ยงเซลล์แบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. อาหารที่เติมซีรัม ได้แก่ อาหารชนิด Grace, TC100, TNM-FH และ IPL-41 ซีรัมที่นิยมใช้คือ Fetal bovine serum ประโยชน์ของซีรัมต่อเซลล์คือ ช่วยให้เซลล์ยึดเกาะผิวภาชนะดีขึ้น เป็นตัวพาฮอร์โมน ไขมัน และเกลือแร่ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยไขมันและธาตุอาหารรอง ที่จำเป็นต่อเซลล์ (Hink and Ignoffo. 1970 ; Grace. 1973)

2. อาหารที่ไม่เติมซีรัม เป็นการพัฒนามาจากอาหารที่ต้องเติมซีรัม หรือเติมซีรัมเพียงเล็กน้อย หรือไม่ต้องเติมซีรัมเลย เช่น Ex-Cell 400 Ex-Cell 401 และ Sf 900 เป็นต้น (สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสามารถกระทำได้ 2 แบบ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) และการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบบแขวนลอย (suspension culture) โดยใช้ภาชนะเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน กรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเป็นขวดแก้วหรือขวดพลาสติกก็ได้ แต่ต้องมีพื้นที่เพียงพอต่อการเจริญและการเกาะติดของเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ขวดเพาะเลี้ยงซึ่งมีพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตรและ 75 ตารางเซนติเมตร ปริมาตรของอาหารที่ใช้กับขวดเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4-6 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบบแขวนลอยในปริมาณที่ไม่มากนัก เช่น 50-500 มิลลิลิตรนั้นส่วนใหญ่ใช้ขวดแก้วรูปชมพู โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ปรับความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 135-150 รอบต่อนาที นอกจากนี้นิยมเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยใช้ขวดแก้วที่มีใบพายพร้อมแท่งแม่เหล็ก เรียกขวดเพาะเลี้ยงชนิดนี้ว่า spinner flask ซึ่งต้องใช้ควบคู่กับเครื่องกวนสารที่ควบคุมความเร็วรอบได้ (stirring platform) สำหรับความเร็วรอบที่ใช้กับ spinner flask เท่ากับ 90-100 รอบต่อนาที ซึ่งในแต่ละสถานะจะต้องทำการควบคุมปัจจัยให้เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์แมลงแต่ละชนิด เซลล์ไถนของแมลงในกลุ่มผีเสื้อต้องเพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์แมลง เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไถน *Papilio xuthus* (NIAS-AeA1) เท่ากับ 25-30 องศาเซลเซียส (Mitsuhashi, 1982) เซลล์ไถน *Spodoptera frugiperda* (IPLB 21 และ IPLB -1254) ใช้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสในการเพาะเลี้ยง (Vaughn, 1976) เซลล์ไถน *Spodoptera exigua* (Se3FH) ใช้อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสในการเพาะเลี้ยง (Hera et al. 1976) จากการรายงานของ Hink and Strauss (1976) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แมลงในกลุ่มผีเสื้อเท่ากับ 28-30 องศาเซลเซียส สำหรับค่า pH และค่า osmolarity ของอาหารเพาะเลี้ยงมีผลน้อยมากต่อการอยู่รอดของเซลล์และการจำลองตัวของไวรัสโรคแมลง แต่ค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญต่อการเจริญของเซลล์แมลงจะอยู่ในช่วง pH 6.0-6.7 และค่า osmolarity เท่ากับ 290-360 mOsm/kg (Goodman and McIntosh, 1994) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเซลล์แมลงแต่ละชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ไถน *Spodoptera frugiperda* ต้องปรับค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.2 และค่า osmolarity เท่ากับ 350 mOsm/kg (O'Reilly et al. 1992) ส่วน Lee and Hua (1992) เพาะเลี้ยงเซลล์ไถนของหนอนใยผัก *Plutella xylostella* ชนิด PX-1187 ในอาหารที่ปรับค่า pH เท่ากับ 6.4 จึงจะเจริญได้ดี

## 2.5 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์

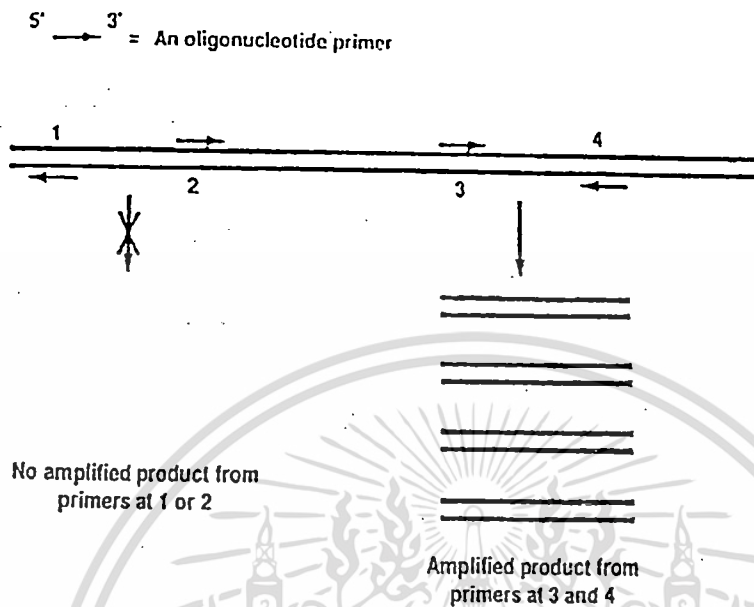
วิธีที่ใช้ในการตรวจสอบชนิดของเซลล์ไลน์ทำได้หลายวิธี เช่น

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ไลน์ (Morphology) รูปร่างของเซลล์จะขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของเซลล์ วัสดุที่เซลล์ยึดเกาะ ระยะการเจริญของเซลล์ และอาหารเลี้ยงเซลล์

2. การวิเคราะห์จำนวนขนาดและรูปร่างของโครโมโซม (Karyotype) McKenna *et al.* (1998) กล่าวว่า การจำแนกเซลล์ไลน์ของแมลง โดยการตรวจนับจำนวนโครโมโซมนั้นทำให้เกิดการสับสนได้ง่ายเนื่องจากเซลล์ไลน์ชนิดเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน

3. การวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ (Isoenzyme analysis) เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเป็นผลจากการทำงานของยีนโดยวิธีการสังเคราะห์โปรตีน เอนไซม์มีความจำเพาะของสับสเตรทเหมือนกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน เรียกว่า ไอโซไซม์ (isozyme) เอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งลำดับอะมิโนจะถูกกำหนดโดยตรงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน เอนไซม์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันในองค์ประกอบกรดอะมิโน ประจุสุทธิไม่เหมือนกัน รวมทั้งขนาดและรูปร่างของโมเลกุลต่างกัน เมื่อนำมาแยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสในสนามไฟฟ้าบนสารตัวกลางเป็นเจล เอนไซม์จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วในอัตราที่แตกต่างกัน เมื่อย้อมสีเจล เอนไซม์ที่ค้างอยู่บนเจลจะทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรท แล้ววัดตะกอนมองเห็นเป็นแถบ (band) ขึ้นเป็นรูปแบบเฉพาะเรียกว่า “ไซโมแกรม” (Zymogram) หรือรูปแบบแถบเอนไซม์ (isozyme banding pattern) จากรายงานของ Tabachnick and Knudson (1980) เกี่ยวกับรูปแบบแถบเอนไซม์ของเซลล์ไลน์ต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน แต่รูปแบบแถบเอนไซม์ของเซลล์ไลน์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อต่างชนิดของแมลงชนิดเดียวกันจะเหมือนกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้ตรวจสอบเซลล์ไลน์ของแมลงได้อย่างถูกต้องและให้ผลเด่นชัด

4. Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายให้ได้ปริมาณมากขึ้นเป็นหลายเท่าในเวลาไม่นาน โดยใช้เอนไซม์ DNA Polymerase สร้างดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจากดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อนำมาสังเคราะห์ 30-40 รอบ การประยุกต์เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว เรียกว่า Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) ไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดสั้นประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ โดยไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย เป้าหมายของการเกาะของไพรเมอร์เป็นแบบสุ่ม โดยไพรเมอร์จะเกาะบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น ในจีโนมอาจมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะในบริเวณที่ห่างไกลกันมาก ๆ หลังจากทำ PCR จะไม่เกิดผลผลิต แต่ถ้าเกาะในบริเวณใกล้กันและทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตขึ้นหลังจากทำ PCR (รูปที่ 2.2)



## รูปที่ 2.2 การวิเคราะห์ RAPD

ที่มา : สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล (2543)

ปัจจุบันเทคนิค RAPD-PCR นิยมใช้ในการตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตกันอย่างแพร่หลาย Lery *et al.* (2003) ได้จำแนกเซลล์ไลน์ 11 ชนิด โดยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) และใช้ไพรเมอร์ 6 ชนิด จำแนกแมลงใน Order Lepidoptera 6 ชนิด Order Diptera 1 ชนิด และ Order Coleoptera 4 ชนิด แต่เซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิดนี้เป็นเซลล์ไลน์สปีชีส์เดียวกันคือ *Leptinotarsa decemlineata* จากการทดลองพบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์แมลงต่าง Order หรือ Genus เดียวกันแต่ต่าง Species กัน เช่น *Spodoptera littoralis* และ *S. frugiperda* พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอแตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่ถ้าเซลล์ไลน์จากแมลงชนิดเดียวกัน เช่น *Phytorimaea operculella* 2 เซลล์ไลน์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้มีความแตกต่างกันน้อยมาก

McIntosh *et al.* (1996) ได้จำแนกเซลล์ไลน์ 20 เซลล์ไลน์ จากแมลงใน order Lepidoptera Diptera Coleoptera และ Homoptera ด้วยวิธี DNA amplification fingerprinting (DAF) ใช้ไพรเมอร์ที่ไม่เจาะจง ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ เหมือนกันในเซลล์ไลน์ชนิดเดียวกันแม้จะมีพาสเสจที่น้อยหรือมากขึ้นลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ก็คงที่

## 2.6 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus)

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus หรือ nuclear polyhedrosis virus, NPV) เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในแมลง มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายระยะหนอน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง หนอนผีเสื้อใน Order Lepidoptera (Murphy *et al.* 1995) จึงนำไปใช้เป็นสารชีวภาพฆ่าแมลงที่ไม่ทำให้เกิดมลภาวะในสภาพแวดล้อม มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และสัตว์ เนื่องจากไวรัส NPV มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงอาศัย

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสอยู่ใน Family Baculoviridae สามารถสร้างอนุภาคได้ 2 แบบ คือ อนุภาคไวรัสอิสระ (budded virus, BV หรือ extracellular virus, ECV) และอนุภาคไวรัสที่อยู่ในเปลือกโปรตีน (polyhedra-derived virus, PDV หรือ occluded virus, OV) (Vialard *et al.* 1995) เปลือกโปรตีนของไวรัสมีรูปร่างหลายเหลี่ยมเรียกว่า โพลีฮีโดร (polyhedra) มีขนาดประมาณ 0.5-15 ไมโครเมตร มีโปรตีนโพลีฮีโดริน (polyhedrin) เป็นองค์ประกอบหลัก ภายในเปลือกโปรตีนมีอนุภาคไวรัส (virion) จำนวนมากบรรจุอยู่ (Adoms and McClintock. 1991) เมื่อพิจารณาตามลักษณะของอนุภาคไวรัสที่อยู่ในโพลีฮีโดร สามารถแบ่งนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (Adoms and McClintock. 1991 ; Murphy *et al.* 1995)

- Single-embedded nucleopolyhedrovirus (SNPV) คือไวรัส (virion) ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิดเพียงอนุภาคเดียวเท่านั้น กระจุกกระจายอยู่ในเปลือกโปรตีนหรือโพลีฮีโดร ได้แก่ *Helicoverpa armigera* SNPV (HaSNPV), *Helicoverpa zea* SNPV (HzSNPV), *Orgyia pseudosugata* SNPV (OpSNPV) และ *Trichoplusia ni* SNPV (TnSNPV) เป็นต้น

- Multiple-embedded nucleopolyhedrovirus (MNPV) คือไวรัส (virion) ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปซิดตั้งแต่ 2 อนุภาคขึ้นไป ขนาดของไวรัสขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคของนิวคลีโอแคปซิด ได้แก่ *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (GmMNPV), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeMNPV), *Orgyia pseudosugata* MNPV (OpMNPV), *Spodoptera frugiperda* MNPV (SfMNPV) และ *Trichoplusia ni* MNPV (TnMNPV) เป็นต้น

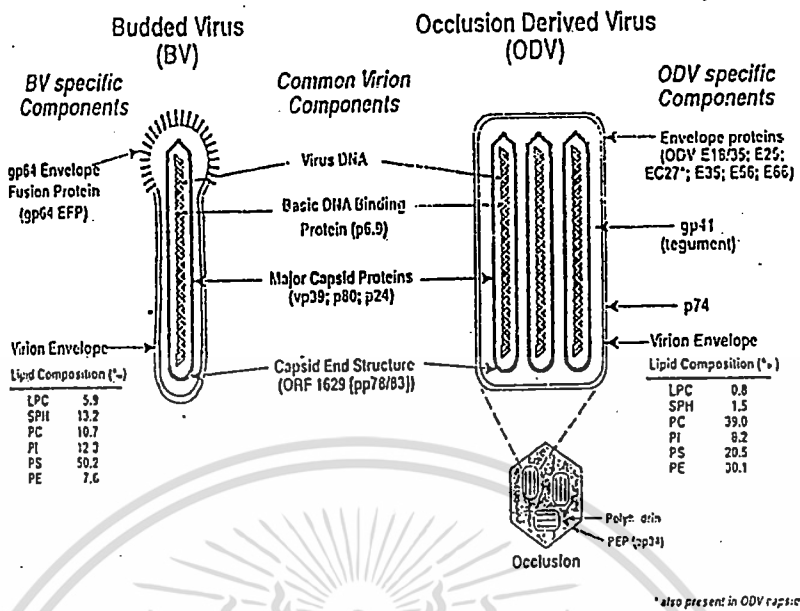
### 2.6.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสคืออนุภาคของไวรัสหรือนิวคลีโอแคปซิด (nucleocapsid) มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod-shaped) ขนาดความยาวประมาณ 200-400 นาโนเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร (Harrap. 1972b) โครงสร้างของนิวคลีโอแคปซิดประกอบด้วย 2 ส่วน คือ แคปซิด (capsid) และ ส่วนที่เป็นโปรตีนเรียกว่าโปรตีนคอร์ (core) มีโปรตีนที่สำคัญคือ protamine-like protein หรือ p6.9 (basic protein หรือ core protein หรือ vp12)

(Tweeten *et al.* 1980 ; Wilson *et al.* 1987) ภายในส่วนของโปรตีนคอร์ประกอบด้วยจีโนมของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัสกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ (double-stranded DNA) รูปร่างของกรดนิวคลีอิกอาจเป็นแบบเส้นตรง (linear) หรือเป็นวงขดไปมา (covalently closed) หรือเป็นวงกลม (circular) (Summer and Anderson. 1972) มีน้ำหนักโมเลกุล  $50-150 \times 10^6$  ดาลตัน (Burgess. 1977 ; Smith and Summer. 1978) สายดีเอ็นเอยาวประมาณ 75-225 kbp. (Smith and Summer. 1978 ; Huang *et al.* 1982)

นิวคลีโอโพลีอีโคโนไวรัสมีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากไวรัสชนิดอื่นที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ คือนิวคลีโอโพลีอีโคโนไวรัสมีอนุภาคไวรัส 2 แบบ (ดังรูปที่ 2.3) (Volkman. 1986) รูปแบบแรกคืออนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในพอลิโพรตีน (polyhedra-derived virus, PDV หรือ occluded-derived virus, ODV) ไวรัสรูปแบบนี้จะพบอยู่ภายในพอลิโพรตีนและเป็นที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรกระหว่างประชากรแมลง รูปแบบที่สองคืออนุภาคไวรัสอิสระ (budded virus, BV หรือ extracellular virus, ECV) เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบต่างๆ ที่เกิดการติดเชื้อภายในตัวแมลงและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง นิวคลีโอแคปซิดของ ODV และ BV มีองค์ประกอบทางเคมีและพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมาก เนื่องจากถูกสร้างขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อมีเหมือนกัน (Cochran *et al.* 1986 ; Volkman. 1986) แต่สำหรับ envelope ซึ่งเป็นส่วนที่ห่อหุ้มนิวคลีโอแคปซิดจะมีความแตกต่างกัน โดยที่ BV จะมี envelope ที่ได้มาจากพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ที่ติดเชื้อมาก่อนที่จะเคลื่อนที่ออกสู่ extracellular fluids ที่ส่วนปลายของ envelope มีส่วนยื่นออกมาเรียกว่า peplomers ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนที่ถอดรหัสจากยีน gp64 และพบเฉพาะใน BV เท่านั้น สำหรับ envelope ของ OV นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดว่าถูกสร้างขึ้นจากส่วนใด จึงเรียกส่วนนี้ว่า *de novo* (Stoltz *et al.* 1973)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีดีโครไวรัสรูปแบบไวรัสอิสระ (budded virus, BV) และรูปแบบไวรัสที่อยู่ภายในเปลือกโปรตีน (occlusion derived virus, ODV) ที่มา : Cochran *et al.* (1986)

2.6.2 การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีดีโครไวรัสในแมลง

ในธรรมชาติจะมีเปลือกโปรตีนไวรัส NPV ปะปนอยู่ เนื่องจากแมลงที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ตายไปมีการย่อยสลายเปลือกโปรตีนไวรัสจึงถูกปลดปล่อยออกมา เมื่อแมลงกินใบไม้ที่มีการปนเปื้อนเปลือกโปรตีนไวรัสเข้าไปในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง (midgut) ที่มีสภาพเป็นด่างสูงมาก (pH 9.5-11.5) เปลือกโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร ทำให้อนุภาคไวรัสหลุดออกมาจากเปลือกโปรตีน (Harrap and Longworth, 1974) จากนั้นจะเข้าสู่เซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut epithelial cell) โดยการรวมตัว (fusion) ระหว่างผนัง envelope กับเยื่อหุ้มเซลล์ (Summer, 1971 ; Granados, 1978) ดังนั้นเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลางจึงเป็นเซลล์แรกที่เกิดการติดเชื้อไวรัส และมีการจำลองดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ในนิวเคลียส ไวรัสที่สร้างขึ้นใหม่ในนิวเคลียสเป็นอนุภาคไวรัสอิสระที่แพร่กระจายไปสู่เซลล์อื่น ๆ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ภายในตัวแมลง โดยเข้าไปในระบบเลือดผ่านทางแอ่งเลือด (hemocoel) เพื่อไปทำลายเซลล์เม็ดเลือด เซลล์กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน เซลล์รอบท่ออากาศและผนังลำตัว เป็นต้น อนุภาคไวรัสอิสระที่สร้างขึ้นใหม่ภายในนิวเคลียสจะถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกโปรตีนที่สร้างขึ้นมาจากภายหลัง เมื่อมีปริมาณมากและอัดแน่นในนิวเคลียสจะทำให้เซลล์บวมโต และแตกออก ในที่สุดหนอนจะตาย เมื่อตัวหนอนตายผนังลำตัวจะแตกง่ายและเปลี่ยนเป็นสีดำอย่างรวดเร็ว การที่ผนังลำตัวของตัวหนอนเปลี่ยนเป็นสีดำเกิดจากการ

ทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase) เมื่อผนังลำตัวแตกจะปล่อยอวัยวะที่ถูกทำลาย เหลวและ แต่มีฟลิกโปรตีนไวรัสที่อยู่ภายในตัวแมลงกระจายออกสู่สิ่งแวดล้อม และเพิ่มจำนวนในแมลงตัวใหม่ที่กินฟลิกนี้เข้าไป (Hughes and Wood. 1981 ; O' Reilly *et al.* 1992)

ลักษณะของหนอนแมลงที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสจะแสดงอาการภายใน 4-7 วัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม อากาศร้อนและความชื้นสูงทำให้หนอนตายเร็วขึ้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) ระยะนี้ตัวหนอนจะยังกินอาหารได้ หลังจากนั้นตัวหนอนจะมีอาการเซื่องซึมและหยุดกินอาหาร สีลำตัวจะจางลง ผนังลำตัวเป็นมันเยิ้ม บางครั้งเป็นจ้ำสีเหลืองหรือสีขาวขุ่น ตัวหนอนจะหดสั้นบวมขึ้นเห็นข้อปล้องชัดเจน เนื่องจากฟลิกโปรตีนที่มีอยู่ภายใต้ผนังลำตัว ในระยะสุดท้ายก่อนหนอนจะตายมักจะพยายามไต่ขึ้นส่วนยอดของลำต้นพืช โดยใช้ขาเทียม 1 คู่ เกาะต้นไม้เอาไว้ ห้อยหัวและส่วนท้องลงเป็นรูปตัววีหัวกลับ

### 2.6.3 การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง

กระบวนการของการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ early phase, late phase และ very late phase โดยในระยะที่หนึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเตรียมเซลล์เพื่อให้พร้อมสำหรับการจำลองตัวของไวรัส ระยะที่สองจะเป็นการสร้างอนุภาคไวรัส (budded virus, BV) และระยะที่สามจะเป็นการสร้างฟลิกไวรัส (occluded virus, OV)

