สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

โครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544

เรื่อง

การสร้างกลุ่มเซลล์เบื้องต้นและเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้าย [*Helicoverpa armigera* (Hubner)]

ESTABLISHMENT OF PRIMARY CULTURES AND CELL LINES FROM EMBRYONIC TISSUE OF THE COTTON BOLLWORM [*Helicoverpa armigera* (Hubner)]

โดย

ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์

Dr. OUNRUAN PETCHARAWAN

นาย สาโรช เจริญศักดิ์

Mr. SAROJ CHAROENSAK

Professor Dr. SERGE BELLONCIK

RCH
SB
608
C8
ส831ค
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 54240
วัน,เดือน,ปี 5 ส.ค. 2548

เสนอต่อ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

และบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

b 11741216
i

บทคัดย่อ

เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 สร้างจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hubner) โดยเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 % และบ่มที่อุณหภูมิ 28 ° ซ หลังจากปลูกเนื้อเยื่อได้นาน 107 วัน จึงทำการถ่ายเซลล์เป็นครั้งแรก และบัดนี้ (เดือนพฤษภาคม 2546) ได้ถ่ายเซลล์มาแล้ว 80 พาสเสจ (passage) อย่างไรก็ตามการถ่ายเซลล์จากพาสเสจ (passage) ที่ 7 ถึงพาสเสจ (passage) ที่ 33 ได้ปรับเปลี่ยนมาเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 10 % หลังจากถ่ายเซลล์พาสเสจ (passage) ที่ 33 เป็นต้นมาได้นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด TC-100 ซึ่งเสริมด้วยซีรัม 10 % กลุ่มเซลล์เริ่มแรกประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่าง 4 แบบ คือ fibroblast-like cells, epithelial-like cells, myoblast-like cells และ companion cells อย่างไรก็ตามพบว่าเซลล์ไลน์พาสเสจ (passage) ที่ 2 ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่าง 2 แบบ คือ fibroblast-like cells และ epithelial-like cells เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจ (passage) ที่ 49, 60 และ 79 มีช่วงเวลาที่เซลล์เพิ่มปริมาณเป็นสองเท่าอยู่ที่ 55.43, 60.92 และ 40.82 ชั่วโมง ตามลำดับ จำนวนโครโมโซมของเซลล์เพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 48 ถึง 228 โครโมโซม สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ เอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวกำหนด คือ เอนไซม์ esterase, malate dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase ซึ่งมีรูปแบบที่สอดคล้องกันกับระยะหนอนของแมลงชนิดเดียวกันกับที่นำมาใช้สร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก พบว่าเซลล์ไลน์มีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงบางชนิด ได้แก่ *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Es*CPV), *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (*Ac*MNPV) และ *Galleria mellonella* multiple nucleopolyhedrovirus (*Gm*MNPV) จากการทดสอบความเป็นพิษของผลึก delta-endotoxins จาก *Bacillus thuringiensis* สูตรต่าง ๆ (Thuricide®, Teknar-HPD® และ Trident®), destruxins (สารพิษจากเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae*) และสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี ที่มีต่อเซลล์ไลน์ ผลที่ได้คือเซลล์ไลน์มีความไวต่อพิษของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี ($TCTD_{50}$ = 0.013 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารพิษจากเชื้อรา ($TCTD_{50}$ = 0.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ได้ดีที่สุด และผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับสารพิษที่ได้จาก Thuricide® ($TCTD_{50}$ = 2.987 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), Teknar-HPD® ($TCTD_{50}$ = 13.060 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Trident® ($TCTD_{50}$ = 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