ระยะ **Early phase** การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสภายในเซลล์เพาะเลี้ยงแมลง ต้องใช้ extracellular virus (ECV) เป็นก๊อปปี้เชื้อ (inoculum) ซึ่งได้จาก infectious hemolymph และ infectious medium การติดเชื้อจะเกิดขึ้นทันทีที่อนุภาคไวรัสเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธี adsorptive endocytosis โดยใช้โครงสร้าง peplomer จับกับ receptor บนเยื่อหุ้มเซลล์ (Volkman. 1986) เยื่อหุ้มเซลล์จะเว้าลง กลายเป็นถุง endosome ที่มีอนุภาคไวรัสอยู่ภายใน เกิดการ acidification เวลาต่อมาทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างใน endosome ลดลง กระตุ้นให้เกิดการรวมตัวกันระหว่าง viral envelope กับ endosomal membrane และปล่อยให้ส่วนของนิวคลีโอแคปซิดเข้าสู่เซลล์ ที่ envelope ไว้ภายนอก โดยนิวคลีโอแคปซิดจะเคลื่อนที่ผ่านไซโทพลาสซึมไปยังนิวเคลียสผ่านทาง nuclear pore (Granados and Williams. 1986) ส่วนของคอร์โปรตีนจะหลุดออกมาจากส่วนปลายของแคปซิดเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ nucleocapsid - associated kinase ซึ่งจะทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตใน basic protein หรือ p6.9 (Wilson and Consigli. 1986) ส่งผลให้โปรตีนที่มีแรงยึดเหนี่ยวกับดีเอ็นเอต่ำลง ทำให้เกิดการคลายตัวและการรั่วของดีเอ็นเอออกจากโปรตีนคอร์ ภายหลังจากการปลุกเชื้อไวรัสลงในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงสามารถพบส่วนของดีเอ็นเอของไวรัสได้ภายใน 30 นาที ทำให้ทราบว่าดีเอ็นเอของไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเริ่มต้นกระบวนการจำลองตัวเองในระยะเวลานี้ (Chisholm and Henner. 1988)

การติดเชื้อของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกนี้จัดเป็นระยะ early phase โดยในระยะนี้จะมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างภายในเซลล์ขึ้นใหม่ก่อนที่จะมีการจำลองตัวของไวรัสเกิดขึ้น ในระยะนี้จะพบโครมาตินกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียสของเซลล์ซึ่งจะมีขนาดใหญ่ขึ้น การเปลี่ยนแปลงในส่วนของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสนี้จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อการจำลองตัวเองของไวรัส (Charlton and Volkman. 1991)

ระยะ Late phase ระยะนี้จะมีการจำลองตัวเองของไวรัสต่อจากระยะ early phase เป็นช่วงที่มีการแสดงออกของยีน late (late gene) และเป็นระยะที่มีการสร้างอนุภาคไวรัส (BV) ระยะ late phase นี้จะเกิดในช่วง 6-24 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ในระหว่างชั่วโมงที่ 12-24 ภายหลังการติดเชื้อจะมีการสร้างอนุภาคไวรัส (BV) สูงสุด แต่หลังจากช่วงนี้ไปแล้วสร้างอนุภาคไวรัส (BV) จะลดลง (Knudson and Harrap. 1976) ในระยะ late phase นี้จะเกิดโครงสร้างที่เป็นจุดที่มีการรวมตัวกันของอิเล็กตรอน (electron-dense structure) หรือที่เรียกว่า virogenic stroma ภายในนิวเคลียส (Harrap. 1972b ; Kelly. 1981) โดยจะมีการสร้างแคปซิดขึ้นที่ส่วนปลายของ virogenic stroma จากนั้นจะเกิดการรวมกันของคอร์กับแคปซิดเกิดเป็นนิวคลีโอแคปซิด (Fraser. 1986) ต่อมานิวคลีโอแคปซิดก็จะเคลื่อนออกจากนิวเคลียสผ่านไซโตพลาสซึมไปยัง cytoplasmic membrane และเกิดการรวมตัวกันกับเมมเบรนทำให้ไวรัสมี envelope ที่มีโครงสร้างเฉพาะตัว (Raghow and Grace. 1974)

ระยะ Very late phase หรือ occlusion- specific phase จะเริ่มต้นชั่วโมงที่ 20 ภายหลังการติดเชื้อ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า ในระยะนี้จะมีการสร้างเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสขึ้น (Harrap. 1972b) สำหรับกลไกของการสร้างเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส หรือ de novo membrane นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ส่วนของนิวคลีโอแคปซิดจะไปรวมกับเมมเบรนดังกล่าวเพื่อพัฒนาเป็นอนุภาคไวรัส โดยนิวคลีโอแคปซิดอาจเรียงอยู่เดี่ยวๆ ใน envelope (SNPV) หรืออาจเรียงเป็นกลุ่มอยู่ใน envelope (MNPV) (Fraser. 1986) ในขั้นตอนนี้การห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วย envelope นี้เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับความคงตัวของผลึกโปรตีนไวรัสด้วย ความสำคัญอีกประการหนึ่งของระยะนี้คือ เป็นระยะที่มีการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสจำนวนมากขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลง จนกระทั่งในช่วงสุดท้ายของการติดเชื้อจะพบว่าภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลงจะมีผลึกโปรตีนไวรัส (polyhedra) บรรจุอยู่ในจำนวนมาก

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการสร้างเซลล์ไลน์ของแมลงชนิดต่าง ๆ และทำการทดสอบการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีดรไวรัสเป็นผลสำเร็จ ดังนี้

Keddie *et al.* (1995) ได้สร้างเซลล์ไลน์ 3 ชนิด คือ UA Md-203 UA Md-210 และ UA Md-221 ที่พัฒนามาจากเซลล์เม็ดเลือดของ *Malacosoma disstria* เป็นหนอนที่พบในอเมริกาเหนือ ทำลายต้นโอ๊ค ต้นยี่งอ และเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดนี้สามารถเพิ่มปริมาณไวรัส AcMNPV และ MdMNPV-A92 ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang *et al.* (1996) ประสบความสำเร็จการสร้างเซลล์ไลน์จากรังไข่ของดักแด้ *Perina nuda* (Lepidoptera : Lymantriidae) โดยตั้งชื่อ NTU-PN-HH ในอาหาร TNM-FH ที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เซลล์ไลน์ที่ได้มี 4 ลักษณะคือ polymorphic cells เซลล์รูปร่างกลม (round cells) เซลล์รูปสี่เหลี่ยม (squamous) และ เซลล์รูปกระสวย (spindle shape cells) ตลอดระยะเวลา 4 ปีได้มีการเพิ่มปริมาณมากกว่า 300 พาสเสจ และ เซลล์ไลน์นี้สามารถเพิ่มปริมาณไวรัส *Perina nuda* multiple nucleopolyhedrovirus (*PnMNPV*)

Shin *et al.* (1997) สร้างเซลล์ไลน์ IBL-SLO1A จากรังไข่ของดักแด้หนอนกระทู้ ผัก *Spodoptera litura* ในอาหาร TNM-FH ที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และเซลล์ไลน์นี้สามารถเพิ่มปริมาณไวรัส *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (*SNPV*)

Sudeep *et al.* (2002) สร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* ตั้งชื่อว่า NIV-HA-197 ในอาหาร TNM-FH ที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ไลน์พาสเสจที่ 20 จะมีรูปแบบเป็นเซลล์บุผิว (epithelial-like cell) 70 เปอร์เซ็นต์ เซลล์คล้ายเส้นใย (fibroblast like) 27 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ขนาดใหญ่ (multinucleate giant) 3 เปอร์เซ็นต์ จำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 45-185 สามารถเพิ่มปริมาณไวรัส *AcMNPV* *SNPV* และ *HaSNPV* สามารถติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

สาโรช เจริญศักดิ์ (2546) สร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hubner) ตั้งชื่อว่า KMITL-HA-E1 ในอาหารชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ค่า pH ของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.2 และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส กลุ่มเซลล์เริ่มแรกประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่าง 4 แบบ คือ fibroblast - like cells, epithelial- like cells, myoblast- like cells และ companion cells พบว่าพาสเสจที่ 2 ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่าง 2 แบบ คือ fibroblast - like cells และ epithelial- like cells เซลล์ไลน์นี้มีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงชนิด *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*EsCPV*), *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (*AcMNPV*) และ *Galleria mellonella* multiple nucleopolyhedrovirus (*GmMNPV*)

## 2.7 ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซิสไวรัส (Cytoplasmic polyhedrosis virus)

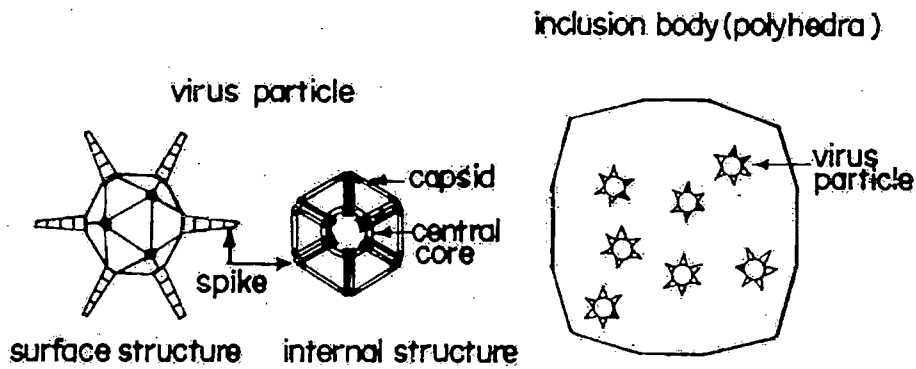
ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซิสไวรัส จัดอยู่ในวงศ์รีโอไวรัส (Family Reoviridae) เนื่องจากมีอนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลม 20 หน้า (icosahedral) และประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดอาร์เอ็นเอ สายคู่ (double-stranded RNA) แต่แตกต่างจากรีโอไวรัสชนิดอื่น ๆ ตรงลักษณะโครงสร้างของ

อนุภาคไวรัสและการสร้างผลึกโปรตีนในเซลล์ที่ถูกทำลาย ไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัสจะ สามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในไซโตพลาสซึมของเซลล์เท่านั้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

ไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัส สามารถพบและแยกเชื้อได้จากแมลงมากกว่า 250 ชนิด (Hukuhara and Bonomi. 1992) โดยพบใน Order Lepidoptera มากกว่า 200 ชนิด ที่ถูกทำลาย ด้วยไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าแมลงใน Order Diptera Neuroptera และ Hymenoptera (Hunter-Fujita *et al.* 1998) ไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัสไม่ทำให้แมลง ตายทันทีเมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงยังไม่มีการผลิตเชื้อนี้ออกเป็นการค้าเพื่อใช้ในการกำจัดแมลง (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

### 2.7.1 โครงสร้างของไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัส

ไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัส มีอนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 60-70 นาโนเมตร ประกอบด้วยด้านเท่าทั้งหมด 20 ด้าน (icosahedral หรือ isometric) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) เป็นท่อน ๆ 10 ท่อน แต่ละท่อนมี น้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $0.34-2.59 \times 10^6$  ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลรวมเฉลี่ย  $15 \times 10^6$  ดาลตัน กรดนิวคลีอิกมีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น เป็นวง หรือเป็นเส้นรูปเหลี่ยมด้านเท่าหลายด้าน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) แคปซิดเป็นโปรตีนหน่วยย่อย ๆ ประกอบกันขึ้นเป็นรูปทรงกลม อนุภาคของ ไซโตพลาสซึมโพลีดีโครซิสไวรัสจึงมีลักษณะเหมือนเปลือก (shell) 2 ชั้น ซ้อนกัน ชั้นในเป็น แกนกลาง (central core) ชั้นนอกเป็นแคปซิด (Hunter-Fujita *et al.* 1998) โครงสร้างผิวนอกของ อนุภาคไวรัสเป็นพื้นี่รูปสามเหลี่ยมด้านเท่าสี่สิบอันประกอบกันขึ้น และตรงยอด (vertice) ที่พื้น ที่รูปสามเหลี่ยม 5 อัน บรรจบกันจะเป็นพื้นี่รูปห้าเหลี่ยม ซึ่งมีโครงสร้างเป็นหนามแหลมยาว ประมาณ 17-20 นาโนเมตร ยื่นออกมาเรียกว่า spike หรือ projection ซึ่งมีทั้งหมด 12 อัน (Lewandowski and Traynor. 1972 ; Payne and Kalmakoff. 1974) หนามแหลมนี้ภายในกลวงและ มีกำเนิดยื่นออกมาจากแกนกลางจึงคล้ายสะพานเชื่อมระหว่างเปลือกทั้งสองชั้นของอนุภาคไวรัส (ดังรูปที่ 2.4)



## รูปที่ 2.4 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของไซโตพลาสตมิกโพลีอีโครซิสไวรัส

ที่มา : ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2539)

อนุภาคของไซโตพลาสตมิกโพลีอีโครซิสไวรัสไม่มีผนังล้อมรอบ อยู่เดี่ยว ๆ กระจุกกระจายในไซโตพลาสตมิกของเซลล์ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) ผลึกโปรตีนประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ชนิดเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000-31,000 คาลตัน โปรตีนโมเลกุลจะเรียงตัวกันแบบ dot pattern line pattern (Payne and Kalmakoff. 1974 ; Arella *et al.* 1988 ; Fossiez *et al.* 1989 ; Mori *et al.* 1989, 1993 ; Galinski *et al.* 1994) อนุภาคไวรัสอยู่ในผลึกโปรตีนแบบเดี่ยว ๆ ห่างกันประมาณ 50-100 นาโนเมตร มีจำนวนตั้งแต่ 1-10,000 อนุภาคต่อผลึก (Kobayashi. 1971) ผลึกโปรตีนของไซโตพลาสตมิกโพลีอีโครซิสไวรัสเมื่อเจริญเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 1-1.5 ไมครอน มีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น รูปหลายเหลี่ยมด้านเท่า รูปสี่เหลี่ยม รูปทรงกลม หรือรูปไข่ และไม่มีผนังล้อมรอบผลึกโปรตีน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

### 2.7.2 การติดเชื้อไซโตพลาสตมิกโพลีอีโครซิสไวรัสในแมลง

ไซโตพลาสตมิกโพลีอีโครซิสไวรัสจะทำลายเฉพาะเซลล์กระเพาะอาหารของแมลงและเพิ่มปริมาณในไซโตพลาสตมิกของเซลล์เท่านั้น ผลึกโปรตีนจะถูกย่อยสลายในท่ออาหาร และปล่อยอนุภาคไวรัสเข้าทำลายเซลล์รอบท่ออาหาร ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ในไซโตพลาสตมิกของเซลล์ถูกทำลาย (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) Kobayashi (1971) รายงานว่าอนุภาค viral core จะแทงผ่านเข้าไปในไซโตพลาสตมิกของเซลล์โดยอาศัยส่วนของ spike ซึ่งช่วงนี้ใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง อนุภาคไวรัสจะเข้าไปทวีจำนวนได้ภายในเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง rough endoplasmic reticulum เมื่อไวรัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เซลล์จะขยายใหญ่จนผนังเซลล์แตกปล่อยผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสออกมาในท่ออาหาร ซึ่งจะถูกขจัดออกมาด้วยการอาเจียนหรือถ่ายออกมาพร้อมของเสียอื่น ๆ ทางทวารหนัก Miyajima and Kawase (1968) กล่าวว่า เนื่องจากแมลงสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างเซลล์รอบท่ออาหารทดแทนขึ้นมาใหม่จากการ regenerative cell ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของแมลง จึงทำให้อาการของโรคอันเกิดจากไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสไม่รุนแรงมากนัก และกินเวลานานกว่าแมลงจะตาย

เนื่องจากไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสมีผลโดยตรงต่อระบบย่อยอาหารของแมลง จึงทำให้การเจริญเติบโตของแมลงผิดปกติ แมลงที่เป็นโรคจะมีขนาดเล็กกว่าปกติมาก กินอาหารน้อยลงจนหยุดกิน หยุดนิ่ง เชื่องช้า ตัวเหี่ยวยุ่ย สีซีดจาง วงจรชีวิตจะยาวขึ้น ไม่วางไข่หรือไข่ไม่ฟักเป็นตัว (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

Neilson (1965) ได้รายงานเกี่ยวกับผลของไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสในแมลง 4 ชนิด ได้แก่ *Alsophila pomataria* (Harris), *Nymphalis antiopa* (Linnaeus), *Oprophera brumata* (Linnaeus) และ *Paleacrita vernata* (Peck) พบว่าแมลงที่เป็นโรคอันเกิดจากไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสจะมีขนาดลำตัวที่เล็กลง ในระยะตัวหนอนจะสามารถพบผลึกไวรัสได้ที่ทางเดินกระเพาะอาหารส่วนกลาง นอกจากนี้ในแมลงชนิด *A. pomataria* และ *O. brumata* ตัวเต็มวัยเพศผู้จะมีลักษณะของปีกที่ผิดปกติ ส่วนในเพศเมียจะมีพัฒนาการของรังไข่ผิดปกติ และพบว่าไวรัสจะมีผลทำให้ความสามารถต่อการสืบพันธุ์ในตัวเต็มวัยของแมลงทั้ง 4 ชนิดลดลง

Smith and Rivers (1956) ศึกษาจากแมลง *Vanessa cardui* พบว่าไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสที่แยกได้สามารถจำลองตัวได้ในแมลง *Bupalus piniarius* และ *Oprophera brumata* ต่อมา Neilson (1964) ศึกษาพบว่าไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสดังกล่าวนี้สามารถจำลองตัวเองได้ในแมลง Order Lepidoptera 11 ชนิด และ Order Hymenoptera 2 ชนิด

Cunningham and Longworth (1968) สามารถแยกเชื้อไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสจากแมลง 7 ชนิด ได้แก่ *Aglais urticae*, *Nymphalis io*, *Vanessa cardui*, *Arctia caja*, *Porthetria dispar*, *Phalera bucephala* และ *Euproctis chrysorrhoea* ต่อมา Anagnou - Veroniki et al. (1997) สามารถแยกเชื้อไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสได้จากแมลง Olive fly, *Dacus oleae*

สำหรับอาการภายในที่พบในแมลงที่มีการติดเชื้อไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัส คือ ท่ออาหารของแมลงจะมีสีขาวครีมแทนที่จะเป็นท่อใส ๆ เมื่อเซลล์รอบท่ออาหารแตก ผลึกโปรตีนสีขาวจะไหลเข้าไปในท่ออาหารของแมลง ทำให้แมลงอาเจียนและถ่ายอยู่ตลอดเวลา อันเป็นการแพร่กระจายและถ่ายทอดเชื้อไปสู่แมลงตัวอื่น ๆ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539 ; Kobayashi. 1971)

### 2.7.3 การติดเชื้อไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง

ไซโตพลาสตมิกโพลีฮิโดรซิสไวรัสสามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการติดเชื้อได้ด้วยการนำผลึกไวรัสที่ได้จากกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงไปทำการย่อยด้วยสารละลายต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคไวรัสที่ถูกย่อยแล้วจะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการติดเชื้อ โดยอนุภาคไวรัสจะไปยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์และแทงเข้าสู่เซลล์โดย viropexis ภายใน 15 นาที หลังการติดเชื้อ (Belloncik. 1989) ต่อมาจะพบอนุภาคไวรัสเกิดขึ้นในเวคคิวโอลและ lysosomelike vesicle ภายหลังจากเกิดการติดเชื้อแล้ว 30 นาที รูปแบบของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจะเหมือนกับการติดเชื้อในตัวแมลง เซลล์ที่ติดเชื้อจะมีผลึกไวรัสจำนวนมากอยู่ที่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ ผลึกของอนุภาคไวรัสซึ่งมีลักษณะเหลี่ยมด้านเท่านี้จะเกิดขึ้นตอนปลายของการติดเชื้อ สำหรับไซโทพลาสติกพอลิโอโครซิสไวรัสบางสายพันธุ์รูปแบบของการสร้างผลึกอาจต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างจีโนมของอนุภาคไวรัสและสภาวะของเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมีอิทธิพลต่อรูปร่างของผลึกไวรัส (Belloncik and Mori. 1998)

ถึงแม้ว่าการติดเชื้อไซโทพลาสติกพอลิโอโครซิสไวรัสจะเกิดขึ้นที่ทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงเท่านั้น แต่ในเซลล์แมลงที่สร้างจากเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ต่างกันก็จะมี การตอบสนองต่อการติดเชื้อไซโทพลาสติกพอลิโอโครซิสไวรัสต่างกัน ในเซลล์เพาะเลี้ยง ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนั้นอาจพบว่าการติดเชื้อไซโทพลาสติกพอลิโอโครซิสไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ได้หากเชื้อไวรัสที่มีความรุนแรงอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งอาจจะใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะทำให้เซลล์แสดงอาการติดเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไวรัสมีความรุนแรงมากก็จะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดการติดเชื้อมีผลึกไวรัสจำนวนมากอยู่ภายใน และทำให้เซลล์แตกในที่สุด (Belloncik. 1996) แต่จะไม่พบว่าการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสจากเซลล์ที่ติดเชื้อสู่อาหารเพาะเลี้ยงได้ (Belloncik. 1996 ; Belloncik *et al.* 1996)

## 2.8 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หรือ *Bt* เป็นเชื้อแบคทีเรียพบในธรรมชาติ สามารถสร้างผลึกโปรตีน  $\delta$  - endotoxin ที่เป็นพิษต่อแมลงใน Order Lepidoptera Diptera และ Coleoptera (Höfte and Whitey. 1989) จึงนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อม

### 2.8.1 โครงสร้างของแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* หรือ *Bt* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อน ขนาดประมาณ 0.7 x 3.5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่โดยใช้เส้นหรือแฟลกเจลลา (flagellar) เส้นของ *Bt* ประกอบด้วยโปรตีน flagellin อาศัยคุณสมบัติของ H-flagellar antigen สามารถแบ่ง *Bt* ออกได้ถึง 50 serotype 63 derovars (Thiery and Frachom. 1997) *Bt* สามารถสร้างสปอร์ถ้าสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมโดยสร้างสปอร์อยู่ภายในเซลล์ ในขณะที่สร้างสปอร์ทำการสร้างผลึกโปรตีนที่มีสารพิษเคลือบด้านเอ็นโดท็อกซิน ( $\delta$  - endotoxin) ขนาดประมาณ 60 กิโลดาลตัน ซึ่งลักษณะผลึกโปรตีนนี้จะแตกต่างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเหมือนปิรามิด 2 อัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์อื่นใดโดยไม่ได้รับอนุญาตให้เผยแพร่เป็นการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกบกัน (bipyramidal shape) (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) (รูปที่ 2.5) ผลึกโปรตีนนี้ประกอบด้วย โมเลกุลของโปรตีนที่มีรูปร่างเป็นแบบ dumb-bell shape ขนาดยาวประมาณ 15 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 คาลตัน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539 ; อัจฉรา ตันติโชค. 2534) การสร้างผลึกโปรตีนนี้จะถูกกำกับโดยสารพันธุกรรม ดีเอ็นเอทำให้สารพิษ *Bt* มีความเป็นพิษต่อแมลงใน Order Lepidoptera Diptera และ Coleoptera ต่างกัน (Schnepf *et al.* 1998) Chilcott and Wigley (1993) ได้รายงานว่าปัจจุบันมีการจำแนกโปรตีนที่มีในผลึกโปรตีนของ *Bt* ออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความเป็นพิษต่อแมลงและลำดับยีนที่คล้ายคลึงกัน ได้แก่

กลุ่มที่ 1 โปรตีน CryI ประกอบด้วย 8 subclasses (A-H) เป็นผลึกรูปร่างปิระมิดคู่ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 130 – 140 กิโลคาลตัน เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงใน Order Lepidoptera

กลุ่มที่ 2 โปรตีน CryII (A, B และ C) เป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ประกอบด้วยโปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลคาลตัน มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงใน Order Lepidoptera และ Diptera

กลุ่มที่ 3 โปรตีน CryIII มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 72 - 75 กิโลคาลตัน มีความเป็นพิษเฉพาะตัวอ่อนแมลงใน Order Coleoptera เท่านั้น

กลุ่มที่ 4 โปรตีน Cry IV พบใน *Bt* ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ ประกอบด้วย 4 subclasses (CryIVA, B, C และ D) มีน้ำหนักโมเลกุล 135 128 74 และ 72 กิโลคาลตัน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 5 โปรตีน CryV มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงใน Order Lepidoptera และ Coleoptera

กลุ่มที่ 6 โปรตีน CytA และ B พบใน *Bt* ที่ฆ่าแมลงใน Order Diptera

ตารางที่ 2.1 แสดงยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่พบใน *Bacillus thuringiensis*  
สายพันธุ์ต่าง ๆ

ยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน	สายพันธุ์ของ <i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>cry IA(a)</i>	<i>kurstaki</i> HD-1, <i>aizawai sotto</i> , <i>entomocidus</i>
<i>cryIA(b)</i>	<i>berliner</i> 1715, <i>kurstaki</i> NRD -1 <i>aizawai</i> IC-1, <i>aizawai</i> IPL-7, <i>kurstaki</i> HD-1
<i>cryIA(c)</i>	<i>kurstaki</i> HD-73
<i>cryIB</i>	<i>thuringiensis</i> HD-2, , <i>entomocidus</i> HD-110
<i>cryIC</i>	<i>entomocidus</i> 601, <i>aizawai</i> HD-173, <i>entomocidus</i> HD-110
<i>cryIC(b)</i>	<i>galleriae</i>
<i>cryID</i>	<i>aizawai</i> HD- 68
<i>cryIE</i>	<i>kenyae</i>
<i>cryIF</i>	<i>aizawai</i> EG6346
<i>cryIIA</i>	<i>kurstaki</i> HD-263, <i>kurstaki</i> HD-1
<i>cryIIB</i>	<i>kurstaki</i> HD-1
<i>cryIIIA</i>	<i>san diego</i> , <i>tenebrionis</i> EG2158
<i>cryIIIB</i>	<i>pakistani</i> , <i>tolworthi</i>
<i>cryIIIC</i>	<i>kurstaki</i>
<i>cryIIID</i>	<i>kurstaki</i>
<i>cryIVA</i>	<i>israelensis</i>
<i>cryIVB</i>	<i>israelensis</i>
<i>cryIVC</i>	<i>israelensis</i>
<i>cryIVD</i>	<i>israelensis</i>
<i>cryV</i>	<i>kurstaki</i>
<i>crtA</i>	<i>israelensis</i> , <i>morrisoni</i> PG-14

ที่มา : Höfte and Whiteley (1989)

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติของชนิดยีนที่ควบคุมการสร้างผลึก โปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงของ  
*Bacillus thuringiensis*

Predicted			
Gene type <sup>a</sup>	molecular weight (kDa)	Host rang <sup>b</sup>	Examples of target insects
<i>CryIA(a)</i>	132.2	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Bombyx mori</i> , <i>Pieris brassicae</i> , <i>Plutella xylostella</i>
<i>CryIA(b)</i>	131	L	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Heliothis virescens</i>
<i>CryIA(c)</i>	130	L/D	<i>Pieris brassicae</i> , <i>Aedes aegypti</i>
	133.3	L	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Trichoplusia ni</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i> , <i>Pieris brassicae</i>
<i>CryIB</i>	138	L	<i>Pieris brassicae</i>
<i>CryIC</i>	134.8	L	<i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Spodoptera exigua</i> , <i>Pieris brassicae</i> , <i>Mamestra brassicae</i>
<i>CryID</i>	132.5	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera exigua</i>
<i>CryE</i>	130	L	<i>Manduca sexta</i> , <i>Spodoptera littoralis</i> , <i>Spodoptera exigua</i>
<i>CryF</i>	133.6	L	<i>Spodoptera exigua</i> , <i>Heliothis virescens</i> , <i>Ostrinia nubilalis</i>
<i>cryIIA</i>	70.9	L/D	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Lymantria dispar</i> , <i>Manduca sexta</i> <i>Aedes aegypti</i>
<i>cryIIB</i>	70.8	L	<i>Heliothis virescens</i> , <i>Lymantria dispar</i> , <i>Manduca sexta</i> <i>Trichoplusia ni</i>
<i>cryIIC</i>	69.5	L	<i>Lymantria dispar</i> , <i>Manduca sexta</i> , <i>Trichoplusia ni</i>
<i>cryIIIA</i>	73.1	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> , <i>Phaedon cochleariae</i>
<i>cryIIIB</i>	74.2	C	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>
<i>cryIVA</i>	134.4	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i> , <i>Culex pipiens</i>
<i>cryIVB</i>	127.8	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Anopheles stephensi</i>
<i>cryIVC</i>	77.8	D	<i>Aedes aegypti</i> ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

Gene type <sup>a</sup>	Predicted molecular weight (kDa)	Host rang <sup>b</sup>	Examples of target insects
<i>CryIVD</i>	72.4	D	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Culex pipiens</i>
<i>Cry VA</i>	81.2	L/C	<i>Diabrotica spp.</i> <i>Leptinotarsa decemlineata</i> <i>Ostrinia nubilalis</i>
<i>Cyt A</i>	27.2	non-specific	

<sup>a</sup> According to Höfte and Whiteley (1989)

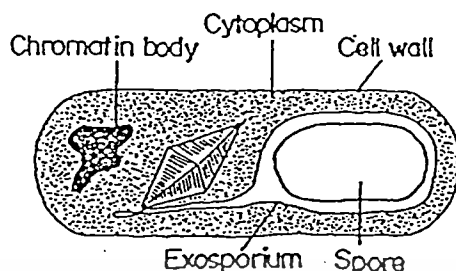
<sup>b</sup> L : Lepidoptera, D: Diptera และ C: Coleoptera

ที่มา : Lereclus *et al.* 1993

### 2.8.2 การติดเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ในแมลง

เมื่อแมลงกินผลึกโปรตีน *Bt* เข้าไปอยู่ในกระเพาะอาหารซึ่งมีความเป็นด่างค่อนข้างสูง ทำให้เกิดการย่อยผลึกโปรตีนโดยน้ำย่อย proteolytic ออกมาเป็นสารพิษที่แท้จริง สารพิษนี้จะไปอยู่ที่ผนังเซลล์กระเพาะอาหารและทำลายผนังเซลล์ให้เป็นแผล น้ำย่อยที่มีฤทธิ์เป็นด่างจะเข้าไปตามรอยแผลไปอยู่ที่ช่องว่างภายในลำตัว (hemocoel) ของแมลง ทำให้แมลงเกิดอาการชะงัก หยุดกินอาหาร สปอร์ที่แมลงกินเข้าไปจะไปขยายพันธุ์อยู่ที่ลำไส้และบางส่วนก็จะเข้าไปตามรอยแผลไปแบ่งตัวอยู่ตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในตัวแมลง และทำให้แมลงตายในที่สุด (อัจฉรา ตันติโชค. 2534)

Zhong *et al.* (2000) ศึกษาพิษของโปรตีน Cry 1 Ba 1 ต่อแมลงใน 3 Order ได้แก่ แมลงวัน *Musca domestica* (Order Diptera) ค้างคอง cottonwood leaf beetle *Chrysomela scripta* (Order Coleoptera) และหนอน tobacco hornworm *Manduca sexta* (Order Lepidoptera) พบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำให้แมลงตาย 50 เปอร์เซ็นต์คือ 0.02 0.15 และ 0.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังศึกษาพิษของโปรตีน YBT- 226 Cry1B1 ที่ความเข้มข้น 0.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ไลน่อนอนพีเซีย 2 ชนิด (*M. sexta*, CH1t และ *Choristoneura fumiferana*, CF1) และเซลล์ไลน่อนุง 2 ชนิด คือ *Aedes aegypti*, Aa(s) และ *Culex quinquefasciatus*, C<sub>2</sub> เลี้ยงในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0-5 ชั่วโมง พบว่าโปรตีน YBT-226 Cry1B1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน่อนอน CH1t โดย 3 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารพิษเซลล์ไลน่อนอนพีเซีย 51.2 เปอร์เซ็นต์ และมีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสารพิษผ่านไป 5 ชั่วโมง แต่เซลล์ไลน่อนุง CF1 Aa (s) และ C<sub>2</sub> เมื่อเวลาผ่านไป 5 ชั่วโมง มีชีวิตรอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องมาจากเซลล์ไลน่อนอนพีเซียที่นำมาใช้ทดสอบพัฒนามาจากเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่มีเนื้อเยื่อแตกต่างกันหลายชนิด แต่แมลงหรือหนอนที่นำมาทดสอบมีกระเพาะอาหารที่มีความเป็นด่างสูงจึงประสบความสำเร็จมากกว่าทดสอบกับเซลล์ไลน่อนอน



รูปที่ 2.5 โครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย *B. thuringiensis*  
ที่มา : ทิพย์วดี อรรถธรรม. (2539)

Mohan and Gujar (2001) ศึกษาสูตรการค้าของ *Bt* ที่มีผลต่อหนอนใยผักโดยการจุ่มสารพิษ *Bt*. ลงบนใบผักกะหล่ำปลี นำไปให้หนอนระยะ 2 กิน พบว่า *Bt* สายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีน Cry 1 *Ab* Cry1 และ Cry 2 (*Bt. kurstaki* HD-1 และ *Bt. aizawai* HD 137) มีความเป็นพิษต่อหนอนใยผักสูงกว่า *Bt.* สายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีน Cry 1 *Aa* อย่างเดียว หรือผลิต  $\delta$ -toxin เพียงชนิดเดียว *Bt kurstaki* สูตรการค้า Biobit<sup>®</sup> มีความเป็นพิษต่อหนอนใยผักสูงกว่า Dipel<sup>®</sup> Halt<sup>®</sup> และ HiL<sup>®</sup> 6.7 7.8 และ 13.5 เท่าตามลำดับ

สาโรช เจริญศักดิ์ (2546) ทดสอบสารพิษ *Bt* จากสูตรการค้า 3 สูตร คือ Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HPD<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่สร้างจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันพบว่าสารพิษ *Bt* ที่มีประสิทธิภาพสูงที่ทำให้เซลล์ไลน์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (TCTD<sub>50</sub>) คือสารพิษ *Bt* สูตรการค้า Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HPD<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> ปริมาณ 2.987 13.06 และ 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Baines *et al.* (1997) เปรียบเทียบความเป็นพิษของโปรตีน Cry 1A ต่อเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut epithelial cell) ของหนอนผีเสื้อ 3 ชนิดคือหนอน spruce budworm (SBW) ผีเสื้อ gypsy moth (GM) และหนอนไหม (SW) กับเซลล์ไลน์ 3 ชนิดคือ CF-1 SF-9 และ SE-1 พบว่าเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลางของหนอนผีเสื้อ SBW GM และ SW มีการตอบสนองต่อพิษของโปรตีน Cry 1A(a,b,c) เท่ากัน แต่เซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดไม่ตอบสนองต่อพิษของโปรตีน Cry 1A(a,b) แต่ตอบสนองต่อสารพิษโปรตีน Cry 1A(c) ปริมาณ 3.4 มิลลิกรัม สำหรับเซลล์ไลน์ SF-9 50.2 มิลลิกรัมสำหรับเซลล์ไลน์ SE-1 และ 5.9 มิลลิกรัมสำหรับเซลล์ไลน์ CF-1

## บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 แมลง ไวรัสโรคแมลง และแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

#### 3.1.1 ไข่ของหนอนใยผัก

การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกในการทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ของหนอนใยผัก ซึ่งไข่ของหนอนใยผักได้จากการเก็บตัวหนอนจากผัก แล้วนำมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกโดยให้กินใบคะน้า จนหนอนเข้าดักแด้ออกเป็นผีเสื้อให้กินน้ำหวาน ผีเสื้อตัวเมียจะวางไข่บนใบคะน้า นำไข่ที่มีตัวอ่อนของหนอนใยผักเป็นเนื้อเยื่อเริ่มแรก เพื่อสร้างเซลล์ไลน์หนอนใยผัก

3.1.2 ไวรัสโรคแมลงชนิดต่างๆ เช่น *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (*HaSNPV*), *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*AcMNPV*), *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (*GmMNPV*), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (*SeMNPV*), *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (*BmCPV*), *Euxoa scanndens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*EsCPV*), *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (*CfCPV*) และ *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus (*HaCPV*) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากคุณอุทัย เกตุนุติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และ Prof. Dr. Serge Belloncik

3.1.3 สารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) ซึ่งเป็นสูตรทางการค้า ได้แก่ Thuricide<sup>®</sup> (var. *kurstaki*) จาก Thermo Ecotek Corporation (Ontario, แคนาดา), Teknar-HDP<sup>®</sup> (var. *israelensis*) จาก Zoecon Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา), Trident<sup>®</sup> (var. *tenebrionis*) จาก Sandoz Agro Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Serge Belloncik

### 3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ตู้ปลอดเชื้อชนิดลมเป่า (laminar flow hood) จากบริษัท International Scientific Supply Co.Ltd., ประเทศไทย

3.2.2 ตู้บ่มเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator) จากบริษัท Sheldon Manufacturing, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 กล้องจุลทรรศน์ inverted light microscope (Diaphot ; phase-contrast objectives : 4, 10, 20, และ 40X; eyepieces : 10X, Nikon ; model Phase- contrast – 2ELWD) จากบริษัท Nikon, ประเทศญี่ปุ่น

3.2.4 กล้องจุลทรรศน์ light microscope (Diaphot ; objectives : 4, 10, 40, และ 100X; eyepieces : 10X, Olympus ; model UFX-DX) จากบริษัท Olympus Optical Co. Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

3.2.5 เครื่องนับเซลล์ (cell counter) จากบริษัท Gemmy Industrial Co.

3.2.6 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) จากบริษัท Boeco, ประเทศเยอรมัน

3.2.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) จากบริษัท Memmert, ประเทศเยอรมัน

3.2.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแบบใช้แรงดันไอน้ำ (autoclave, Tomy : model autoclave SS-325) จากบริษัท Tomy kogyo Co. Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

3.2.9 เครื่องอบชนิดลมร้อน (hot- air oven, Memmert : model 600) จากบริษัท Memmert, ประเทศเยอรมัน

3.2.10 ชุดกรองและแผ่นเมมเบรนขนาด 0.22 และ 0.45 ไมโครเมตร จากบริษัท Gelman Laboratory

3.2.11 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (centrifuge, HERMLE : model Z383K) จากบริษัท Electric Service Device Co. Ltd., ประเทศไทย

3.2.12 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากบริษัท กรุงไทยการไฟฟ้า จำกัด, ประเทศไทย

3.2.13 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากบริษัท Sanyo electric trading Co. Ltd.

3.2.14 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากบริษัท ซันโย ยูนิเวอร์เซิล อิเล็กทริก จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย

3.2.15 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, CyberScan : model pH2000) จากบริษัท Eutech Cybermetrics, ประเทศสิงคโปร์

3.2.16 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์พลาสติก ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร และ 75 ตารางเซนติเมตร จากบริษัท Gibthai Co. Ltd., ประเทศไทย

3.2.17 เครื่องดูดสารแบบอัตโนมัติ (automated pro pipet, Jencon : Powerpette plus) จากบริษัท Jencons Scientific Ltd., ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.18 หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร จากบริษัท Pyrex, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.19 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร จากบริษัท Schott, ประเทศเยอรมัน

3.2.20 จานหลุม 96 หลุม (96 well Tissue culture plate, Corning) จากบริษัท Corning Incorporated, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.21 ขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร จากบริษัท Schott, ประเทศเยอรมัน

3.2.22 ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ( Erlenmayer flask, DURAN) จากบริษัท Schott, ประเทศเยอรมัน

3.2.23 หลอดพลาสติกทนอุณหภูมิต่ำ (Cryovial) จากบริษัท Aktiengesellschaft & Co., ประเทศเยอรมัน

3.2.24 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ (water-purification equipment, FiSteqm Cyclon : model WSC901.PDC.5, WSC044.MH3.4 และ WSC900.RIB.9) จาก Jencons (Scientific) LTd.