A new cell line, KMITL-HA-E1, was established from the embryonic tissue of the American cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner). The tissues were seeded in Grace's medium supplemented with 20 % fetal bovine serum and incubated at 28 °C. The first subcultures was obtained after explanting for 107 days and 80 passages have been made to date (May 2003). However, the subcultures from the 7th to the 33rd passage, were adapted to Grace's medium with 10% fetal bovine serum. After the 33rd passage, the subcultures were seeded in TC-100 medium with 10% fetal bovine serum. Primary culture consisted of four major morphologic types of fibroblast-like cells, epithelial-like cells, myoblast-like cells and companion cells. However, the second passage consisted of two morphologic types of fibroblast-like cells and epithelial-like cells. The continuous cell line of KMITL-HA-E1 at the 49th, 60th and 79th passages showed population doubling time at 55.43, 60.92 and 40.82 hours, respectively. The chromosome number of cultured cells ranged from 48 to 228. The cell line isozymatic profiles were determined by esterase, malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase systems, coinciding with the larvae of the species taken from the same colony. The cell line was found to be susceptible to some insect viruses such as *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Es*CPV), *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus (*Ac*MNPV) and *Galleria mellonella* multiple nucleopolyhedrovirus (*Gm*MNPV). The cytotoxicity of solubilized crystal delta-endotoxins from different *Bacillus thuringiensis* formulations (Thuricide®, Teknar-HPD® and Trident®), destruxins (mycotoxins from *Metarrhizium anisopliae*) and actinomycin-D antibiotic was tested on this cell line. The result showed that the cell line was highly sensitive to actinomycin-D ($TCTD_{50}$ = 0.013 μg/ml) and fungal toxin ($TCTD_{50}$ = 0.287 μg/ml) and high significantly different to Thuricide® ($TCTD_{50}$ = 2.987 μg/ml), Teknar-HPD® ($TCTD_{50}$ = 13.060 μg/ml) and Trident® ($TCTD_{50}$ = 26.753 μg/ml).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนการดำเนินงานวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณสำหรับงบประมาณที่ได้รับในปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 ซึ่งเป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี นอกจากนี้ยังเป็นความสำเร็จในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้พิจารณาเสนอชื่อโครงการต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติเพื่อพิจารณารับทุนวิจัยนี้ ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม ดร.สุดาวรรณ เชยชมศรี คุณอุทัย เกตุนุติ ดร.กนกวรรณ พุ่มพุทรา และ Dr. Pattricia Looby Watts ที่ให้ความอนุเคราะห์ เซลล์ไลน์ของแมลง ไวรัสโรคแมลง ตลอดจนอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เป็นต้น

ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 ขอบเขตของการศึกษา..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 ชีววิทยาของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกา..... 4

2.1.1 ความสำคัญและลักษณะการทำลายพืช..... 4

2.1.2 พืชอาศัย..... 4

2.1.3 ชีวประวัติและรูปร่างลักษณะ..... 4

2.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture)..... 5

2.2.1 รังไข่ (ovary)..... 5

2.2.2 เซลล์เม็ดเลือด (hemecyte)..... 6

2.2.3 ตัวอ่อน (embryo)..... 6

2.2.4 เนื้อเยื่ออื่น ๆ..... 7

2.3 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและความจำเพาะเจาะจงของไวรัสโรคแมลง..... 7

2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง..... 13

2.4.1 อาหารที่เติมซีรัม..... 13

2.4.2 อาหารที่ไม่เติมซีรัม..... 17

2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง..... 18

2.6 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์..... 19

2.7 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus)..... 19

2.7.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส..... 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.2 การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในแมลง..... 22

2.7.3 การติดเชื้อไวรัสนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง..... 22

2.8 ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส (cytoplasmic polyhedrosis virus)..... 24

2.8.1 โครงสร้างของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส..... 24

2.8.2 การติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสในแมลง.....26

2.8.3 การติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง..... 27

2.9 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*..... 28

2.10 เชื้อรา *Metarrhizium anisopliae*..... 39

2.11 ผลของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี (Actinomycin-D) ต่อการเจริญของเซลล์..... 43

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....47

3.1 แมลงและเชื้อโรคแมลง..... 47

3.2 อุปกรณ์..... 47

3.3 สารเคมี..... 49

3.4 วิธีการทดลอง..... 51

3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง..... 51

3.4.2 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน..... 52

3.4.3 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง (subculture)..... 54

3.4.4 การศึกษาการเจริญของเซลล์..... 54

3.4.5 การวิเคราะห์คารีโอไทป์..... 54

3.4.6 การวิเคราะห์ไอโซไซม์..... 55

3.4.7 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลง..... 55

3.4.8 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษ..... 56

3.4.9 การตรวจดูการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดี และสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*..... 57

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 59

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มแรกของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน..... 59

4.2 การศึกษาการเจริญของเซลล์..... 65

4.3 การวิเคราะห์คารีโอไทป์..... 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 การวิเคราะห์ไอโซไซม์..... 69
4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลง..... 71
4.6 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* 77
4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*..... 84
4.8 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี..... 87
4.9 การตรวจดูการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*..... 94
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 96
บรรณานุกรม..... 100
ภาคผนวก..... 113
ประวัติผู้เขียน..... 119

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

2.1 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและชนิดของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แมลงติดเชื้อ..... 10

2.2 เปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง..... 14

2.3 ส่วนประกอบของอาหารชนิด Mitsuhashi and Maramorosch's MM medium..... 17

2.4 สายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *Bt.*. แยกโดยใช้ H-antigen.....30

2.5 ยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่พบใน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ 35

2.6 คุณสมบัติและชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงของ *Bt.* 36

4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมินระดับต่าง ๆ 77

4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโปรตีนของแบคทีเรียสูตรต่าง ๆ 79

4.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในการทดลองแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารพิษจาก *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ 81

4.4 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสารพิษแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละสายพันธุ์..... 82