3.2.25 เครื่องเขย่า (Orbital shaker, Germany ;model VRN-200) จากบริษัท Gramany Industrial Co., ใต้หวัน

3.2.26 โกร่งบดยา

3.2.27 ชุดอิเล็กทรอนิกส์ จากบริษัท Labnet International, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.28 เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (thermal cycle, Perkin Elmer Thermal Cycler 480) จากบริษัท Perkin Elmer Cetus Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.29 เครื่องฉายแสง UV จากบริษัท Advision of synopic Ltd. , ประเทศแคนาดา

3.2.30 เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) Scientific industries, Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา

## 3.2 สารเคมี

3.3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ (Grace' s) จากบริษัท Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.2 แลกทาลบูมิน ไฮโดรไลส (lactalbumin hydrolysate 50X) จากบริษัท Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.3 ยีสโตเลท(yeastolate 50X) จากบริษัท Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.4 เจนตามัยซิน (gentamycin) จากองค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย

3.3.5 ซีรัม (Fetal bovine serum, FBS) จากบริษัท Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.6 ทริปแฟนบลู (trypan blue) จากบริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.7 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodesyl sulphate) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน

3.3.8 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน

3.3.9 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) จากบริษัท Carlo Erba Reagenti

3.3.10 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) Baker Analyzed, ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.3.11 เอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ จาก องค์การสุรา กรมสรรพสามิต ประเทศไทย

3.3.12 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) จากบริษัท Amresco, ประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสาร 3.3.13 แอล-ซิสเทอีน (L- Cystein) จากบริษัท Fluka, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ ใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.14 เมทานอล (methanol) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.15 กรดอะซิติก (acetic acid) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.16 สารละลายโคลซีมิด (colcemid<sup>®</sup> solution) จากบริษัท Life technology, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.17 สี Giemsa จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.18 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) จากบริษัท Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.19 เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก แอซิก (EDTA) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.20 ฟีนอล (phenol) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.21 คลอโรฟอร์ม (chloroform) จากบริษัท J.T. baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.22 ไอโซอามิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) จากบริษัท J.T. baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.23 โพแทสเซียมอะซิเตต (potassium acetate) จากบริษัท J.T. baker, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- 3.3.24 โซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) จากบริษัท Merck, ประเทศเยอรมัน
- 3.3.25 เอนไซม์โปรตีนเอส เค (prolinase K) จากบริษัท USB, ประเทศอังกฤษ
- 3.3.26 ไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxy-nucleotide triphosphate, dNTPs) จากบริษัท Amersham Pharmacia Biotech Inc., ประเทศเยอรมัน
- 3.3.27 เอนไซม์แทคดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase) จากบริษัท Promaga Cooperation Co. Ltd., ประเทศไทย
- 3.3.28 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (maker DNA) ดีเอ็นเอแลคเคอร์ 100 คู่เบส (100 bp DNA Ladder) จากบริษัท Promaga Cooperation Co. Ltd., ประเทศไทย
- 3.3.29 ไพรมอร์ (primer) ขนาด 10 คู่เบส Bioservice Unit (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ, ประเทศไทย
- 3.3.30 agarose gel จากบริษัท USB, ประเทศสเปน
- 3.3.31 เจลสตาร์ (gel star)

### 3.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนใยผัก

การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนใยผัก เริ่มทำการปลูกเซลล์ตั้งขึ้นตอนต่อไปนี้

1. แยกไข่ที่มีตัวอ่อนอยู่ในมองเห็นเป็นจุดสีดำ จำนวน 200-300 ฟอง ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียวที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
2. ฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอกไข่ด้วยฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เบนเลท 10 เปอร์เซ็นต์ คลอโรก 10 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามลำดับ
3. ล้างด้วยน้ำ deionized 2 ครั้ง
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที
5. ปิเปตดูเอทานอลทิ้ง เติมหอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่ไม่เติมซีรัม ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ใช้ปิเปตดูอาหารเก่าออกทิ้งไป ทำขั้นตอนที่ 5-6 จำนวน 2 ครั้ง
7. เติมหอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ (20% FBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
8. บดเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยแท่งแก้ว
9. เติมหอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ (20%FBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดแก้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นใช้ปิเปตดูออกมาใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
10. นำขวดเพาะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน
11. เติมหอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำขั้นตอนนี้อีกครั้งรวมปริมาตรของอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 มิลลิลิตร
12. ดูอาหารเดิมออกทิ้งปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติมหอาหารใหม่ลงไป 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ทำตามขั้นตอนนี้จนกระทั่งเซลล์เจริญแผ่กว้างออกไปจากกลุ่มเซลล์เริ่มแรกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของขวดเพาะเลี้ยง
13. ดูอาหารเดิมออกทิ้งปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมหอาหารใหม่ลงไปปริมาตร 1 มิลลิลิตรเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วันจนกระทั่งเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวของขวดเพาะเลี้ยงหรือเจริญคลุมพื้นที่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์
14. ทำการถ่ายเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงขวดใหม่ต่อไป

### 3.4.2 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง

หลังจากการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนไผ่ก็ได้ประมาณ 1 เดือน สังเกตการเจริญของเซลล์ที่เจริญแผ่กว้างออกไปจากกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจนกระทั่งประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวของเพาะเลี้ยงจึงจะทำการถ่ายเซลล์โดยการเกาะเบาๆกับฝ่ามือให้เซลล์หลุดออกจากผิวของเพาะเลี้ยง แต่ถ้าเซลล์เกาะติดแน่นจะใช้วิธีการขูดเซลล์ด้วย rubber policeman ทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของเพาะเลี้ยงทั้งหมดสังเกตได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ดูเซลล์ที่หลุดออกมาใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงขวดใหม่ โดยใช้ปริมาตรของเซลล์ที่ลอยอยู่ในอาหารเดิม 1 ส่วน (2.5 มิลลิลิตร) ต่ออาหารใหม่ 1 ส่วน (2.5 มิลลิลิตร) นำไปเก็บไว้ที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 5 วัน เซลล์ที่ได้นี้เรียกว่า เซลล์ไลน์ (cell line) และนับเป็นเซลล์ไลน์รุ่นที่ 1 (the first passage) เมื่อเซลล์รุ่นที่ 1 เจริญเต็มพื้นที่ผิวของเพาะเลี้ยงจะทำการถ่ายเซลล์เป็นรุ่นที่ 2 ทำเช่นนี้เรื่อยไป

### 3.4.3 การศึกษาการเจริญของเซลล์

ศึกษาการเจริญของเซลล์ในลักษณะที่เป็นการเจริญแบบเรียงตัวชั้นเดียว (monolayer) โดยใช้จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหารชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัมเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจนับเซลล์ทุกวันโดยการขูดเซลล์ด้วย rubber policeman และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์

### 3.4.4 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

วิธีการตัดแปลงมาจากวิธีการของ Lee and Hou (1992) ดังนี้ นำเซลล์ไลน์ที่มีการเจริญในระยะ log phase สำหรับเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 จะใช้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงนาน 72 ชั่วโมงภายหลังการปลูกเซลล์ จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ  $2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 5 มิลลิลิตร ปลูกเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาด 25 ตารางเซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายโคซิมิกเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยงแล้วนำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกตะกอนเซลล์และนำมาทำให้แขวนลอยในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.56 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการตรึงเซลล์โดยทำให้แขวนลอยในสารละลายเมทานอลต่อกรดอะซิติกอัตราส่วน 3:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงนำเซลล์แขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่เป็นของเหลวทิ้งจากนั้นเติมสารละลายเมทานอลต่อกรดอะซิติกอัตราส่วน 3:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

เพื่อตรึงเซลล์ นำเซลล์ที่ถูกตรึงไว้นั้นมาหยดลงบนสไลด์และปล่อยให้แห้ง แล้วนำมาขยี้  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยสารละลาย Giemsa (อัตราส่วนของสีย้อม Giemsa ต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1 ต่อ 15 ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยจุ่มสไลด์ลงในสารละลาย Giemsa เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและวางผึ่งให้แห้ง ทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์

### 3.4.5 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์โดย RAPD

#### 3.4.5.1 การสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lery *et al.* (2003) ดังนี้ นำเซลล์ไลน์หนอนใยผัก (KMITL-PX-E1) เซลล์ไลน์หนอนกระทุ้หอม (SE-1) และ เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1) จำนวนเซลล์เท่ากับ  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จากนั้นเติม buffer extraction (Tris-HCl เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่า pH 7.6 EDTA เข้มข้น 0.12 โมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เอนไซม์ โปรตีนเอส เค เข้มข้น 10 ไมโครกรัม และโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 22.5 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลที่อิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอลที่อิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE จนกว่าจะไม่เห็นตะกอนขาวระหว่างชั้นของฟีนอลที่อยู่ชั้นล่างกับส่วนใสที่อยู่ชั้นบน ดูดส่วนใสมาเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ 0.1 เท่าของปริมาตร และเติมเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำหลอดทดลองปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ คั่วหลอดลงบนกระดาษจนกระทั่งตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สกัดด้วยสารละลายฟีนอลที่อิมิตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE ตามด้วยฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25:24:1) และคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ดีเอ็นเอแห้งและละลายด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนออกทิ้งไป (ที่ก้นหลอดคือ DNA)

14. เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

16. ทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ TE ค่า pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.5.3 การวิเคราะห์พันธุกรรมของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ด้วยเทคนิค RAPD-PCR

ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอโดยการเตรียมเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใช้ อะกาโรส 0.16 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้เย็น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เทเจลใส่แม่พิมพ์ เมื่อเจลแข็งย้ายเจลลงในอ่าง (chamber) เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล โหลดดีเอ็นเอมาตรฐานและดีเอ็นเอที่สกัดได้ผสมสีย้อมลงไป ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 30 นาที นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR-RAPD ซึ่งวิธีการนี้เป็น การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดต่อเนื่องซ้ำกันหลาย ๆ รอบเป็นลูกโซ่ และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และมีองค์ประกอบ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาคือ บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์ ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ไพริเมอร์ และ น้ำกลั่น สำหรับการทดลองนี้ใช้ไพริเมอร์ที่มีความยาว 10 คู่เบส 3 ไพริเมอร์ คือ ไพริเมอร์ A02 มีลำดับเบสดังนี้ 5' TGCCGAGCTG 3' ไพริเมอร์ A04 มีลำดับเบสดังนี้ 5'AATCGGGCTG 3' และไพริเมอร์ B01 มีลำดับเบสดังนี้ 5' GTTTCGCTCC 3'

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) ตามวิธีของ RAPD โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ PCR เข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟตเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ไพริเมอร์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 33 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ขั้นตอน Initial อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที 1 รอบ ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที Annealing อุณหภูมิ 36 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เวลา 1 นาที Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ทำ 40 รอบ และขึ้น  
ตอนสุดท้าย Final Extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 7 นาที 1 รอบ

วิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยวิธี RAPD-PCR ดังนี้ โหลดดีเอ็นเอ  
ตัวอย่าง 5 ไมโครลิตรผสมกับ load buffer 2 ไมโครลิตร ไปบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์  
โดยใช้บัฟเฟอร์ TBE เข้มข้น 1 เท่า ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์คงที่ 50  
โวลต์ ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง  
อัลตราไวโอเล็ต ดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ 100 bp DNA Ladder

#### 3.4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัสและ

##### ไซโตพลาสมิกโพลีอีโตรซิสไวรัส

การทดสอบการเพิ่มปริมาณของนิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัสชนิดต่าง ๆ เช่น *HaSNPV*  
*AcMNPV* *GmMNPV* และ *SeMNPV* ส่วนไวรัสชนิดไซโตพลาสมิกโพลีอีโตรซิสไวรัส เช่น  
*BmCPV* *CjCPV* *EsCPV* และ *HaCPV* โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ใช้ไวรัส  
ในรูปแบบอนุภาคไวรัสอิสระ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเซลล์จำนวน  $1 \times 10^6$  เซลล์ ในขวดเพาะ  
เลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ระยะเกาะติดของไวรัสกับเซลล์ (adsorption period) 1 ชั่วโมง  
จากนั้นล้าง inoculum ที่ติดค้างออกด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซซีที่ไม่เติมซีรัม  
2 ครั้งๆ ละ 1 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการทดลองโดยสังเกต  
การเกิด cytopathic effect (CPE) และการสร้างผลึกโปรตีนของไวรัส

#### 3.4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลนต์ต่อการตอบสนองสารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus*

##### *thuringiensis*

การทดสอบนี้จะใช้สารพิษจากแบคทีเรีย *Bt* ที่ทำการทดสอบมีชื่อทางการค้า ดังนี้  
*Thuricide*<sup>®</sup> (var. *kurstaki*) จาก Thermo Ecotek Corporation (Ontario, แคนาดา) *Teknar-HDP*<sup>®</sup>  
(var. *israelensis*) จาก Zoecon Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา) และ *Trident*<sup>®</sup> (var.  
*tenebrionis*) จาก Sandoz Agro Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา) ทำการทดลองตามวิธี  
การของ Thomas and Ellar (1983) และ Charpentier *et al.* (1995) โดยนำผลึกสปอร์ของ *Bt*  
ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมซีรัม ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร แล้วเติม  
โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 10.5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา  
เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับให้มีความเข้มข้น pH 7 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1  
นอร์มัล ปั่นเหียงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา  
เซลเซียส นำส่วนที่เป็นของเหลวไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร วิเคราะห์ปริมาณ  
โปรตีน โดยวิธี Bradford (Bradford, 1976) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษของแบคทีเรีย *Bt* โดยปลูกเซลล์จำนวน 35,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม หลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายพิษของแบคทีเรีย *Bt* ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 1/2 จนถึง 1/1024 หลุมละ 50 ไมโครลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 8 หลุม จำนวน 2 ซ้ำ แล้วสังเกต cytopathic effect (CPE) ของเซลล์หลังได้รับสารพิษ 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นคำนวณค่า Tissue Culture Toxicity Dose (TCTD<sub>50</sub>)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนไผ่

ทำการการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ (embryonated eggs) ของหนอนไผ่ เริ่มทำการปลูกเซลล์ครั้งแรกเมื่อวันที่ 26 มิถุนายน 2546 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวชั้นเดียวในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง TNM-FH ที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ และเจนตามัยซิน 0.4 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หลังปลูกเซลล์เริ่มต้น 3 วัน พบว่าเนื้อเยื่อเริ่มเกาะพื้นขวดเพาะเลี้ยง เซลล์มีการแบ่งตัวแผ่ออกไปจากกลุ่มเนื้อเยื่อที่ปลูกครั้งแรก (explant tissue) เพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น เมื่อเพาะเลี้ยงนาน 60 วัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างแตกต่างกัน ได้แก่ เซลล์ขนาดใหญ่มีแวกคิวโอล (companion cell) เซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped cell) และเซลล์รูปร่างกลม (epithelial-like cell) (รูปที่ 4.1 - 4.2) แต่เซลล์ส่วนใหญ่เป็นเซลล์รูปกระสวย นอกจากนี้ยังพบเซลล์รูปร่างคล้ายเซลล์ประสาท (nerve-like cell) และเซลล์คล้ายเส้นใยกล้ามเนื้อ (myoblast-like cell) ซึ่งพบว่าเซลล์ชนิดนี้มีการหดตัวได้ ถึงแม้ว่าจะเพาะเลี้ยงได้นาน 90-100 วัน

#### 4.2 การถ่ายเซลล์

หลังการปลูกเซลล์เนื้อเยื่อเริ่มต้นเป็นเวลา 30 วัน เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 7 วัน โดยดูดอาหารเก่าทิ้งปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเติมอาหารใหม่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เมื่อพบว่าเซลล์มีการเจริญปกคลุมพื้นผิวขวดเพาะเลี้ยง 80 เปอร์เซ็นต์ จะทำการถ่ายเซลล์ใส่ขวดเพาะเลี้ยงใหม่ในอัตราส่วน 1 : 2 ได้เป็นพาสเสจที่ 1 เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นที่ผิวขวดเพาะเลี้ยงทำการถ่ายเซลล์ต่อไปเป็นพาสเสจที่สูงขึ้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 5 วัน โดยดูดอาหารเก่าทิ้งปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรและเปลี่ยนอาหารใหม่ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเป็นพาสเสจที่ 6 ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยซีรัม 15 เปอร์เซ็นต์ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุก 5 วัน โดยดูดอาหารเก่าทิ้งทั้งหมดและเปลี่ยนอาหารใหม่ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ต่อมาปรับปรุงเซลล์พาสเสจที่ 18 ให้เพาะเลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

เซลล์ไลน์ของหนอนใยผักที่ได้นี้ตั้งชื่อตามสถานที่ทำการวิจัยคือ KMITL-PX-E1 ซึ่งมี  
รายละเอียดดังนี้

KMITL คือ King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

PX คือ *Plutella xylostella*

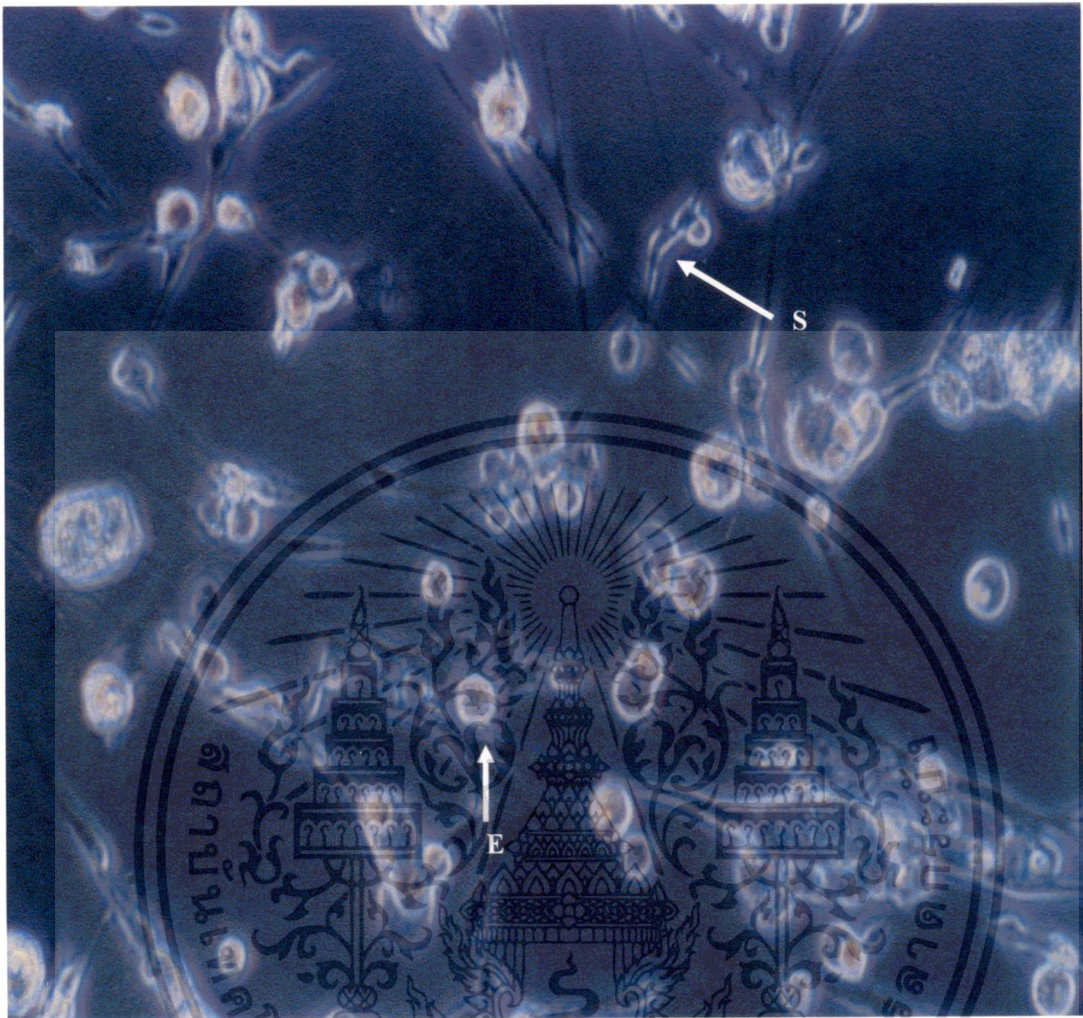
E คือ Embryo

1 คือ เลขที่ของเซลล์



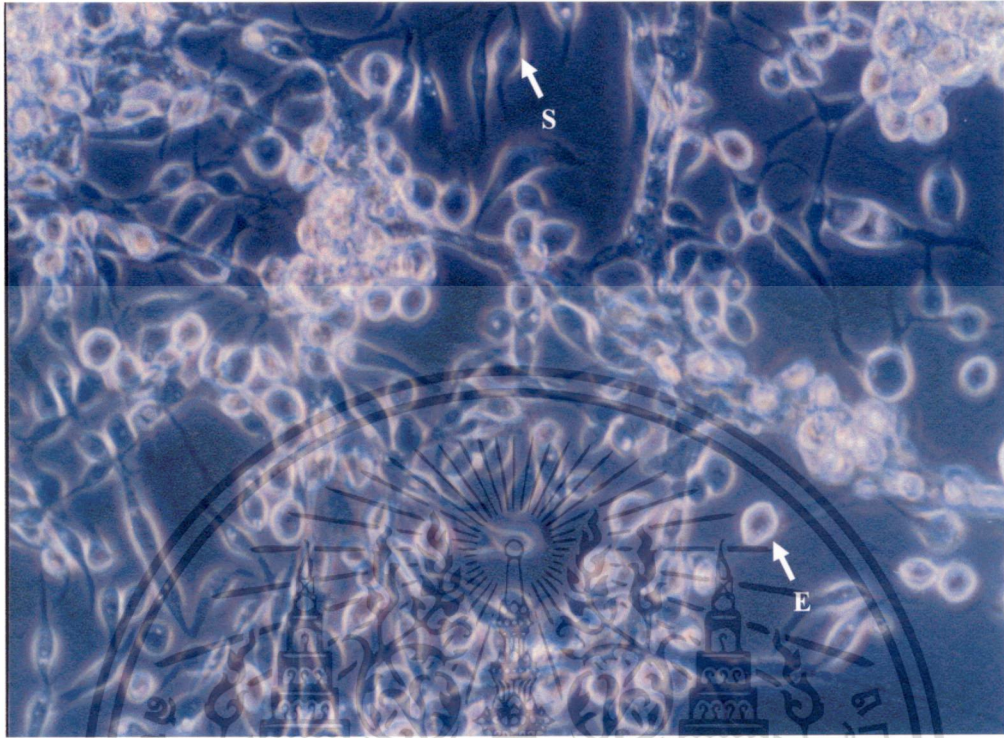
**รูปที่ 4.1** กลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนหนอนใยผักภายหลังการปลูกเซลล์ 30 วัน ประกอบด้วยกลุ่มเนื้อเยื่อเริ่มแรก (explant tissue, Ex) เซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped cell, S) เซลล์รูปร่างกลม (epithelial-like cell, E) และเซลล์ขนาดใหญ่มีแวคคิวโอล (companion cell, C) (กำลังขยาย 200 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงรูปร่างลักษณะของเซลล์ภายหลังการปลูกกลุ่มเซลล์เริ่มแรกเป็นเวลา 60 วัน ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างกลม (epithelial-like cell, E) และเซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped cell, S) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



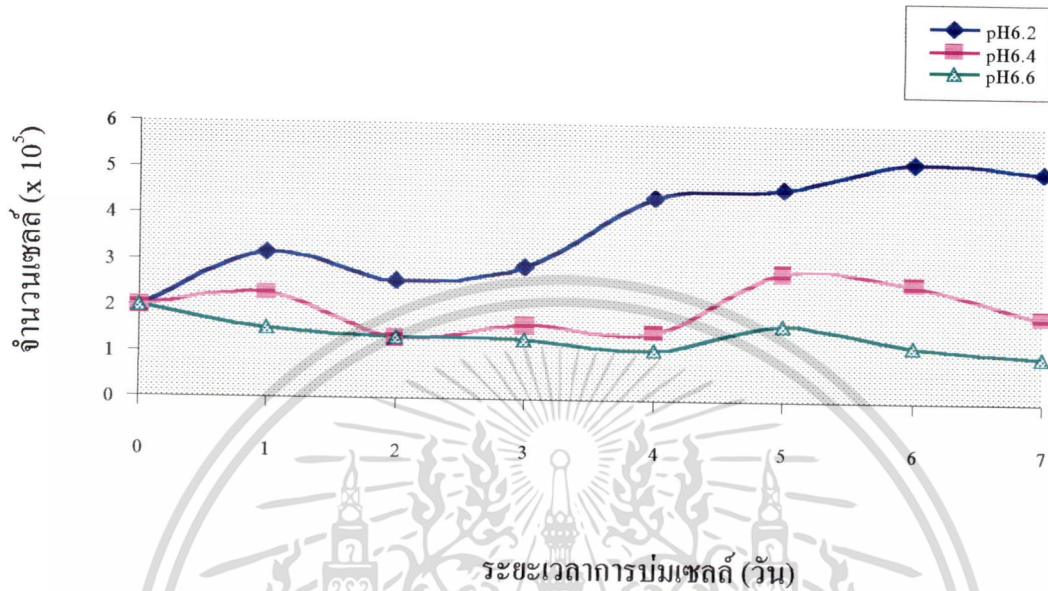
รูปที่ 4.3 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสเสงที่ 3 อายุ 48 วัน หลังจากถ่ายเซลล์ส่วนใหญ่พบ เซลล์รูปกระสวย (S) และเซลล์รูปร่างกลม (E) (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 ศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1

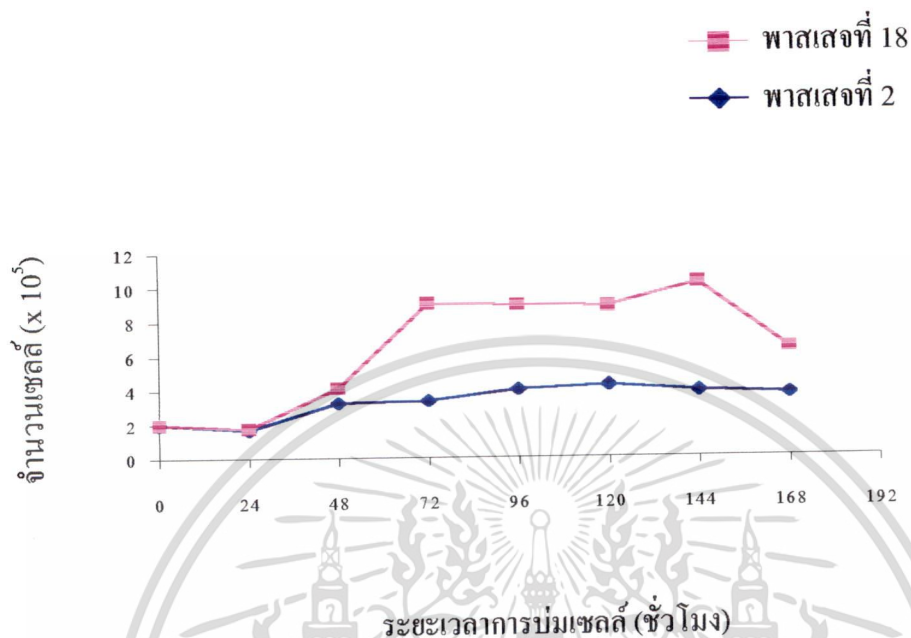
ศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ TNM-FH ที่เสริมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีค่า pH ต่างกันคือ 6.2 6.4 และ 6.6 บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยทำการปลูกเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์ไลน์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีค่า pH 6.2 (รูปที่ 4.4) เซลล์สามารถเพิ่มจำนวนเป็น  $5.22 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 6 หลังจากปลูกเซลล์มากกว่าเซลล์เริ่มต้น 2.61 เท่า ส่วนในอาหารที่มีค่า pH 6.4 หลังจากปลูกเซลล์ 6 วัน เซลล์สามารถเพิ่มปริมาณเป็น  $2.56 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าเซลล์เริ่มต้น 1.28 เท่า และในอาหารที่มีค่า pH 6.6 เซลล์ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้หลังจากปลูกเซลล์นาน 7 วัน

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 (รูปที่ 4.5) ในพาสเสจที่ 2 และพาสเสจที่ 18 โดยทำการปลูกเซลล์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลังจากปลูกเซลล์เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เพิ่มจำนวนเป็น  $4.25 \times 10^5$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าเซลล์เริ่มต้น 2.22 เท่า ช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่า (population doubling time) คำนวณตามวิธีของ McAteer and Davis (1994) เท่ากับ 110.59 ชั่วโมง ในพาสเสจที่ 2 สำหรับเซลล์พาสเสจที่ 18 หลังจากปลูกเซลล์เป็นเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เพิ่มปริมาณเป็น  $1.029 \times 10^6$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าเซลล์เริ่มต้น 5.15 เท่า ช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่า เท่ากับ 61.22 ชั่วโมง



รูปที่ 4.4 การเจริญของเซลล์โคโคน์ KMITL-PX-EI พาสเสงที่ 11 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ TNM-FH ที่มีค่า pH 6.2 6.4 และ 6.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ระยะเวลาที่เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสแสงที่ 2 และ 18 เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (population doubling time)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

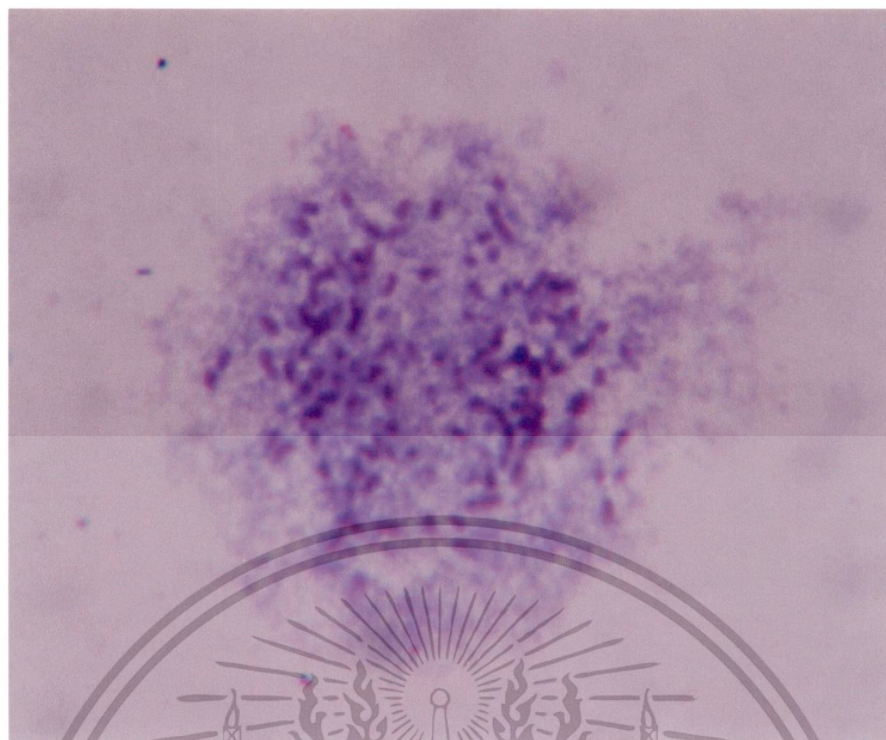
## 4.4 การวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์

จากการวิเคราะห์คาร์ิโอไทป์ของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ตามวิธีของ Lee and Hou (1992) จากเซลล์ 200 ตัวอย่างทำการนับจำนวนโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่านิวเคลียสของเซลล์ไลน์ระยะเมตาเฟสเห็นเป็นจุดสีม่วงอมชมพู (รูปที่ 4.6) จากการสุ่มตัวอย่างเซลล์ 100 ตัวอย่าง เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ในพาสเสจที่ 11 มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงระหว่าง 6-124 โครโมโซม จากตัวอย่าง 68 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงระหว่าง 11-40 โครโมโซม และจากตัวอย่าง 17 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงระหว่าง 41-60 โครโมโซม (รูปที่ 4.7)

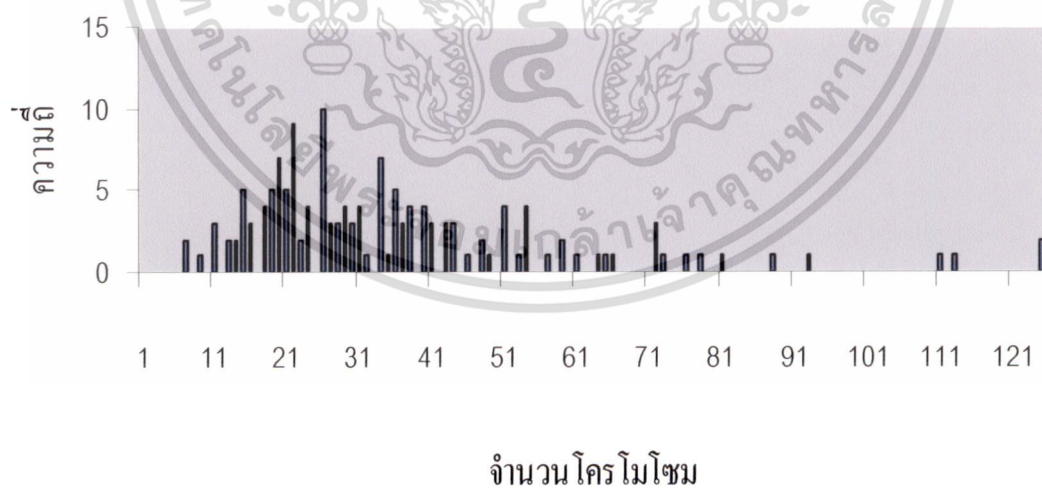
## 4.5 ศึกษาการจำแนกเซลล์ไลน์โดยเทคนิค RAPD

### 4.5.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝัก KMITL-PX-E1 หนอนกระทุ้หอม (SE-1) และหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (KMITL-HA-E1) ดัดแปลงมาจากวิธีของ Lery *et al.* (2003) เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 10-30 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนการสกัดดีเอ็นเอของฝักหนอนไผ่ฝักตามวิธีของ Haymer *et al.* (1992) เมื่อตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วพบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



**รูปที่ 4.6** แสดงลักษณะ โครโมโซมในระยะเมตาเฟสของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 พาสเสจที่ 11 (กำลังขยาย 1,000)



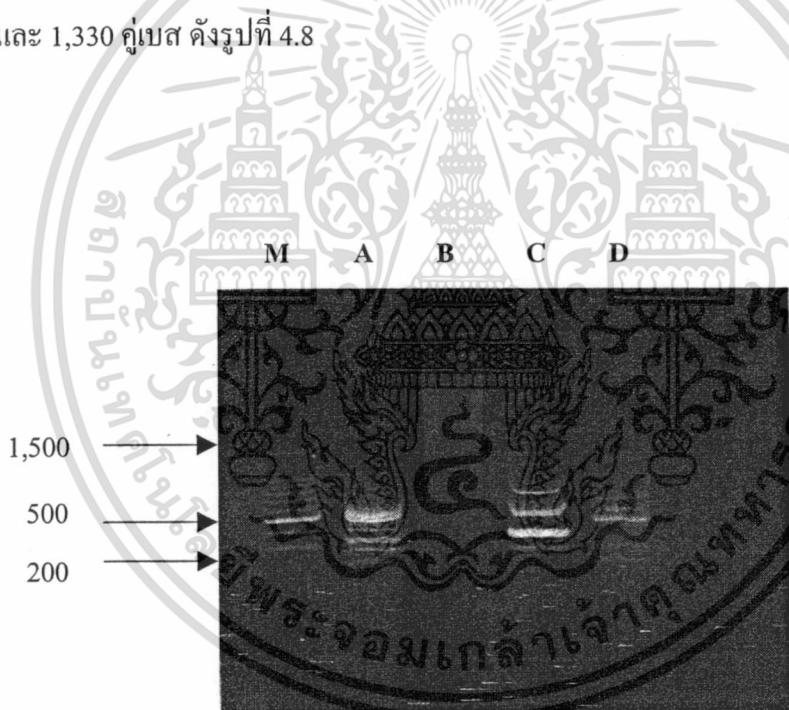
**รูปที่ 4.7** กราฟแสดงจำนวน โครโมโซมของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5.2 ผลการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 SE-1 KMITL-HA-E1 และผีเสื้อหนอนใยผัก มาศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 3 ไพรเมอร์ ไพรเมอร์ทั้งหมดให้แถบดีเอ็นเอแบบ polymorphic การรายงานผลจะนับเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความเข้มของแถบเด่นชัด โดยขนาดของแถบดีเอ็นเอมีตั้งแต่ 200-1,330 คู่เบส ให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 2-7 แถบขึ้นอยู่กับเซลล์ไลน์และไพรเมอร์

ไพรเมอร์ A02 สามารถเพิ่มดีเอ็นเอในตัวอย่างเซลล์ไลน์หนอนใยผัก KMITL-PX-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 7 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 280 350 400 450 500 และ 550 คู่เบส เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม SE-1 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 350 450 และ 800 คู่เบส และผีเสื้อหนอนใยผักให้แถบดีเอ็นเอ 7 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 300 350 450 550 700 และ 1,330 คู่เบส ดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ A02

M = marker, 100 bp ladder DNA

A = KMITL-PX-E1

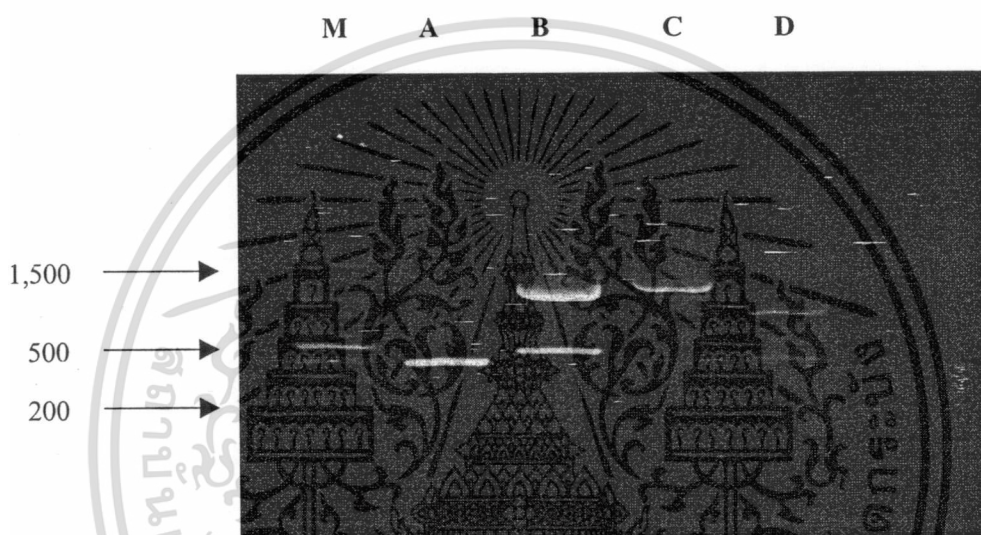
B = SE-1

C = KMITL-HA-E1

D = ผีเสื้อหนอนใยผัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไพรเมอร์ A04 สามารถเพิ่มดีเอ็นเอในตัวอย่างเซลล์ไลน์หนอนใยผัก KMITL-PX-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 และ 400 คู่เบส เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม SE-1 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 450 และ 1,000 คู่เบส เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 และ 1,250 คู่เบส และฝั่หนอนใยผักให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 800 คู่เบส ดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ A04

M = marker, 100 bp ladder DNA

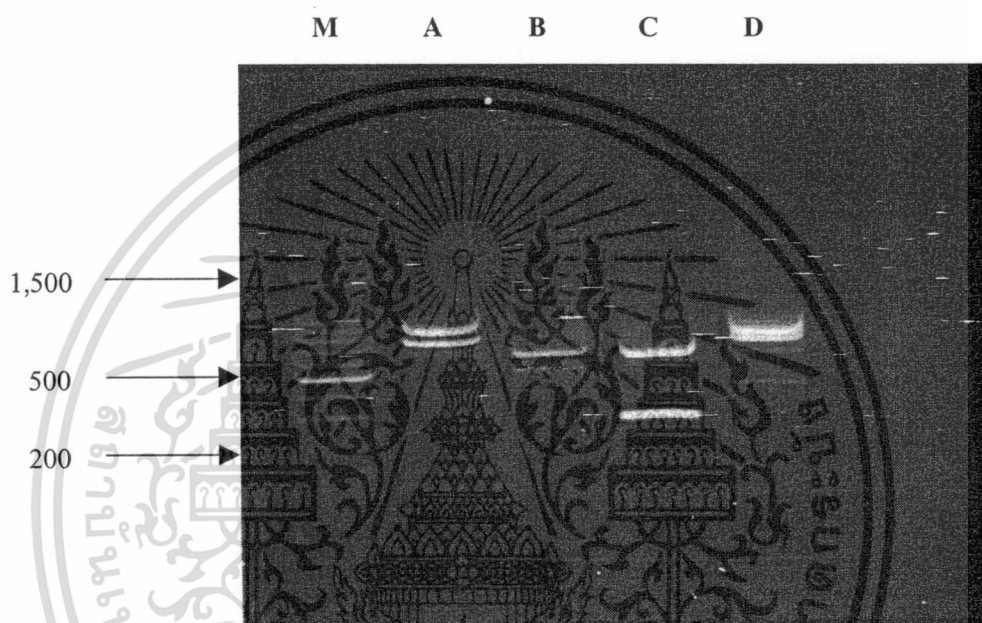
A = KMITL-PX-E1

B = SE-1

C = KMITL-HA-E1

D = ฝั่หนอนใยผัก

ไพรเมอร์ B01 สามารถเพิ่มดีเอ็นเอในตัวอย่างเซลล์ไลน์หนอนใยผัก KMITL-PX-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 และ 900 คู่เบส เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม SE-1 ให้แถบดีเอ็นเอ 3 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 540 และ 650 คู่เบส เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน KMITL-HA-E1 ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 650 คู่เบส และฝั่หนอนใยผักให้แถบดีเอ็นเอ 4 แถบ มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 700 800 และ 900 คู่เบส ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 รูปแบบแถบดีเอ็นเอจากการทำ RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ B01

M = marker, 100 bp ladder DNA

A = KMITL-PX-E1

B = SE-1

C = KMITL-HA-E1

D = ฝั่หนอนใยผัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขนาดแถบดีเอ็นเอและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ RAPD โดยการใช้ไพรมอร์ 3 ไพรมอร์ นำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน (similarity coefficient) จากสมการของ Nei and Li (1979)  $S_{AB} = 2N_{AB}/(N_A+N_B)$  โดยที่  $N_{AB}$  คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน (shared)  $N_A, N_B$  คือจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เห็นเด่นชัดของ ตัวอย่าง A และ B พบว่า เซลล์ไลน์หนอนโยผัก KMITL-PX-E1 กับ เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม SE-1 ไม่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเลยทั้ง 3 ไพรมอร์ เซลล์ไลน์หนอนโยผัก KMITL-PX-E1 กับ เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้าย KMITL-HA-E1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันในไพรมอร์ A02 เท่ากับ 0.36 ส่วนในไพรมอร์ A04 และ B01 ไม่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน และเซลล์ไลน์หนอนโยผัก KMITL-PX-E1 กับ ผีเสื้อหนอนโยผัก พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันในไพรมอร์ A02 A04 และ B01 เท่ากับ 0.57 0.50 และ 0.33 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 การเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกัน(similarity coefficient) ของ เซลล์ไลน์หนอนโยผัก (KMITL-PX-E1) เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (SE-1) เซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอ (KMITL-HA-E1) และ ผีเสื้อหนอนโยผัก

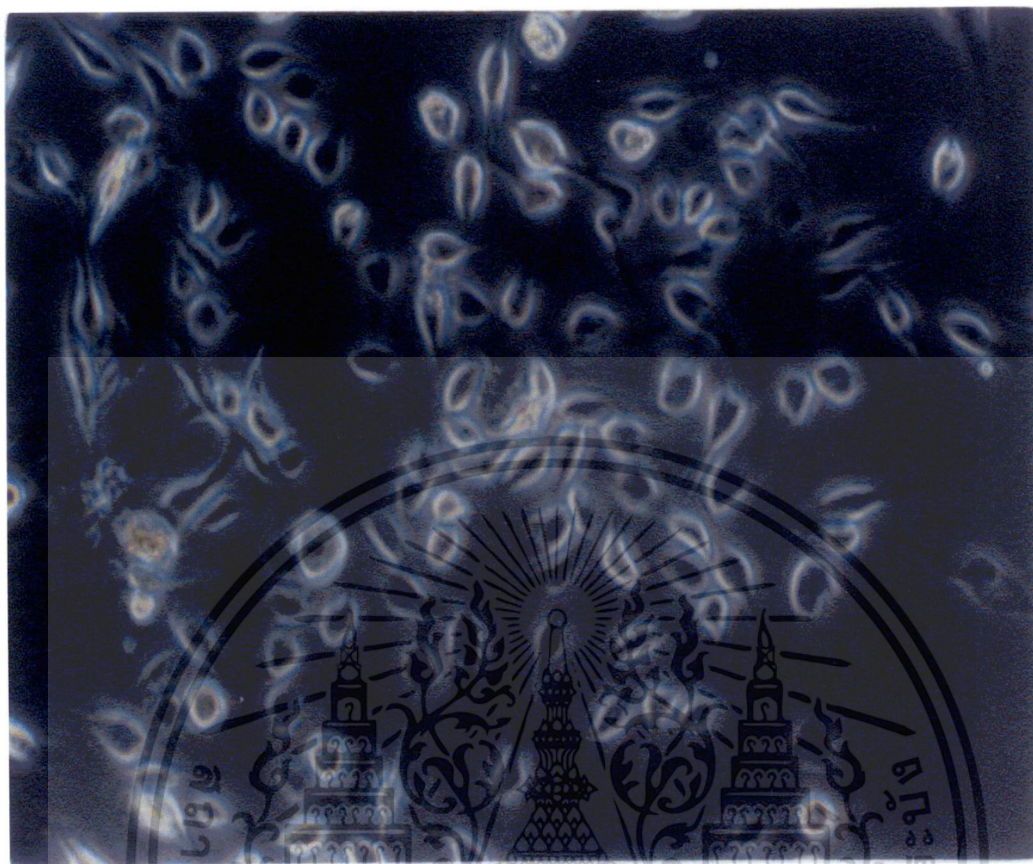
การเปรียบเทียบ	ไพรมอร์ A02	ไพรมอร์ A04	ไพรมอร์ B01
KMITL-PX-E1 กับ SE-1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
KMITL-PX-E1 กับ KMITL-HA-E1	0.36	ไม่พบ	ไม่พบ
KMITL-PX-E1กับ ผีเสื้อหนอนโยผัก	0.57	0.50	0.33