4.5 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบสารพิษแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละสายพันธุ์ ที่มีผลต่อความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด..... 83

4.6 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*..... 85

4.7 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ ของสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด..... 86

4.8 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารแอคติโนมัยซิน-ดี..... 89

4.9 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ ของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดีต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด..... 89

4.10 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในการทดลองแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารทดสอบ.....90

4.11 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ ...91

4.12 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบสารพิษแต่ละชนิด ที่มีผลต่อความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด..... 92

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสรูปแบบไวรัสอิสระและรูปแบบไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน 21

2.2 ลักษณะโครงสร้างของไวรัสในกลุ่มไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส 25

2.3 เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้เกิดโรคในแมลง 29

2.4 ระยะต่าง ๆ ของการสร้างสปอร์ใน *Bacillus* 32

2.5 ส่วนประกอบของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการเข้าทำลายแมลง 42

2.6 กลุ่มของ conidia ของเชื้อรา *M. anisopliae* 42

2.7 สูตรโครงสร้างของแอคติโนมัยซิน-ดี 44

4.1 ลักษณะรูปร่างของกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (explant) ที่มีอายุ 107 วัน 61

4.2 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 2 62

4.3 ลักษณะรูปร่างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 80 อายุ 3 วัน 63

4.4 โครงสร้างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 64

4.5 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 49, 60 และ 79 และเซลล์ไลน์ HA-831 66

4.6 ลักษณะคารีโอไทป์ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่มีการเจริญในช่วง log phase 68

4.7 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ 70

4.8 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV 73

4.9 ลักษณะของเซลล์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Ac*MNPV 74

4.10 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 อายุ 4 วัน เกิดการติดเชื้อ *Gm*NPV ที่ระยะ 4 วันหลังจากได้รับเชื้อ 75

4.11 ลักษณะของเซลล์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Es*CPV 76

4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 78

4.13 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่แสดงอาการผิดปกติเนื่องจากได้รับสารพิษจาก *Bt.* 80

4.14 แสดงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1ที่มีอาการผิดปกติเมื่อได้รับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* เปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ที่ได้รับอะซิโตน 84

4.15 ลักษณะของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ผ่านไปเป็นระยะเวลา 1 วัน 88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.16 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบกับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมลงศัตรูพืชเป็นปัญหาที่สำคัญมากต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ทั้งนี้เพราะประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อน มีสภาพอากาศเหมาะสมต่อการเพาะปลูกพืชอาหารตลอดทั้งปี จึงประสบปัญหาการระบาดของแมลงศัตรูพืชหลายชนิด หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hubner) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย เนื่องจากแมลงชนิดนี้เข้าทำลายพืชสำคัญทางเศรษฐกิจได้มากกว่า 20 ชนิด และพบการระบาดตลอดทั้งปี (กรมวิชาการเกษตร. 2534 ; อุทัย เกตุนุติ. 2538) และเป็นที่ทราบกันดีว่าประเทศไทยนิยมใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชกันอย่างกว้างขวาง และมักใช้ในปริมาณที่มากเกินความจำเป็น ส่งผลให้เกิดปัญหาแมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงเด่นชัดขึ้น ส่งผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกรในด้านของการเพิ่มต้นทุนการผลิต เนื่องจากต้องฉีดพ่นสารกำจัดแมลงบ่อยครั้งขึ้นและต้องเพิ่มอัตราการใช้สูง นอกจากนี้การใช้สารเคมีกำจัดแมลงในปริมาณที่เพิ่มขึ้นมิได้ทำให้ปริมาณของแมลงศัตรูพืชลดลง แต่กลับทวีปริมาณมากขึ้นและเกิดศัตรูพืชชนิดใหม่เพิ่มขึ้น Melander (1914) ในช่วงต้นศตวรรษที่ 20 ได้มีรายงานเกี่ยวกับการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของแมลงศัตรูพืช โดยพบว่าสารฆ่าแมลงบางชนิดไม่สามารถควบคุมเพลี้ยหอย (San Jose scale) ที่เป็นศัตรูต่อแอปเปิล (Washington State apples) ต่อมาพบว่ามีแมลงศัตรูพืชมากกว่า 500 ชนิด ที่สามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงตั้งแต่หนึ่งชนิดหรือมากกว่า (Croft. 1990) ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงผลภัยของการใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่เกิดกับมนุษย์โดยตรงและส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม จึงมีการศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชแบบต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อลดปริมาณการใช้สารเคมีกำจัดแมลง ดังนั้นการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในประเทศที่พัฒนาแล้ว เพราะเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อผู้ใช้และส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมน้อยมาก และเป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมี นอกจากนี้ยังช่วยลดปัญหาเรื่องแมลงที่ต้านทานต่อสารเคมีได้ (กรมวิชาการเกษตร. 2534 ; DeBach and Rosen. 1991)

หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hubner) เป็นผีเสื้อกลางคืนจัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทย เนื่องจากแมลงชนิดนี้มีพืชอาหารที่กว้างมาก และที่สำคัญคือฝ้าย หนอนเจาะสมอฝ้ายมีลักษณะการเข้าทำลายพืชดังนี้ ตัวเต็มวัยวางไข่บริเวณยอดอ่อน กลีบดอก หรือผลอ่อนของพืช เมื่อหนอนฟักออกจากไข่จะเข้ากัดกินส่วนอ่อนของพืชอาหาร เช่น ยอดอ่อน ตาดอก ดอกตูม ดอกบาน สมอ ฝัก ผล และลำต้น ระยะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอนมีทั้งหมด 5 ระยะ โดยทั่วไปหนอนระยะที่ 4 และ 5 จะทำความเสียหายต่อพืชรุนแรงกว่าหนอนระยะที่ 1 และ 2 นอกจากนี้พบว่าหนอนเจาะสมอฝ้ายสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว จึงเป็นปัญหาต่อการป้องกันกำจัดอย่างมาก ในปัจจุบันมีการใช้นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus, NPV) ในการควบคุมประชากรของหนอนเจาะสมอฝ้าย แต่การเตรียมเชื้อไวรัส NPV นั้นมีความยุ่งยากในการแยกผลึกไวรัสออกจากซากหนอนที่ตาย เนื่องจากไวรัสชนิดนี้ (อุทัย. 2539) ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะเพิ่มปริมาณไวรัส โดยใช้การเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์ของแมลง (สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2542) นอกจากนั้นยังพยายามนำจุลินทรีย์ชนิดอื่นมาใช้เพื่อควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้าย เช่น ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส (Cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV) ซึ่งสามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ของแมลง (Belloncik. 1996) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt.*) และเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae* ซึ่งสามารถนำเซลล์ไลน์มาทดสอบการตอบสนองต่อสารพิษของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ และสารพิษที่ผลิตจากเชื้อราได้ (Belloncik *et al.* 1997) เพื่อนำมาประยุกต์และใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดนี้ต่อไป

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) และเซลล์ไลน์ (cell line) จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryonated egg) ของหนอนเจาะสมอฝ้าย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้ายจาก ดร.สุดาวรรณ เชยชมศรี ฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน นครปฐม และ คุณอุทัย เกตุนุติ กรมวิชาการเกษตร การใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนเพื่อสร้างเซลล์ไลน์นั้นมีข้อดีคือเซลล์ที่ได้จากเนื้อเยื่อชนิดนี้มีความหลากหลาย และปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้มีความพอเพียงต่อการปลูกเซลล์เริ่มแรก (Sato. 1989 ; Vaughn. 1994) ดังนั้นจึงมีประโยชน์ในการทดสอบความอ่อนแอของเซลล์ไลน์ต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลง การทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* การทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* และการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่อสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี (actinomycin-D) ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำเซลล์ไลน์ไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) โดยใช้เนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ (embryonated egg) ของหนอนเจาะสมอฝ้าย

2. เพื่อพัฒนาเซลล์ไลน์ (cell line) ชนิดใหม่ของหนอนเจาะสมอฝ้าย

3. เพื่อศึกษาคุณลักษณะบางประการของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ เช่น ลักษณะรูปร่าง การเจริญเติบโต ชนิดของคารีโอไทพ์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เพื่อทดสอบความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงบางชนิด เช่น *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (*Ha*SNPV), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV), *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (*Gm*MNPV), *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Ha*CPV), *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Es*CPV), *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Cf*CPV), *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Bm*CPV) และ *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Dp*CPV)

5. เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อสารพิษบางชนิดที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt.*) และเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae*

6. เพื่อทดสอบการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นมาได้จากระยะไข่ของผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

2. เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (nucleopolyhedrovirus) ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส (cytoplasmic polyhedrosis virus) สารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (*Bt.*) สารพิษจากเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae* และสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี เพื่อใช้ในการควบคุมหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาเทคนิคการสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกและเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้าย ศึกษาคุณลักษณะบางประการของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ ตลอดจนศึกษาความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสโรคแมลงบางชนิด รวมถึงการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และสารปฏิชีวนะบางชนิด

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อพัฒนาการผลิตเซลล์ไลน์ของหนอนเจาะสมอฝ้ายในประเทศไทย
2. เพื่อใช้ในการศึกษาชีววิทยาของเซลล์แมลงมีประโยชน์ต่อการป้องกันกำจัด
3. เพื่อใช้ในงานเพิ่มปริมาณไวรัสโรคแมลงในหลอดทดลอง
4. สามารถใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของโรคแมลงและสารเคมีฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ
5. เพื่อใช้ศึกษาถึงกลไกการต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงในระดับเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

ผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hubner) เป็นผีเสื้อกลางคืน จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทยในปัจจุบัน และมีแนวโน้มว่าจะเป็นศัตรูพืชที่ร้ายแรงในอนาคต (อุทัย เกตุนุติ. 2534) หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันมีชื่อวิทยาศาสตร์ครั้งแรกว่า *Noctua obsoleta* ต่อมาได้มีการใช้ชื่ออื่น ๆ เช่น *Heliothis obsoleta*, *Chloridea armigera*, *Helicoverpa armigera* (Mabbett. 1983) ปัจจุบันใช้ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Helicoverpa armigera* ส่วนชื่อสามัญที่ใช้เรียก ได้แก่ American bollworm, cotton bollworm, corn earworm และ tomato budworm (สุธรรม อารีกุล และคณะ. 2509 ; Mabbett. 1983)

2.1.1 ความสำคัญและลักษณะการทำลายพืช

หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *H. armigera* เริ่มรู้จักในประเทศไทยตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2503 และสร้างความเสียหายให้แก่ฝ้ายในเมืองไทยในฤดูปลูกตลอดมา เป็นแมลงที่มีการแพร่กระจายทั่วไปในทวีปเอเชีย ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ ทางตอนใต้ของยุโรป และในแอฟริกา ลักษณะการเข้าทำลายพืชจำพวกฝ้ายคือ ตัวหนอนจะกัดกินตาดอก ดอก และสมอฝ้าย นอกจากนั้นยังกินใบและยอดอีกด้วย (วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2539) เนื่องจากตัวหนอนสามารถกินอาหารได้ปริมาณมาก จึงนับว่าเป็นศัตรูที่สำคัญที่สุดของฝ้ายในประเทศไทย ในการป้องกันกำจัดนั้นจะต้องปฏิบัติตามหลักวิชาการ เช่น ต้องใช้สารกำจัดที่เหมาะสมกับชนิดของแมลง อัตราการใช้สารเคมี และช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม (สว่าง วังบุญคง. 2536)

2.1.2 พืชอาศัย

หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันมีพืชอาหารกว้างขวางมากทั้งพืชไร่ พืชสวน (Mabbett. 1983 ; เกศรา จีระจรรยา. 2530) ผัก และไม้ดอก (เกศรา จีระจรรยา. 2530) วิวัฒน์ เสือสะอาด (2539) รายงานว่า พืชอาหารหลักของแมลงชนิดนี้คือ ฝ้าย ข้าวโพด กระเจี๊ยบ ถั่วเขียว ข้าวฟ่าง ถั่วเหลือง ยาสูบ มะเขือเทศ นอกจากนั้นหนอนเจาะสมอฝ้ายยังสามารถใช้วัชพืชเป็นที่อาศัยดำรงชีวิตข้ามฤดูได้อีกด้วย (อุทัย เกตุนุติ. 2534)