#### 4.6 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสและ

##### ไซโตพลาสติกโพลีอีโครไวรัส

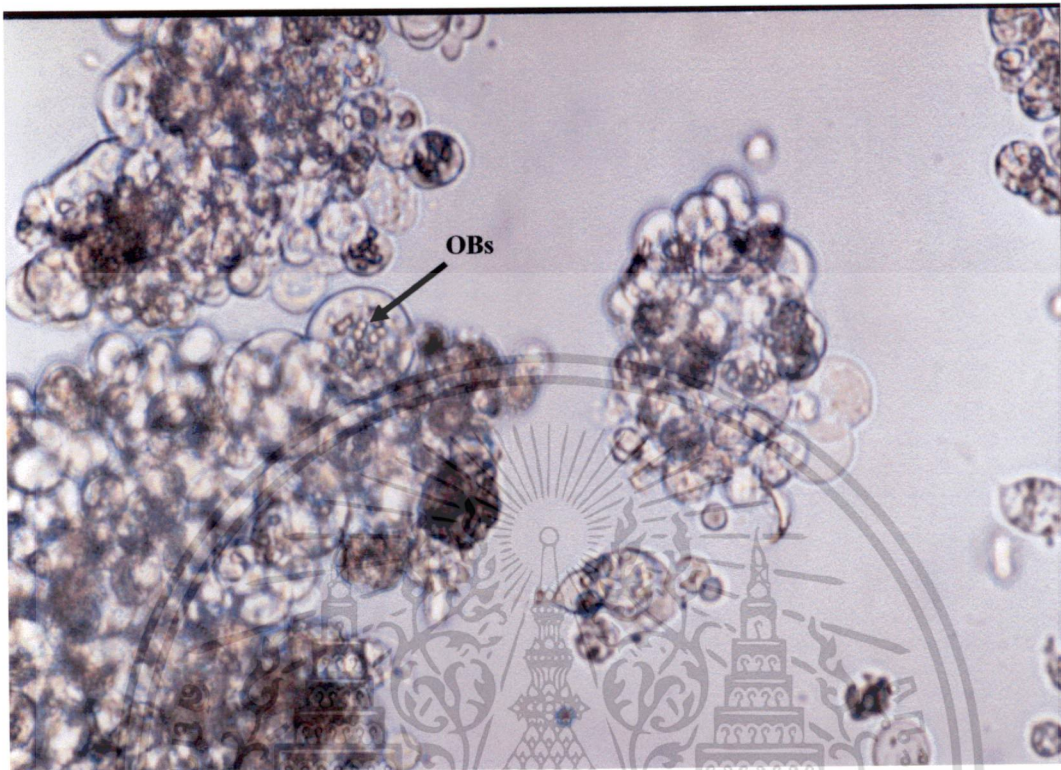
จากการศึกษาคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ที่สร้างขึ้นใหม่จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของหนอนใยฝัก ในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวคลีโอโพลีอีโครไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ *HaSNPV* *AcMNPV* *GmMNPV* และ *SeMNPV* พบว่านิวคลีโอโพลีอีโครไวรัสชนิด *AcMNPV* สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ที่ได้รับเชื้อ โดยจะพบผลึกโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ ผลึกโปรตีนที่พบมี 2 ลักษณะคือ ผลึกรูปเหลี่ยม และผลึกที่มีลักษณะกลม ในเซลล์บางส่วนมีอาการผิดปกติ เช่น มีรูปร่างผิดปกติ มีเม็ดกรานูลอยู่ภายในเซลล์ (cytopathic effect) และเซลล์หลุดลอย (รูปที่ 4.12) สำหรับ *GmMNPV* และ *SeMNPV* สามารถทำให้เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 มีอาการผิดปกติในนิวเคลียสของเซลล์ (รูปที่ 4.13) แต่ไม่พบการสร้างผลึกโปรตีนในนิวเคลียสของเซลล์ แต่เซลล์เกิดอาการผิดปกติ ส่วน *HaSNPV* พบว่าหลังจากเซลล์ KMITL-PX-E1 ได้รับเชื้อแล้วไม่พบอาการผิดปกติ

การศึกษาคูณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของไซโตพลาสติกโพลีอีโครไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ *BmCPV* *CyCPV* *EsCPV* และ *HaCPV* พบว่า *EsCPV* เพียงชนิดเดียวที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 หลังจากเซลล์ได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน โดยจะพบผลึกโปรตีนเกิดขึ้นบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ไลน์ ผลึกโปรตีนที่พบมี 2 ลักษณะคือ ผลึกรูปเหลี่ยมขนาดใหญ่ และผลึกที่มีลักษณะกลม (รูปที่ 4.14 - 4.15)



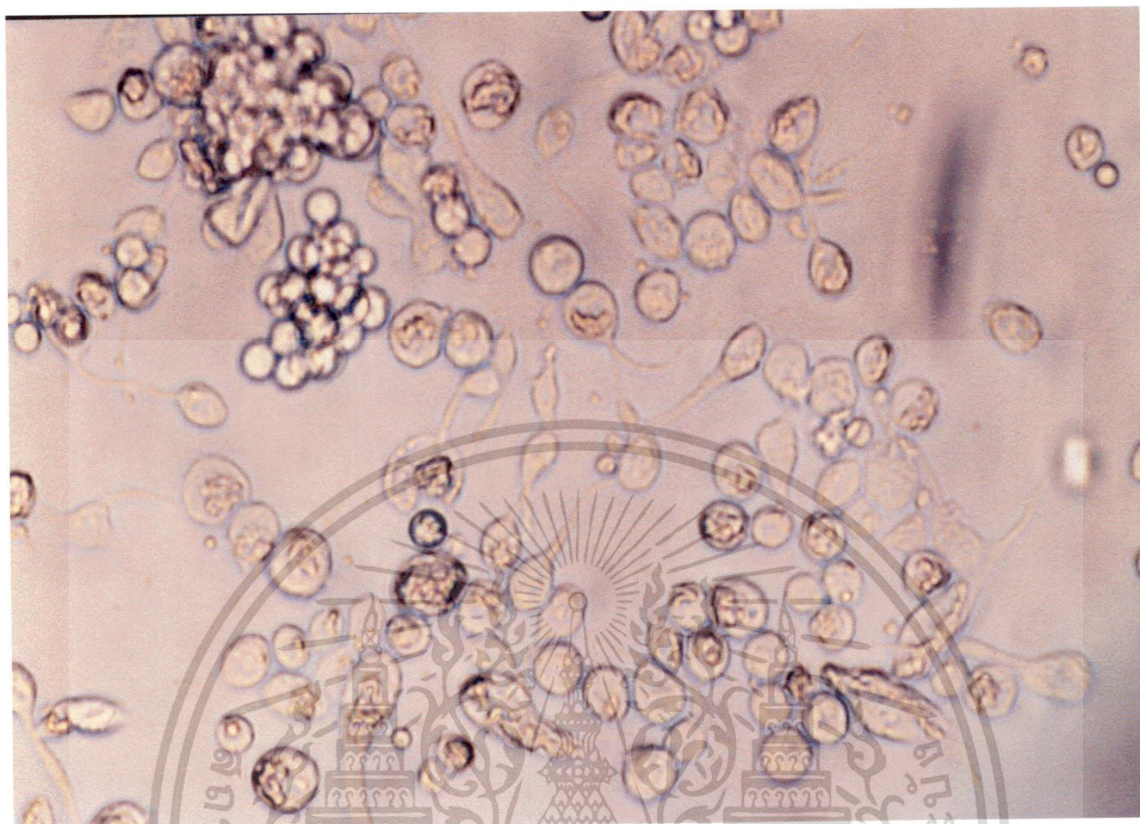
รูปที่ 4.11 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 อายุ 5 วัน ภายหลังจากถ่ายเซลล์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



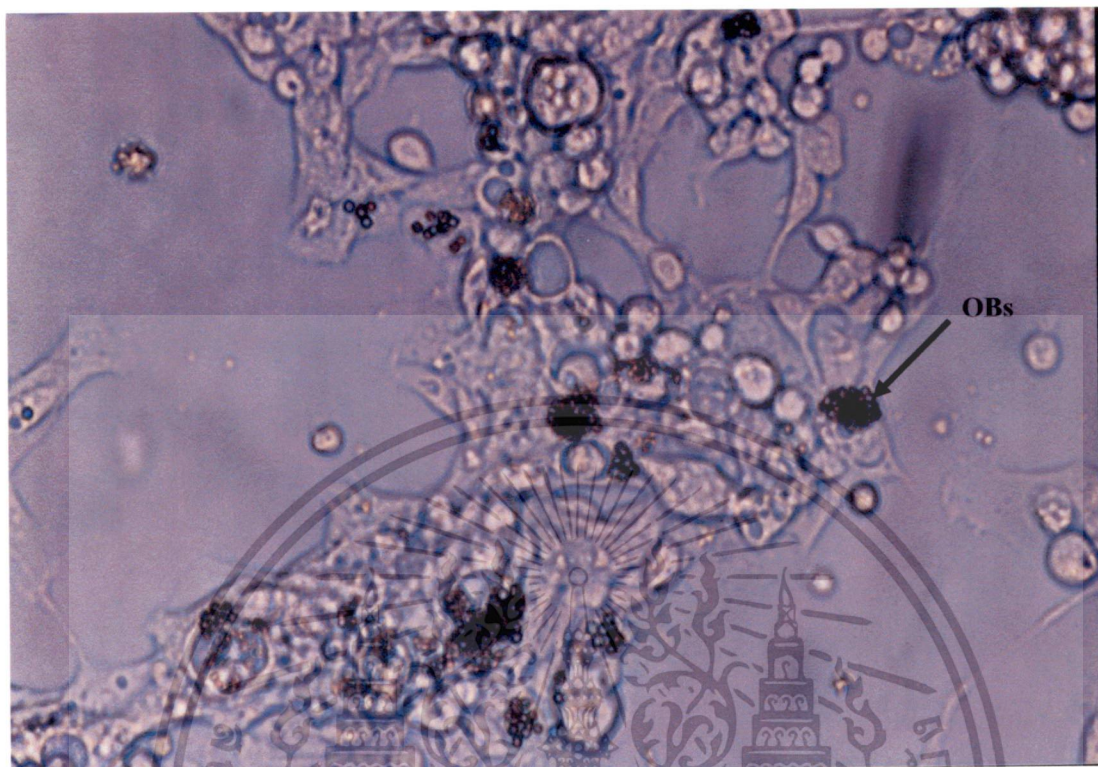
รูปที่ 4.12 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังจากการปลูกเชื้อ AcMNPV 6 วัน และปรากฏผลึกโปรตีน(OBs) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



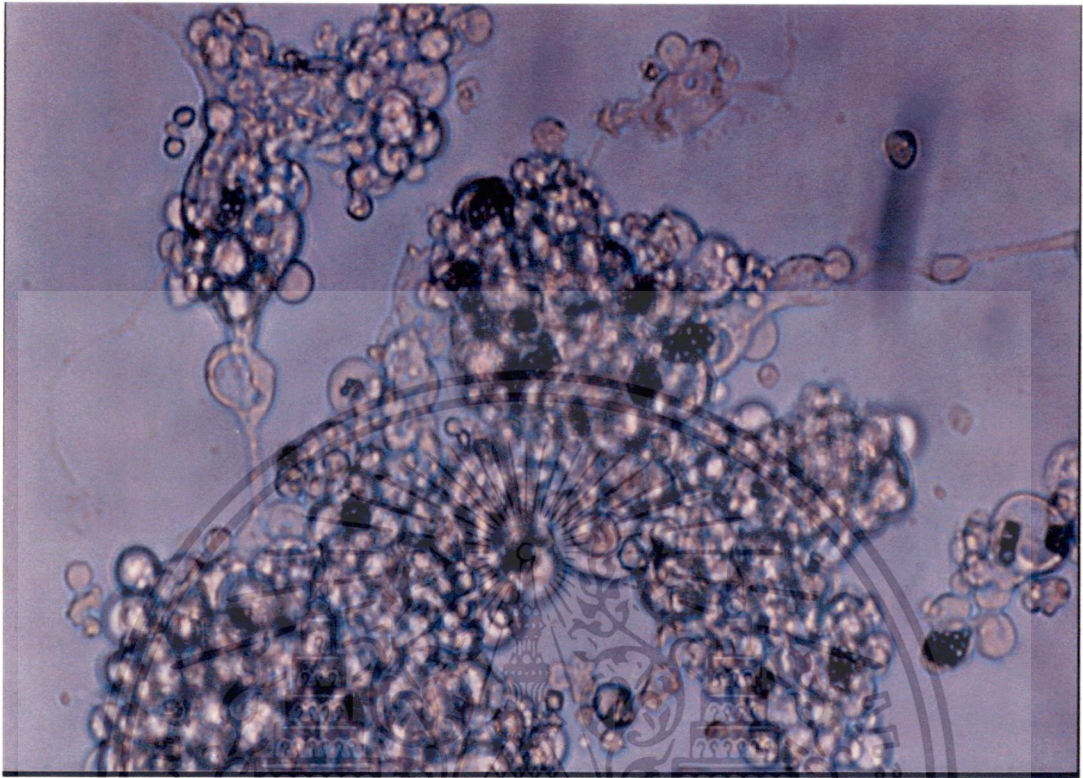
รูปที่ 4.13 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังจากการปลูกเชื้อ *GmNPV* 6 วัน พบลักษณะของ cytopathic effect แต่ไม่พบผลึกโปรตีนภายในนิวเคลียสของเซลล์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังจากการปลูกเชื้อ *EsCPV* 4 วัน และปรากฏผลึกโปรตีน (OBs) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 เซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ภายหลังจากปลูกเชื้อ *E8CPV* 8 วัน และปรากฏผลึกโปรตีน (OIs) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จำนวนมาก (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

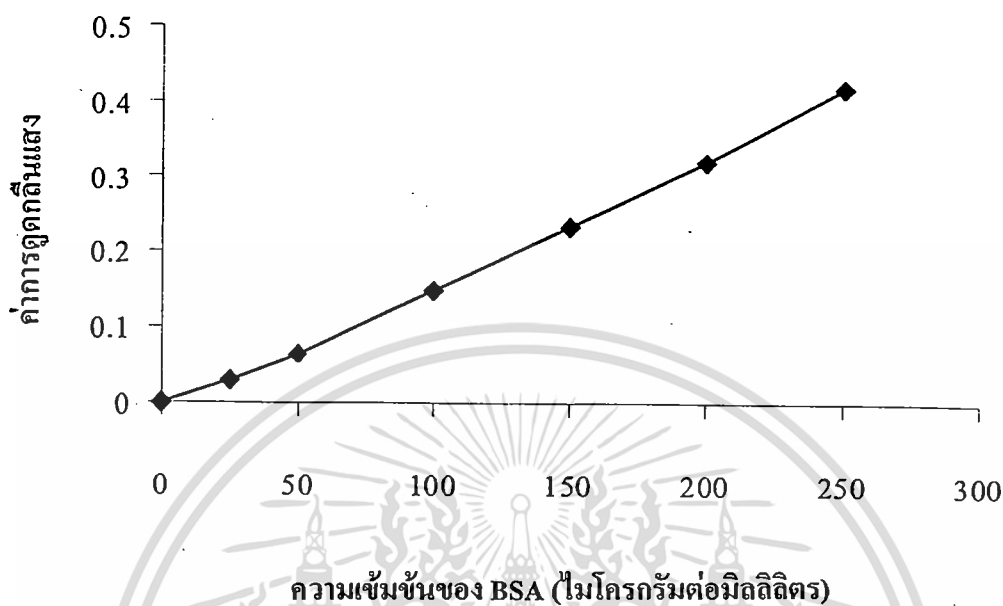
#### 4.7 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์โกลีในการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย

##### *Bacillus thuringiensis*

จากการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์โกลี 3 ชนิด ได้แก่ KMITL-PX-E1 SE-1 และ KMITL-HA-E1 ในการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt* ซึ่งมีชื่อทางการค้า 3 ชนิด ได้แก่ Thuricide® (var. *kurstaki*) Teknar-HDP® (var. *israelensis*) และ Trident® (var. *tenebrionis*) ที่ระดับความเจือจางของสารพิษ 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 และ 1/1024 การหาค่าปริมาณโปรตีนของผลึกโปรตีนแบคทีเรีย *Bt* ทั้ง 3 ชนิด ทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้สารละลาย Bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของ BSA (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0.000
25	0.030
50	0.066
100	0.149
150	0.232
200	0.318
250	0.418



รูปที่ 4.16 กราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน BSA

จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนจากสารพิษ *Bt* นำไปเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษทั้ง 3 ชนิด ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนของสารพิษ *Bt* 3 ชนิดเมื่อเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

ชนิดของแบคทีเรีย <i>Bt</i>	ค่าการดูดกลืนแสง	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
Thuricide <sup>®</sup>	0.117	80.72
Teknar-HDP <sup>®</sup>	0.193	126.51
Trident <sup>®</sup>	0.258	165.12

จากการทดสอบสารพิษของแบคทีเรีย *Bt* แต่ละชนิดที่ระดับความเจือจางตั้งแต่ 1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256 1/512 และ 1/1024 ต่อเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 SE-1 และ KMITL-HA-E1 ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์แบบหลุม 96 หลุม โดยปลูกเซลล์จำนวน 35,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรและสารพิษ *Bt* ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มเป็นเวลา 3 วัน สังเกตการเกิด cytopathic effect พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 มีอาการตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> การคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนสารพิษทั้งสามชนิดโดยใช้กราฟโปรตีนมาตรฐาน ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษทั้งสามชนิด ดังตารางที่ 4.3

หลังจากได้รับสารพิษเพียง 1 วัน โดยเซลล์ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเจือจาง 1/256 และเมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/1,024 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารพิษจาก Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> พบว่าความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/16 เมื่อนำมาหาค่า TCTD<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ที่ตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.128 10.900 และ 14.292 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับเซลล์ไลน์ SE-1 มีอาการตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> หลังจากได้รับสารพิษเพียง 1 วัน โดยเซลล์ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเจือจาง 1/64 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/256 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารพิษจาก Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> พบว่าหลังจากเซลล์ได้รับสารพิษเพียง 1 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์คือ 1/8 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/16 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาหาค่า TCTD<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ SE ที่ตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.644 11.864 และ 14.610 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีอาการตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> หลังจากได้รับสารพิษเพียง 1 วัน โดยเซลล์ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่ระดับความเจือจาง 1/32 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/64 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 62.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารพิษจาก Teknar-HDP<sup>®</sup> พบว่าหลังจากเซลล์ได้รับสารพิษเพียง 1 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์คือ 1/2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/8 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารพิษจาก Trident<sup>®</sup> พบว่าหลังจากเซลล์ได้รับสารพิษเพียง 1 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์ไลน์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์คือ 1/2 เมื่อเวลาผ่านไป 3 วัน ความเจือจางที่ต่ำสุดที่ทำให้เซลล์เกิด CPE คือ 1/4 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 62.5 เมื่อนำมาหาค่า TCTD<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ตอบสนองต่อสารพิษจาก Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.019 26.490 และ 36.638 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากผลการตอบสนองต่อสารพิษแบบที่เรียก  $B_i$  ทั้ง 3 ชนิด ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) พบว่ามีทรีทเมนต์ (treatment) บางทรีทเมนต์ต่างจากทรีทเมนต์อื่น หลังจากวิเคราะห์ Sum of Square (SS) บางทรีทเมนต์ ออกเป็น 3 ส่วน คือ ชนิดของเซลล์ไลน์ ชนิดของสารพิษแบบที่เรียก  $B_i$  และ ปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ไลน์กับชนิดของ

สารพิษแบคทีเรีย *Bt* พบว่าทั้ง 3 ปัจจัย มีผลทำให้ค่า TCTD<sub>50</sub> มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด และชนิดของสารพิษแบคทีเรีย *Bt* 3 ชนิด

แหล่งความแปรปรวน	องศาอิสระ (df)	SS	MS	F
ทรีทเมนต์ (treatment)	8	2,424.928	303.116	284.883**
เซลล์ไลน์	2	641.331	320.666	301.378**
ชนิดของสารพิษแบคทีเรีย <i>Bt</i>	2	1,460.899	730.450	686.513**
ปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ไลน์กับชนิดของสารพิษแบคทีเรีย <i>Bt</i>	4	322.697	80.674	75.822**
ความคลาดเคลื่อน	8	9.572	1.064	
ผลรวม	17	2,434.499		

Coefficient of variation (C.V.) = 1.327 %

\*\* แสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

(แสดงค่า TCTD<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดต่อการตอบสนองของสารพิษแบคทีเรีย *Bt* 3 ชนิด ภาคผนวก ข.)

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนพบว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01 จึงนำมาเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple Compararison) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> ของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดต่อการตอบสนองของสารพิษแบคทีเรีย *Bt* 3 ชนิด พบว่าเซลล์ไลน์แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อสารพิษแบคทีเรีย *Bt* 3 ชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide<sup>®</sup> ได้ดีที่สุด สารพิษ Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> รองลงมาตามลำดับ ในส่วนของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 โดยสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide<sup>®</sup> ได้ดีที่สุดที่ระดับ TCTD<sub>50</sub> เฉลี่ยเท่ากับ 0.128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> รองลงมาที่ระดับ TCTD<sub>50</sub> เฉลี่ยเท่ากับ 10.900 และ 14.242 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1, SE-1 และ KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษจาก *Bt* 3 สูตร

ชนิดสารพิษแบคทีเรีย <i>Bt</i>	ค่าเฉลี่ย TCTD <sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)		
	KMITL-PX-E1	SE-1	KMITL-HA-E1
Thuricide <sup>®</sup>	0.128 a	0.644 a	1.019 a
Teknar-HDP <sup>®</sup>	10.900 b	11.864 b	26.490 b
Trident <sup>®</sup>	14.242 c	14.610 c	36.638 c

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01

จากตารางที่ 4.6 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ของสารพิษแบคทีเรีย *Bt* แต่ละชนิดที่มีผลต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิด พบว่าสารพิษ Thuricide<sup>®</sup> Teknar-HDP<sup>®</sup> จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ได้ดีที่สุดที่ระดับค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 0.128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ SE-1 และ KMITL-HA-E1 สำหรับสารพิษ Teknar-HDP<sup>®</sup> จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 และ SE-1 ได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 10.900 และ 11.864 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ระดับค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 26.490 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 และ SE-1 สำหรับสารพิษ Trident<sup>®</sup> จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 และ SE-1 ได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 14.242 และ 14.610 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ระดับค่าเฉลี่ย TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 36.638 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 และ SE-1

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารพิษ *Bt* แต่ละสูตร ที่มีต่อเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1, SE-1 และ KMITL-HA-E1

ชนิดของเซลล์ไลน์	ค่าเฉลี่ย TCTD <sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)		
	Thuricide <sup>®</sup>	Teknar-HDP <sup>®</sup>	Trident <sup>®</sup>
KMITL-PX-E1	0.128 a	10.900 a	14.242 a
SE-1	0.644 a	11.864 a	14.610 a
KMITL-HA-E1	1.019 a	26.490 b	36.638 b

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.01



รูปที่ 4.17 ภาพแสดงการเปรียบเทียบลักษณะของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ปกติและเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารพิษ *B. thuringiensis* (กำลังขยาย 400 เท่า)

- ก. เซลล์ปกติ
- ข. เซลล์ที่ได้รับสารพิษ *B. thuringiensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกโดยใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของหนอนไผ่ฝัก เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH ที่เสริมซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เจริญได้อย่างต่อเนื่องเป็นเซลล์ไลน์ และให้ชื่อว่า KMITL-PX-E1 ซึ่งขณะนี้เซลล์ไลน์เพาะเลี้ยงในอาหาร TNM-FH ที่เสริมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ถ่ายเซลล์เป็นพาสเสจที่ 21 โดยเซลล์ไลน์ที่ได้มีรูปร่าง 2 แบบ คือ เซลล์รูปกระสวย และเซลล์รูปร่างกลม เท่านั้นที่มีการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณต่อไป

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝัก KMITL-PX-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีค่า pH ได้แก่ 6.2 6.4 และ 6.6 พบว่าเซลล์มีการเจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่า pH 6.2 Lee and Hou (1992) รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝัก PX-1187 เจริญได้ดีในอาหารชนิด Hink ที่มีค่า pH 6.4 ช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์ KMITL-PX-E1 เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในพาสเสจที่ 2 และ 18 คือ 110.59 และ 61.22 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝักจากสหรัฐอเมริกา KMITL-HA-E1 ช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มขึ้น 2 เท่า ในพาสเสจที่ 60 และ 79 คือ 60.11 และ 40.82 ชั่วโมง ตามลำดับ (สาโรช เจริญศักดิ์. 2546) จะเห็นว่าในพาสเสจที่สูงขึ้นช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ลดลงอาจเนื่องมาจากเซลล์สามารถปรับตัวให้เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้ดีขึ้น (สุดาวรรณ เขยชมศรีและคณะ. 2547)

จากการศึกษาการไอโทปีโดยการนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ในพาสเสจที่ 11 ในระยะ Log phase โครโมโซมเป็นแบบโพลีพลอยด์และจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 6-124 โครโมโซม ที่ระยะเมตาเฟส จำนวนโครโมโซมของเซลล์ KMITL-PX-E1 ประมาณ 68 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 11-40 โครโมโซม และ 17 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 41-60 โครโมโซม เซลล์ไลน์ PX-1187 มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 20-80 โครโมโซม (Lee and Hou. 1992) เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 48-228 โครโมโซม (สาโรช เจริญศักดิ์. 2546)

จากการจำแนกเซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝัก KMITL-PX-E1 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม, SE-1 เซลล์ไลน์หนอนไผ่ฝักจากสหรัฐอเมริกา, KMITL-HA-E1 ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 3 ไพรเมอร์ ซึ่งรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็น polymorphic ที่แสดงถึงความแตกต่างกันของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดอย่างชัดเจน

ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันจากสมการของ Nei and Li (1979) พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 กับ ฝักหนอนไผ่ฝัก มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันสูงแสดงว่ามีความใกล้ชิดกัน โดยที่เซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดไม่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันเลยในไพรเมอร์ A04 และ

B01 จากรายงานของ Lery *et al.* (2003) จำแนกเซลล์ไลน์ 11 ชนิด ด้วยเทคนิค RAPD ได้แถบดีเอ็นเอที่ต่างกันอย่างชัดเจน และเทคนิคนี้ยังจำแนกเซลล์ไลน์ที่อยู่ในจีนัสเดียวกันแต่ต่างสปีชีส์ได้ เช่น *Spodoptera spp.* อังคณา กระจ่าง (2547) ใช้เทคนิค RAPD วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของหนอนใยผักซึ่งเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่าง ๆ ของประเทศไทย

การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลงในกลุ่มของนิวกีโพลีโคโนไวรัส พบว่า *AcMNPV* เท่านั้นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์โดยสร้างผลึกโปรตีนในนิวเคลียส ส่วน *GmMNPV* ทำให้เซลล์ผิดปกติแต่ไม่พบผลึกโปรตีนในนิวเคลียส สำหรับไวรัสในกลุ่มไซโตพลาสติกโพลีโคโนไวรัส พบว่า *EsCPV* เท่านั้นที่สามารถจำลองตัวได้โดยสร้างผลึกโปรตีนในไซโตพลาสซึม Kadir *et al.* (1999a,b) กล่าวว่า *GmMNPV* และ *AcMNPV* เป็นไวรัสที่ทำให้หนอนใยผักเป็นโรคได้

การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 ต่อการตอบสนองสารพิษเอ็นโดท็อกซินของ *Bt* จากสูตรการค้า 3 ชนิด พบว่าเซลล์ไลน์ตอบสนองสารพิษ *Bt* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide<sup>®</sup> ได้ดีที่สุดในระดับ TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 0.128 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> ที่ระดับ TCTD<sub>50</sub> เท่ากับ 10.900 และ 14.242 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt* ชนิดต่างๆ ระหว่างเซลล์ไลน์ KMITL-PX-E1 SE-1 และ KMITL-HA-E1 พบว่าเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิดตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide<sup>®</sup> ได้ดีที่สุดในระดับ TCTD<sub>50</sub> ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เนื่องจากสารพิษ *Bt* สูตร Thuricide<sup>®</sup> ผลิตจาก *Bt* สายพันธุ์ var. *kurstaki* ที่สร้างผลึกโปรตีนเอ็นโดท็อกซินชนิด *Cry1Aa*, *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry2A*, *Cry2B* ซึ่งเป็นผลึกโปรตีนที่เป็นพิษต่อหนอนใยผัก (Mohan and Gujar. 2001 ; Chilcott and Wigley. 1993) สารพิษ *Bt* สูตร Teknar-HDP<sup>®</sup> ผลิตจาก *Bt* สายพันธุ์ var. *israelensis* ที่สร้างผลึกโปรตีนเอ็นโดท็อกซินชนิด *Cry4A*, *Cry4B* และ *Cry4D* ซึ่งไม่เป็นพิษต่อหนอนใยผักแต่เป็นพิษต่อยุง (Chilcott and Ellar. 1988) และสารพิษ *Bt* สูตร Trident<sup>®</sup> ผลิตจาก *Bt* สายพันธุ์ var. *tenebrionis* ที่สร้างผลึกโปรตีนเอ็นโดท็อกซินชนิด *Cry III* ที่เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงใน Order Coleoptera เท่านั้น (Chilcott and Wigley. 1993) เซลล์ไลน์ KMITL-PX -E1 และ SE-1 ตอบสนองต่อสารพิษ Teknar-HDP<sup>®</sup> และ Trident<sup>®</sup> ที่ระดับ TCTD<sub>50</sub> ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1

## บรรณานุกรม

- ณรรฐพล วลัยลักษณ์. 2526. *แมลงศัตรูพืชของประเทศไทย*. กรุงเทพฯ : ภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปิยรัตน์ เขียนมีสุข และจักรพงษ์ พิริยพล. 2534. “แผนเบียนศัตรูธรรมชาติของหนอนใยผักที่นำจับตามอง.” *วารสารกีฏและสัตววิทยา*. 13(2): 105-107.
- ปิยรัตน์ เขียนมีสุข และจักรพงษ์ พิริยพล. 2542. “แมลงศัตรูผัก” ใน *เอกสารวิชาการกลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ* กรุงเทพฯ : ภาควิชากีฏและสัตววิทยา. 22(1) : 49-52
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539. *โรควิทยาและแมลง*. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.
- พิสมัย ขวลิขิตพร. 2538. “แนวทางการบริหารหนอนใยผัก.” *วารสารกีฏและสัตววิทยา*. 17(1) : 43-46.
- รำไพ สุขสวัสดิ์ ณ อยุธยา. 2533. *สถิติการวิจัย*. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชัยเจริญ
- สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2542. “รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้ายด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์.” กรุงเทพฯ : สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. เอกสารอัดสำเนา.
- สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2543. “การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง.” หน้า 1-30 ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรมการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงและการประยุกต์ใช้*. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.
- สุดาวรรณ เขยชมศรีและคณะ. 2547. “เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน.” หน้า 51-60 ใน *เอกสารประกอบการฝึกอบรมการประยุกต์ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแมลงเพื่องานวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพ*. นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- สาโรช เจริญศักดิ์. 2546. “การสร้างเซลล์ไลน์และคุณสมบัติบางประการของเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hübner).” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สายชล สีนสมบูรณ์ทอง. 2546. *สถิติกับการวางแผนการทดลองทางการเกษตร*. พิมพ์ครั้งที่ 3 กรุงเทพฯ : ภาควิชาสถิติประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. *พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อัจฉรา ตันติโชค. 2534. “แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับแมลง.” หน้า 154-164 ใน เอกสารวิชาการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. พิมพ์ครั้งที่ 1 กรุงเทพฯ : กรมวิชาการ เกษตร.
- อังคณา กระช่าง. 2547. “การวิเคราะห์พันธุกรรมของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ด้วยเทคนิค RAPD.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อุดมพร แพ่งนคร. 2539. “การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากรากหญ้าแฝกที่มีต่อหนอนใย ผัก.” วารสารเกษตร. 12(2) : 140-145.
- อนันต์ สกุดเดิม. 2540. “แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำ.” หน้า 183-185 ใน เอกสารคำสอนราย วิชาแมลงสำคัญของเศรษฐกิจ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา.
- Adams, J.R. and McClintock, J. T. 1991. “Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Virus. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Virus of Insects.” 87-204. In Adam, J.R. and Bonami, J.R. Atlas of Invertebrate Viruses. London : CRC Press. Inc.
- Anagnou-Veroniki, M. et al. 1997. “A Nonoccluded Reovirus of the Olive Fly, *Dacus oleae*.” J. Gen. Virol. 161 : 259-263.
- Arella, M. et al. 1988. “Molecular Cloning and Characterization of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Polyhedrin and a Viable Deletion Mutant Gene.” J. Virol. 62 : 211-215.
- Baines, D. et al. 1997. “Comparison of the Response of Midgut Epithelial Cells and Cell Lines from Lepidopteran Larvae CryIA Toxins from *Bacillus thuringiensis*.” J. Insect Physiol. 43 : 823-831
- Belloncik, S. 1989. “Cytoplasmic Polyhedrosis Virus–Reoviridae.” Adv. Virus Res. 37 : 173.
- Belloncik, S. 1996. “Interactions of Cytoplasmic Polyhedrosis Virus with Insect.” Adv. Insect Physiol. 26 : 235-240.
- Belloncik, S. et al. 1996. “Identification and Characterization of a New Cypovirus, Type 14, Isolate from *Heliothis armigera*.” J. Invertebr. Pathol. 67 : 41-46.
- Belloncik, S. and Mori, H. 1998. “Cypovirus. 337-369. In Miller, L.K. and Andrew Ball, L. The Insect Viruses. New york : Plenum Press.
- Bradford, M.M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Printiple of Protein – dry Binding.” Anal. Biochem. 72 : 248-254.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Burgess, S. 1977. "Molecular Weight of lepidopteran Baculovirus DNAs : Derivation by Eletron Microscopy." **J. Gen. Virol.** 37 : 501-510.
- Chao, J. and Ball, G.H. 1971. "Acell Line Isolate from Hemocytes of *Samica cynthia* Pupae." **Curr. Topics Microbial. Immunol.** 55 : 28-33.
- Charlton, C.A. and Volkman, L.E. 1991. "Sequential Rearrangement and Nuclear Polymerization of Actin in Baculovirus-Infected *Spodoptera frugiperda* Cells." **J. Virol.** 65 : 1219-1227.
- Charpentier, G. *et al.* 1995. "Establishment and Characterization of Three Cell Lines from *Aedes triseriatus*(Diptera : Culicidae)." **J. Med. Entomol.** 32(6) : 793-800.
- Chen, J.S. and Sun C.N. 1986. "Resistance of diamondback moth (*Plutella xylostella*) (lepidoptera : Plutellidae) to a combination of fenvalerate and piperonyl butoxide." **J. Econ. Entomol.** 79(1) : 22-30.
- Cheng, E.Y. 1981. "Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. II. A survey (1980-81)." **J. Agri. Res. Chaina.** 30 : 277-284.
- Chilcott, C.N. and Ellar, D.J. 1988. "Comparative study of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*." **J. Gen. Microbiol.** 134 : 2551-2558.
- Chilcott, C.N. and Wigley, P.J. 1993. Programme and Abstracts, Second Canberra *Bacillus thuringiensis* Meeting, 21-23 September 1993. Australia.
- Chisholm, G.E. and Henner, D.J. 1988. "Multiple Early Transcripts and Splicing of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus IE-1 Grne." **J. Virol.** 62 : 3193-3200.
- Cochran, M.A. *et al.* 1986. "organization and expression of the Baculovirus genome." 108-216 In Granados, R.R. and Fedderici, B.A. **The Biology of Baculovirus.** Florida : Boca Raton, CRD Press.
- Cunningham, J.C. and Longworth, J.F. 1968. "The Identification of Some Cytoplasmic Polyhedrosis Virus." **J. Invertebr. Pathol.** 11 : 196-202.
- Fossiez, F. *et al.* 1989. "Nucleotide Seguence of the Polyhedrin Gene of *Euxoa scandens* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (*EsCPV*)." **Virology.** 169 : 462-467.
- Fraser, M.J. 1986. "Ultrastructure Observations of Viron Maturation in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Culture." **J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.** 95 : 189-195.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Galinski, M.S. *et al.* 1994. "Analysis of the C Polyhedrin Genes from Different Geographical Isolates of a Type 5 Cytoplasmic Polyhedrosis Virus." **J. Gen. Virol.** 75 : 1969-1972.
- Gaw, Z.Y. *et al.* 1959. "Tissue culture methods for the cultivation of virus grasserie. **Acta. Viral. Engl. Ed.** 3 : 55.
- Goldschmidt, R. 1915. "Some experiments on spermatogenesis in vitro." **Pro.Natl. Acad. Sci. USA.** 2 : 220.
- Goodman, C.L. and McIntosh, A. H. 1994. "Production of Baculovirus for Insect Control using Cell Culture." 33-56. In Maramorosch, K. and McIntosh, A.H. **Insect Cell Biotechnology.** Florida : Boca Raton.
- Grace, T.D.C. 1954. "Culture of insect tissue." **Nature.** 174 : 187.
- Grace, T.D.C. 1962 "Cultured cells in virus research." 321-346. In A.J. Gibbs, (ed.), **Virus and Invertebrates.** Amsterdam : North-Holland Publishing Company.
- Grace, T.D.C. 1973. "Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissue Grown *In vitro.*" **Nature.** 195 : 788-789.
- Granados, R.R. 1978. "Early events in the infection of *Heliothis zea* midgut cells by a baculovirus." **Virology.** 90 : 170-174.
- Granados, R. R. and Williams, K. 1986. "In vivo infection and replication of Baculovirus." pp 89-108. In **The Biology of Baculoviruses**, Vol. 1 eds. R. Granados, and B. Fedderic . Boca Roton, Fla : CRC Press.
- Griggs T.G. and Talekar N.S. 1986. **Diamondback moth management.** Asian Vegetable Research and Development Center, Tainan, Taiwan.
- Harrap, K . 1972b. "The Structure of Nuclear Polyhedrosis Virus III Virus Assembly." **Virology.** 50 : 136-139.
- Harrap, K. and Longworth, J. 1974. "An Evaluation of Purification Methods for Baculoviruses." **J. Invertebr. Pathol.** 24 : 55-62.
- Harcourt, D.G. 1957. "Biology of the Diamondback Moth, *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lepidoptera : Plutellidae), in Eastern Ontario. II. Life-History, Behavior, and Host Relationships." **Can. Entomol.** 89 : 554-564.
- Hardy, J.E. 1938. "*Plutella maculipennis* Curt., its natural and biological control in England." **Bull. Entomol. Res.** 29 : 343-372.

- Haymer, D.S. *et al.* 1992. "Genetic Variation between Strain of the Mediteranean Fruit Fly, *Ceratitits capaitata*, Detected by DNA Fingerprinting." **Genome**. 35 : 528-533.
- Hink, W.F. and Ignoffo, C.M. 1970. "Establishment of a new cell line (IMC-HZ-1) from ovaries of cotton bollworm moth, *Heliothis zea* (Boddie). **Exotl. Cell Res.** 60 : 307-309.
- Hink, W.E. and Strauss, E. 1976. "Replication of Alfalfa looper Nuclear Polyhedrosis Virus in The *Trichoplusia ni* (TN-368) Cell Line." 369-374. In Kurstak, E. and maramorosch, K. **Invertebrate Tissue Culture, Applications in Medicine, Biology and Agriculture.** New York ; Academic Press.
- Ho, T.H. 1965. "The life-history and control of the diamondback moth in Malaya." **Bull. Div. of Agric.** No. 118 : 1-26.
- Höfte, H. and Whiteley, H.R. 1989. "Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*." **Microbiol. Rev.** 53 : 242-255.
- Huang, Y.S. *et al.* 1982. "Characterization of the DNA of a nonoccluded baculovirus, Hz-1V." **J. Viral.** 43 : 174-181.
- Hue, H.T. 1965. "The Life-history and Control of the diamondback moth in Malaysia." **Malaysia Minist Agr. Crop. Bull.** 118(3) : 1-26.
- Hughes, P.R. and Wood, H.A. 1981. "A Synchronous Peroral Technique for the Bioassay of Insect Viruses." **J. Invertebr. Pathol.** 37 : 154-159.
- Hukuhara, T. and Bonomi, J.R. 1992. "Reoviridae." 394-430. In Adam, J.R. and Bonami, J.R. **Atlas of Invertebratec Viruses.** Florida : Boca Raton, CRD Press.
- Hunter-Fujita, F.R. *et al.* 1998. **Insect Viruses and Pest management.** New York : John Wiley and Sons.
- Inoue, H. and Mitsuhashi, J. 1985. "futher Establishment of Continuous Cell Line from Larval Fat Bodies of the Cabbage armyworm, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera : Noctuidae)." **Appl. Entomol. Zool.** 20 : 496-501.
- Keddie, B.A. *et al.* 1995. "Eatablishment and Characterization of Three *Malocosoma disstria* Cell Lines." **J. Invertebr. Pathol.** 66 : 136-142.
- Kelly, D. 1981. "Baculovirus Replication ; electron Microscope of the sequence of Infection of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus in *Spodoptera frugiperda* Cell." **J. Gen. Virol.** 52 : 209-219.