2.1.3 ชีวประวัติและรูปร่างลักษณะ

ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืน บินได้ว่องไว และมีความสามารถที่จะบินได้เป็นระยะไกล ๆ (วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2539) มีรูปร่างอ้วนป้อม ยาวประมาณ 18 มิลลิเมตร ตัวผู้มีสีน้ำตาลอมเขียว แตกต่างกับตัวเมียซึ่งมีปีกคู่หน้าสีน้ำตาลปนแดง (สว่าง วังบุญคง. 2536) บริเวณกึ่งกลางปีกคู่หน้าจะมีจุดสีน้ำตาลเข้มจุดเล็ก ๆ 1 จุด บนปีกแต่ละด้านจะมีลายสีน้ำตาลพาดขวางบริเวณส่วนปลายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปีกคู่หน้าทั้งสองข้าง ปีกคู่หลังมีสีเทาปนน้ำตาลอ่อน ส่วนปลายปีกมีลายพาดขวางสีน้ำตาลเหมือนปีกคู่หน้า ตัวเต็มวัยมีอายุเฉลี่ยประมาณ 7-12 วัน ตัวเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยว ๆ ตามยอดใบอ่อนหรือตามสมออ่อนของฝ้าย ไข่มีลักษณะกลมคล้ายฝาชี มีขนาด 0.4-0.5 มิลลิเมตร ตัวเมียวางไข่ได้ประมาณ 526-2,270 ฟอง ระยะไข่ 2-3 วัน หนอนเจาะสมอฝ้ายมีการเติบโตในระยะหนอน 5 ระยะ ตัวหนอนวัยที่ 1 มีขนาดเล็กมาก ลำตัวสีขาวนวล ลำตัวยาวประมาณ 1.4 มิลลิเมตร เมื่อออกจากไข่จะกัดกินเปลือกไข่ของมันเอง และเริ่มกินอาหาร เจริญเติบโตจนกระทั่งอายุได้ 3-4 วัน จึงลอกคราบครั้งแรก ตัวหนอนวัยที่ 2 ลำตัวยาวประมาณ 3.8 มิลลิเมตร ตัวหนอนวัยนี้มีอายุประมาณ 1-3 วัน จึงจะลอกคราบครั้งที่สอง ตัวหนอนวัยที่ 3 จะมองเห็นลายสีขาวพาดตามแนวยาวตลอดทั้ง 2 ข้างของลำตัว ตุ่มขนจะมีสีเข้มขึ้น (อุทัย เกตุนุติ. 2534) ลำตัวยาวประมาณ 8.4 มิลลิเมตร อายุของหนอนวัยนี้ประมาณ 2 วัน จึงลอกคราบครั้งที่สาม (สว่าง วังบุญคง. 2536) ตัวหนอนวัยที่ 4 ลำตัวจะมีขนาดโตขึ้น ยาวประมาณ 2.0-2.5 เซนติเมตร มีลายข้างลำตัวชัดเจน ขณะเดียวกันทางด้านบนของลำตัวจะมีลายสีน้ำตาลพาดไปตลอดลำตัว บริเวณท่อหายใจแต่ละปล้องของส่วนท้องจะมีลายสีน้ำตาลเข้มทุกปล้องทั้ง 2 ด้านของลำตัว (อุทัย เกตุนุติ. 2534) ในวัยนี้จะใช้เวลา 2-3 วัน จึงจะลอกคราบครั้งที่สี่ ตัวหนอนวัยนี้จะเริ่มกินอาหารจุ ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายแก่ฝ้าย (สว่าง วังบุญคง. 2536) ตัวหนอนวัยที่ 5 ตัวหนอนจะมีขนาดโตขึ้น อาจมีความยาวถึง 3.5 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าตัวหนอนในวัยนี้มีสีของลำตัวและลายข้างลำตัวแตกต่างกันไป เช่น เขียว น้ำตาล ชมพู และดำ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากพืชอาหารและสภาพแวดล้อม (อุทัย เกตุนุติ. 2534) ตัวหนอนระยะที่ 5 เป็นระยะที่ทำความเสียหายแก่ฝ้ายรุนแรงที่สุด ตัวหนอนระยะนี้จะใช้เวลา 5-7 วัน ก่อนเข้าสู่ระยะดักแด้ ซึ่งก่อนจะเข้าดักแด้ตัวหนอนจะหยุดกินอาหารและหดตัวประมาณ 2-3 วัน สำหรับดักแด้จะมีสีน้ำตาลไหม้ ตัวเรียบ หัวท้ายกลม กว้างประมาณ 4.56 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 17.75 มิลลิเมตร อายุดักแด้ประมาณ 10-12 วัน จึงจะเป็นตัวเต็มวัย (สว่าง วังบุญคง. 2536)

2.2 การเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture)

แหล่งเนื้อเยื่อที่นำมาเพาะเลี้ยงเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มแรก ได้แก่

2.2.1 รังไข่ (ovary)

Grace (1962) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งนำมาจากเนื้อเยื่อของแมลงจำพวกผีเสื้อ ได้แก่ *Antheraea eucalypti* ซึ่งนับว่าเป็นเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่ได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเซลล์ไลน์ชนิดนี้พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นโดยใช้เนื้อเยื่อจากรังไข่ของดักแด้ เนื้อเยื่อจากรังไข่เป็นแหล่งของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ดีเหมาะสำหรับสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก เซลล์มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้เซลล์ที่ได้จะมีรูปร่างหลายแบบ (Stanley and Vaughn. 1968 ; Vaughn. 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดาวรรณ เชยชมศรี และคณะ (2542) สร้างเซลล์ไลน์ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน โดยใช้เนื้อเยื่อรังไข่ของตัวเต็มวัยเป็นกลุ่มเซลล์เริ่มแรก เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ที่ได้คือ GLGC-HA-52

2.2.2 เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte)

Mitsuhashi (1966) ได้สร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเซลล์เม็ดเลือดของดักแด้หนอนกอข้าว *Chilo suppressalis* พบว่ากลุ่มเซลล์เริ่มแรกมีเซลล์ลักษณะแตกต่างกันประมาณ 7 ชนิด แต่มีเพียงเฉพาะโปรฮีโมไซต์ (prohemocytes) และพลาสมาโตไซต์ (plasmatocytes) เท่านั้นที่สามารถยึดเกาะและเพิ่มจำนวนได้ในภาชนะที่เพาะเลี้ยง หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ เซลล์ทั้ง 2 ชนิดจะเริ่มแบ่งตัวหลังจากเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ นอกจากนี้ยังรายงานว่ากลุ่มเซลล์เริ่มแรกที่ได้นี้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานถึง 12 เดือน โดยการเก็บเซลล์ด้วยวิธีการขูดเซลล์ (scrape) Chao and Ball (1971) ได้ทำการศึกษาในลักษณะเช่นเดียวกันนี้โดยใช้แมลง *Samia cynthia* และได้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน

Arnold and Sohi (1974) พบว่าเซลล์เม็ดเลือดที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (*in vitro*) สามารถอยู่ได้นานพอ ๆ กับเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในเลือดของแมลง (*in vivo*) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไลน์ของแมลง *Malacosoma disstria* ที่สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดจะพบเซลล์สามชนิด คือ โปรฮีโมไซต์ (prohemocyte) พลาสมาโตไซต์ (plasmatocytes) และแกรนูลาร์ฮีโมไซต์ (granular hemocytes) ที่มีลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกัน และถ้าเซลล์ดังกล่าวอยู่ในเลือดของแมลง (*in vivo*) ลักษณะรูปร่างไม่แตกต่างกัน และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (*in vitro*) มีจำนวนโครโมโซมเป็นโพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเลือดที่อยู่ในเลือดภายในตัวแมลง ลักษณะของเซลล์ไลน์ที่ได้จะมี prohemocytes-plasmatocytes complex ที่เด่น การแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสจะสามารถเห็นได้อย่างเด่นชัดเมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์เม็ดเลือดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ บางครั้งเซลล์บางชนิดอาจสามารถเพาะเลี้ยงได้และเจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่เหมาะสม แต่เซลล์บางชนิดเมื่อผ่านการถ่ายเซลล์ก็อาจมีการสูญหายหรือเซลล์ตายลงได้

2.2.3 ตัวอ่อน (embryo)

Miltenburger *et al.* (1984) ได้พัฒนาเซลล์ไลน์จากตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryos) อายุ 2-3 วัน ของ *Cydia pomonella* โดยใช้เซลล์จากตัวอ่อน 200 ตัวในแต่ละการเพาะเลี้ยง และพบว่ามี 32 การเพาะเลี้ยงจากทั้งหมด 35 การเพาะเลี้ยงที่เจริญดีมากจนกระทั่งสามารถแยกไปเลี้ยงในขวดทดลองใหม่ได้ สำหรับเซลล์ไลน์ที่สร้างได้ในระยะแรกจะมีรูปร่างที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ ได้แก่ รูปกระสวย (spindle-shaped) คล้ายเส้นใย (fibroblast-like) รูปร่างกลมแบบเซลล์บุผิว (epithelial-like) และเส้นใยสานกันเป็นตาข่าย (net-like fibroblast) นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการถ่ายเซลล์เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง จะมีผลต่อรูปร่างของเซลล์ในพาสเสจ (passage) ต่อไป วิธีการถ่ายเซลล์มีหลายวิธี ได้แก่ การเขย่า (shaking) การปิเปตต์ (pipetting) การขูด (scraping) และการใช้เอนไซม์ย่อยให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dwyer *et al.* (1988) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งพัฒนาเซลล์ไลน์ของแมลงชนิด *Pieris rapae* โดยใช้เนื้อเยื่อจากตัวอ่อน (embryos) ที่อยู่ภายในไข่อายุ 24 ชั่วโมง

Lee and Hou (1992) ได้พัฒนาเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักในจีนไต้หวันได้สำเร็จโดยเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่อายุ 2 วัน และใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ปรับปรุงมาจากสูตร Hink's medium ประกอบด้วย Grace's medium 75 มิลลิลิตร เสริมด้วย lactalbumin hydrolysate 0.3 กรัม TC-yeastolate 0.3 กรัม ไข่ที่กรองแล้ว 4 มิลลิลิตร ซีรัม (Fetal bovine serum) 20 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยเพนนิซิลลินจี (pennicillin G) สเตรปโตมัยซิน เอส (Streptomycin S) และนิสเตติน (nystatin) ใส่ลงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารให้เท่ากับ 6.4 เซลล์ไลน์ของหนอนใยผักที่ได้มีชื่อว่า PX-1187 ซึ่งวัตถุประสงค์ที่สร้างเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักเพื่อศึกษาถึงสรีรวิทยาของเซลล์ ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและชีวเคมี เพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาโรคของแมลง และปาราสิตของแมลงชนิดนี้ ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมปริมาณประชากรของแมลงโดยชีววิธี