- Knudson, D. and Harrap, K. 1976. "Replication of Nuclear Polyhedrosis Virus in a Continuous Cell Culture of *Spodoptera frugiperda* : Microscopy Study of the Sequence of Event of the Virus Infection." **J. Virol.** 17 : 254-268.
- Kobayashi, M. 1971. "Replication of cytoplasmic polyhedrosis virus observed with the electron microscopy." 103-127. In Aruga, H. and tanada, Y. **The Cytoplasmic Polyhedrosis of The Silkworm.** Tokyo : University of Tokyo Press.
- Lee, S.H. and Hou, R.F. 1992. "Eastablishment of Cell Line Derived from Embryos of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.)." **J. Invertebr. Pathol.** 59 : 174-177.
- Lery, X. *et al.* 2003. "Characterization and authentication of Insect cell lines using RAPD markers." **Insect Biochem. Molec. Biol.** 33 : 1035-1041.
- Lereclus, D. *et al.* 1993. "Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxin and gene." 37-69. In Enttwistle, P.E. *et al.* **Bacillus thuringiensis, An Envirument Biopesticide.** Chichester : John Wiley and Son, Ltd.
- Lewandoski, L. J and Traynor, B.L. 1972. "Comparison of the Structure and Polypeptide Comparison of Three Double-Stranded Ribonucleic Acid Containing Viruses (Diplona Viruses) : Cytoplasmic Polyhedrosis Virus, Wound Tumor Virus and Reovirus." **J. Virol.** 10 : 1053-1057.
- Liu, M.Y. *et al.* 1982. "Insecticide resistance in the diamondback moth." **J. Econ. Entomol.** 75 : 153-155.
- Lynn, D.E. *et al.* 1982. "Eastablishment of Cell Line from Lepidopteran Wing Disce : Induction of Newly Synthesized Protein by Hydroxyecdysone." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 79 : 2589-2592.
- McAteer, J.A. and Davis, J. 1994. Basic cell culture technique and the maintenance of cell line. In **Basic Cell Culture. A Practical Approach.** Oxford : Oxford University Press. 93-148.
- McIntosh, A.H. *et al.* 1996. "Identification of Insect cell line by DNA amplification fingerprinting (DAF)." **Insect Mol. Biol.** 5(3) : 187-195.
- McKenna, K.A. *et al.* 1998. "Eastablishment of New *Trichoplusia ni* Cell Line in Serum-Free Medium for Baculovirus and Recombinant Protein Production." **J. Invertebr. Pathol.** 71 : 82-90.

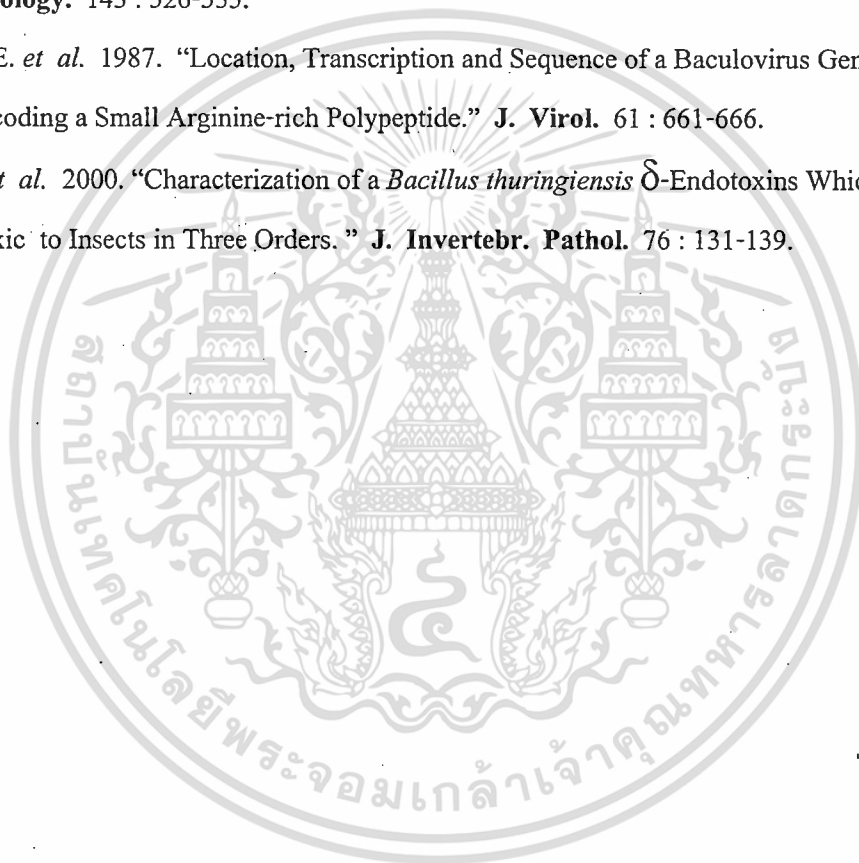
- Miltenburger, H.G. *et al.* 1984. "The Cellular Substrate : A Very Important Requirement For Baculovirus In vitro Replication." **Z. Naturforsch.** 39 :993-998.
- Misuhashi, J. 1966. "Tissue Culture of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae) II. Morphology and In vitro Cultivation of Hemocytes." **App. Entomol. Zool.** 1 : 5-10.
- Misuhashi, J. 1981. "Establishment and Some Characteristics of Continuous Cell Lines Derived from fat Bodies of the Cabbage armyworm (Lepidoptera : Noctuidae)." **Dev. Growth Differ.** 23 : 63-67.
- Misuhashi, J. 1982. "Continuous Cultures of Insect Cell Lines in Medium Free of Sera." **App. Entomol. Zool.** 17 : 575-581.
- Misuhashi, J. 1983. "Continuous Cell Lines Derived from fat Bodies of the Common armyworm, *Leucania separata* (Lepidoptera : Noctuidae)." **App. Entomol. Zool.** 18 : 533-539.
- Miyajima, S. and Kawase, S. 1968. "Changes in Virus Infectivity Titer in the Hemolymph and Midgut During the Course of a Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of the Silkworm." **J. Invertebr. Pathol.** 12 : 329-334.
- Mohan, M. and Gujar G.T. 2001. "Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Strains and Commercial formulation to the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)." **Crop Protection.** 20 : 311-316.
- Mori, H. *et al.* 1989. "Nucleotide Sequence of Polyhedrin Gene of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus A Strain with Nuclear Localization of polyhedra." **J. Gen. Virol.** 70 : 1,885-1,890.
- Murphy, F.A. *et al.* 1995. "Virus Taxonomy : Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." **Arch. Virol. Suppl.** 10.
- Nei, M. and Li, W. 1979. "Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 76 : 5269-5273.
- Neilson, M.M. 1964. "A Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Patogenic for a Number of Lepidopterous Hosts." **J. Insect Pathol.** 6 : 41-52.
- Neilson, M.M. 1965. "Effect of a Cytoplasmic Polyhedrosis on Adults Lepidoptera ." **J. Insect Pathol.** 7 : 306-309.

- Ohasawa, S. *et al.* 1985. "Insecticides susceptibility of the diamondback moth in Fukushima prefecture." **Rev. Appl. Entomol. Ser. A.** 73(1) : 876.
- O' Reilly, D.R. *et al.* 1992. **Baculovirus Expression Vector, A Laboratory Manual.** New York : W.H.Freeman and Company.
- Payne, C.C. and Kalmakoff, J. 1974. "Biochemical Properties of Polyhedra and Virus Particles of the Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of *Bombyx mori*." **Invervirology.** 4 : 354-358.
- Pering F.S. *et al.* 1988. "Teflubenzuron resistance in diamondback moth." **J. Econ. Entomol.** 8 : 1277-1282.
- Raghow, R. and Grace, T. 1974. "Studies on a Nuclear Polyhedrosis Virus in *Bombyx mori* Cell in vitro." **J. Ultrastruc. Res.** 47 : 384-399.
- Sato, T. 1989. "Establishment of Eight Cell Lines From Neonate Larvae of Tortricides (Lepidoptera) and Their Several Characteristics including Susceptibility to Insect Viruses." 187-198. In Mitsuhashi, J. **Invertebrate Cell System Application.** Vol. 2. Florida : CRC Press, Boca Raton.
- Schnepf, E. *et al.* 1998. "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62 : 775-806.
- Shelton A.M. *et al.* 1993. "Resistance of diamondback moth (Lepidoptera : Plutellidae) to *bacillus thuringiensis* subspecies in the field." **J. Econ. Entomol.** 86 : 697-705.
- Shin, C.J. *et al.* 1997. "Establishment of Cell Lines From *Spodoptera litura* (Lepidoptera : noctuidae) and replication of *S. litura* Nuclear Polyhedrosis Virus *In vitro*." **J. Invertebr. Pathol.** 69 : 1-6.
- Sinchaisri *et al.* 1988. "Botanical repellent against the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.)." **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 22(5) : 71-74.
- Smith, K.M. and Rivers, C.F. 1956. "Some Viruses Affecting Insects of Economic Importance." **Parasitology.** 46 : 235-242.
- Smith, G.E. and Summer, M.D. 1978. "Analysis of baculovirus genomes with restriction endonucleases." **Virology.** 89 : 517-527.
- Stanley, M.S.M. and Vaughn, J.L. 1968. "Origin of migration Cells in Culture of Moth Ovarian Tissue based on Developmental Stages Production Optimum Outgrowth." **Ann. Entomol. Soc. Am.** 61 : 1067-1072.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Stoltz, D. *et al.* 1973. "Nuclear Polyhedrosis Virus : A Possible Example for de novo Intranuclear Membrane Morphogenesis." **J. Gen. Virol.** 19 : 145-150.
- Sudeep, A.B. *et al.* 2002. "A New cell line from the embryonic tissue of *Helicoverpa armigera* HBN. (Lepidoptera : noctuidae)." **In Vitro Cell Biol.-Animal.** 38 : 262-264.
- Sudderuddin K.I. and Kok P.F. 1979. "Insecticide resistance in *Plutella xylostella* collected from the Cameron highlands of Malaysia." **Rev. Appl. Entomol. Ser. A.** 67(7) :349.
- Summer, M.D. 1971. "Electron Microscopic Observation of Granulosis Virus Entry, Uncoating and Replication Process during infection of the Midgut Cells of *Tricoplusia ni*." **J. of Ultrastructure Reseach.** 35 : 606-625.
- Summer, M. and Anderson, D. 1972. "Granulosis virus deoxyribonucleic acid : a closed double-standed molecule." **J. Virol.** 9 : 710-713.
- Sun *et al.* 1978. "Diamondback moth resistance to diazinon and methomyl in Taiwan." **J. Econ. Entomol.** 71 : 551-554.
- Tabachnick, W.L. and Knudson, D.L. 1980. "Characterization of Invertebrate Cell Line II. Isozyme Analysis Employing Starch Gel Electrophoresis." **In vitro.** 16 : 392-398.
- Thomas, W.E. and Ellar, D.J. 1983. "Bacillus thuringiensis var israelensis Crystal  $\delta$  - endotoxin : effects on Insect and Mammalian Cells *In vitro* And *In vivo*." **J. Cell Sci.** 60 : 181-197.
- Thiery, I. And Frachon, E. 1997. Identification isolation culture and preservation of entomopathogenic bacteria. In : Lacey, L.A. (Ed.), Manual of Techniques in Insect Pathology. Academic Press. London, pp. 55-78.
- Trager, W. 1935. "Cultivation of the virus of grasserie in silkworm tissue culture." **J. Exp. Med.** 61 : 501.
- Tweeten, K. A. *et al.* 1980. "Characterization of an Extremely Basic Protein Derived from Granulosis Virus Nucleocapsids." **J. Virol.** 33 : 866-876.
- Vaughn, J.L. 1976. "The Production of Nuclear Polyhedrosis Virus in Large Volume Cell Cultures." **J. Invertebr. Pathol.** 28 : 233-237.
- Vaughn, J.L. 1994. "Lepidopteran Cell Culture." 37-50. In Maramorosch, K. and McIntosh, A.H. **Arthropod Cell Culture System.** Florida : CRC Press, Boca Raton.
- Vialard, S.E. *et al.* 1995. "Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses." 1-24. in Richardson, C.D. **Baculovirus Expression Protocol.** New Jersey : Humana Press.

- Volkman, L.E. 1986. "The 64-k Envelope Protein of Budded *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus." 103-118. In Doerfler, W. and Boehm, P. **Current topics in Microbiology and Immunology**. Berlin : Springer-Verlag.
- Wang, H.H. *et al.* 1996. "Continuous Cell Line from Pupal Ovary of *Perina nuda* (Lepidoptera : Lymantriidae) That is Permissive to Nuclear polyhedrosis Virus From *P. nuda*." **J. Invertebr. Pathol.** 67 : 199-204.
- Wilson, M.E. and Consigli, P.A. 1986. "Function of a Protein Kinase Activity Associated with Purified Capsids of the Granulosis Virus Infecting *Plutia interpunctella*." **Virology**. 143 : 526-535.
- Wilson, M.E. *et al.* 1987. "Location, Transcription and Sequence of a Baculovirus Gene Encoding a Small Arginine-rich Polypeptide." **J. Virol.** 61 : 661-666.
- Zhong, C. *et al.* 2000. "Characterization of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins Which Is Toxic to Insects in Three Orders." **J. Invertebr. Pathol.** 76 : 131-139.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก.

# การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์แมลงและสารเคมี

### 1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่ใช้ในการทดลองนี้คือ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสำเร็จรูปเกรซชนิดผง มาละลายน้ำ deionized ปริมาตร 900 มิลลิลิตร

2. ใส่โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.35 กรัม ใช้แท่งแม่เหล็กกวนให้ละลาย

3. ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0-6.1 ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized

4. นำมากรองบนตัวกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร ขั้นตอนนี้ทำในตู้ปลอดเชื้อ

5. เติมน้ำตามยี่สิบเข็มขึ้น 40 มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เรียกอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงนี้ว่า Incomplete medium

6. นำแลคทาลบูมินไฮโดรไลสเททเข้มข้น 1X และอีสโตเลทเข้มข้น 1X ซึ่งได้มาจากการนำแลคทาลบูมินไฮโดรไลสเททเข้มข้น 50X และอีสโตเลทเข้มข้น 50X มาทำให้เจือจางด้วย Incomplete medium แล้วนำมากรองบนตัวกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตรอย่างละ 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

7. นำซีรัมที่กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร และบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

8. นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2. บัฟเฟอร์ Lifton grind (Lifton grind buffer)

ประกอบด้วย ซูโครส 6.8 กรัม EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร Tris, เข้มข้น 1 โมลาร์ค่าความเป็นกรดต่าง 9.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ SDS เข้มข้น 105 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมทั้งหมดรวมกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ เป็น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร

### 3. โฟสเฟตเซียมอะซิเตต เข้มข้น 8 โมลาร์

ชั่งโฟสเฟตเซียมอะซิเตต 39.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วและปรับปริมาตรให้ได้

50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. โซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 3 โมลาร์

ชั่งโซเดียมอะซิเตต 408.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 6.0 ด้วยกรดอะซิติกเข้มข้น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

#### 5. สารละลายฟีนอลที่อิมัตว์ด้วยบัฟเฟอร์ TE

นำฟีนอลมาหลอมให้ละลายที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส โดยเติมบัฟเฟอร์ TE ลงไปด้วยปริมาณเท่าปริมาณเดิมของฟีนอลเข้าไปให้เข้ากัน ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อได้สารละลายที่อิมัตว์แล้ว คูดส่วนน้ำชั้นบนทิ้งเก็บส่วนล่างไว้ในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

#### 6. บัฟเฟอร์ TE (TE buffer) (Tris-HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่า pH 8.0 และ EDTA เข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์)

ชั่ง Tris-HCl 1.211 กรัม และ EDTA 0.372 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับค่า pH 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

#### 7. บัฟเฟอร์ TBE (TBE buffer) เข้มข้น 10 เท่า (Tris-HCl เข้มข้น 89 มิลลิโมลาร์ ค่า pH 8.3 กรดบอริก เข้มข้น 89 มิลลิโมลาร์ และ EDTA เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์)

ชั่ง Tris-HCl 107.8 กรัม กรดบอริก (boric acid) 55 กรัม และ EDTA 9.3 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 8.3 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อโดยการ autoclave เวลานำไปใช้เจือจางเป็น 1 เท่า

#### 8. เอนไซม์โปรตีนเอส เค (Proteinase K)

เตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในน้ำกลั่น เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส และจะใช้ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.8 EDTA เข้มข้น 5.0 มิลลิโมลาร์ และ SDS เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

#### 9. เอนไซม์อาร์เอ็นเอส เอ (RNase A)

ชั่งอาร์เอ็นเอส เอ 100 มิลลิกรัม และละลายในสารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี Tris-HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ค่า pH 7.5 และ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 15.0 มิลลิโมลาร์ ผสมอยู่คัมในน้ำเดือด 15 นาที (ระวังอย่าให้สารละลายเอนไซม์อยู่ต่ำกว่าระดับน้ำเดือด) ปล่อยให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แบ่งเป็นหลอด ๆ ละ 100-500 ไมโครลิตร เก็บที่-20 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้จะยังทำงานได้ดี แม้จะผ่านการละลาย (freeze-thaw) หลาย ๆ ครั้ง

## 10. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976)

วิธีการเตรียม Bradford dye (5x)

ละลาย comassien blue G-250 100 มิลลิกรัม ในเอทานอลปริมาตร 50 มิลลิตร แล้วเติมด้วยกรดฟอสฟอริก เข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 100 มิลลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำการเจือจางสี Bradford dye ด้วยน้ำกลั่นในอัตรา สี่ : น้ำ เท่ากับ 1 : 4 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร
2. นำสีที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลอง 2.5 มิลลิตร
3. เติมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ข้อ 2 ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน
5. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Bovine serum albumin ความเข้มข้น 0 25 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร โดยทำตามวิธีในข้อ 2-4 พล็อต กราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสง(แกน y) และค่าความเข้มข้น (แกน x)

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนสำหรับการทดลอง  
แบบแฟคทอเรียลสองสิ่งทดลอง

ชนิดของเซลล์ไลน์	ค่าTCTD <sub>50</sub> (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)					
	Thuricide®		Teknar-HDP®		Trident®	
KMITL-PX-E1	0.125	0.130	12.335	9.464	14.734	13.740
SE-1	0.526	0.761	11.864	11.864	13.740	15.480
KMITL-HA-E1	1.136	0.901	27.678	25.302	37.155	36.120

$A_1, A_2, \dots, A_a$  เป็นกลุ่มย่อยของสิ่งทดลอง A

$B_1, B_2, \dots, B_b$  เป็นกลุ่มย่อยของสิ่งทดลอง B

$n$  = ขนาดตัวอย่าง

$ab$  = จำนวนชุดของตัวอย่าง

$x_{ijk}$  = ข้อมูลสำหรับ  $A_i, B_j$  หน่วยที่  $k$

$T_{i.}$  = ผลรวมของสิ่งทดลอง A ที่  $i$

$T_{.j}$  = ผลรวมของสิ่งทดลอง B ที่  $j$

$T_{..k}$  = ผลรวมของแถวที่  $k$

$T_{...}$  = ผลรวมของทั้งหมด

$T_{ij.}$  = ผลรวมของตัวอย่างที่  $ij$

$$\text{การคำนวณ } K = \frac{T_{...}^2}{abn}$$

$$SS_T = \sum \sum \sum x_{ijk}^2 - K$$

$$SS_i = \sum \sum \frac{T_{ij.}^2}{n} - K$$

$$SS_a = \sum \frac{T_{i.}^2}{bn} - K$$

$$SS_b = \sum \frac{T_{.j}^2}{an} - K$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$SS_{b_1} = \sum \frac{T_{..k}^2}{ab} - K$$

$$SS_{ab} = SS_T - SS_a - SS_b$$

การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทางสำหรับตัวอย่างเชิงสัมพันธ์

$$SS_e = SS_T - SS_T - SS_{b_1}$$

การวิเคราะห์ความแปรปรวนสองทางสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลสองสิ่งทดลอง ตัวอย่างเชิงสัมพันธ์ มีตารางวิเคราะห์ดังนี้

แหล่งความคลาดเคลื่อน	df	SS	MS = $\frac{SS}{df}$	F
ตัวอย่าง	ab-1	SS <sub>T</sub>	-	-
A	a-1	SS <sub>a</sub>	MS <sub>a</sub>	MS <sub>a</sub> /MS <sub>e</sub>
B	b-1	SS <sub>b</sub>	MS <sub>b</sub>	MS <sub>b</sub> /MS <sub>e</sub>
AB	(a-1)(b-1)	SS <sub>ab</sub>	MS <sub>ab</sub>	MS <sub>ab</sub> /MS <sub>e</sub>
ความคลาดเคลื่อน	(n-1)(ab-1)	SS <sub>e</sub>	MS <sub>e</sub>	-
ผลรวม	abn-1	SS <sub>T</sub>	-	-

ที่มา : ราไพ สุขสวัสดิ์ ณ อยุธยา. (2533)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (Coefficient of variation :CV)

$$C.V. = \frac{\sqrt{MSE}}{\bar{X}} \times 100\%$$

### การทดสอบแบบพิสัยเชิงพหุของดันแคน (Duncan's New Multiple Range Test)

คำนวณค่าสถิติที่ใช้ในการทดสอบ คือ

$$LSR_{\alpha} = r_{\alpha}(p, f_e) \sqrt{\frac{MSE}{2} \left( \frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_j} \right)} : r_i \neq r_j$$

$$= r_{\alpha}(p, f_e) \sqrt{\frac{MSE}{r}} : r_i = r_j$$

เมื่อ  $r_{\alpha}(p, f_e)$  คือ ค่าวิกฤตของพิสัยเชิงพหุของดันแคนที่ระดับนัยสำคัญ  $\alpha$  โดยที่  $p$  คือค่าเฉลี่ยในช่วงการเปรียบเทียบ ซึ่งเท่ากับผลต่างของอันดับ +1 และมีจำนวนองศาความเป็นอิสระของความคลาดเคลื่อนเท่ากับ  $f_e$

MSE คือ ค่าเฉลี่ยกำลังสองของความคลาดเคลื่อนในตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

$r_i, r_j$  คือ จำนวนซ้ำของทรีทเมนต์ที่  $i$  และ  $j$  ที่ต้องการเปรียบเทียบตามลำดับ

ที่มา : สายชล สตินสมบูรณ์ทอง. (2546)