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-PID2) ได้เป็นผลสำเร็จ

นอกจากนี้ Mitsuhashi (1981 และ 1983) สามารถสร้างเซลล์ไลน์จากเซลล์ไขมัน (fat body) ของแมลงหนอนกระทู้กะหล่ำชนิด *Mamestra brassicae* และ หนอนกระทู้ชนิด *Leucania separata* ต่อมา Inoue and Mitsuhashi (1985) ได้ทำการคัดแยกชนิดของเซลล์ไลน์ที่สร้างจากหนอนกระทู้กะหล่ำได้ถึง 5 ชนิด ที่สามารถเพาะเลี้ยงให้เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในขวดทดลอง

2.3 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและความจำเพาะเจาะจงของไวรัสโรคแมลง

สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการสร้างเซลล์ไลน์ของแมลงชนิดต่าง ๆ และทำการทดสอบการติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสเป็นผลสำเร็จ ดังนี้

Grace (1962) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งนำมาจากเนื้อเยื่อของแมลงจำพวกผีเสื้อ ได้แก่ *Antheraea eucalypti* ซึ่งนับว่าเป็นเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่ได้จากสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเซลล์ไลน์ชนิดนี้พัฒนามาจากการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นโดยใช้เนื้อเยื่อจากรังไข่ของดักแด้

Miltenburger *et al.* (1984) ได้พัฒนาเซลล์ไลน์จากตัวอ่อน (embryos) ของ *Cydia pomonella* โดยใช้ตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่อายุ 2-3 วัน โดยใช้เซลล์จากตัวอ่อน 200 ตัว ในแต่ละการเพาะเลี้ยง และพบว่ามี 32 การเพาะเลี้ยงจากทั้งหมด 35 การเพาะเลี้ยงที่เจริญดีมากจนกระทั่งสามารถแยกไปเลี้ยงในขวดทดลองใหม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dwyer *et al.* (1988) ประสบความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งพัฒนาเซลล์ไลน์ของแมลงชนิด *Pieris rapae* โดยใช้เนื้อเยื่อจากตัวอ่อน (embryos) ที่อยู่ภายในไข่อายุ 24 ชั่วโมง

Lee and Hou (1992) ได้พัฒนาเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักในจีนไต้หวันได้สำเร็จโดยเริ่มต้นเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่อายุ 2 วัน และใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่ปรับปรุงมาจากสูตร Hink's medium ประกอบด้วย Grace's medium 75 มิลลิลิตร เสริมด้วยแลคทาลบูมินไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate) 0.3 กรัม ทีซี-ยีสโตเลท (TC-yeastolate) 0.3 กรัม ไข่ที่กรองแล้ว 4 มิลลิลิตร ซีรัม (Fetal bovine serum) 20 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะ 1 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยเพนนิซิลลินจี (pennicillin G) สเตรปโตมัยซิน เอส (Streptomycin S) และนิสเตติน (nystatin) ใส่ลงในอาหารปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารให้เท่ากับ 6.4 เซลล์ไลน์ของหนอนใยผักที่ได้มีชื่อว่า PX-1187 ซึ่งวัตถุประสงค์ที่สร้างเซลล์ไลน์ของหนอนใยผักเพื่อศึกษาถึงสรีรวิทยาของเซลล์ ศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและชีวเคมี เพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาโรคของแมลง และปาราสิตของแมลงชนิดนี้ ซึ่งเป็นวิธีการควบคุมปริมาณประชากรของแมลงโดยชีววิธี

Baines *et al.* (1994) เพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเซลล์บุผิว (epithelial cells) ของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของหนอนผีเสื้อ 3 ชนิด คือ *Bombyx mori*, *Choristoneura fumiferana* และ *Lymantria dispar* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด MM (Mitsuhashi and Maramorosh medium) เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และเติมเจนตามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Hara *et al.* (1995) ประสบความสำเร็จในการโคลน (clone) เซลล์ไลน์ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) *Se*3FH โดยเซลล์ไลน์ที่โคลนได้คือ *Se*301 ซึ่งมีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อ *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (*Se*NPV) ได้ดีกว่า *Se*3FH ถึง 10 เท่า แต่ผลึกโปรตีนของ *Se*NPV ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ *Se*301 มีปริมาณต่ำกว่าที่พบใน *Se*3FH อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์เหล่านี้ คือ IPL-41 เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

Wang *et al.* (1996) สร้างเซลล์ไลน์ชนิด NTU-PN-HH จากเนื้อเยื่อรังไข่ของดักแด้ผีเสื้อชนิด *Perina nuda* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด TNM-FH เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลักษณะรูปร่างของเซลล์มีหลายแบบ เช่น เซลล์รูปกระสวย (spindle-shaped cells) เซลล์รูปร่างกลม (round cells) และเซลล์รูปสี่เหลี่ยม (squamous cells) เซลล์ไลน์ที่ได้นี้นับว่าเป็นเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่อ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัส *Pn*MNPV (*Perina nuda* multiple nucleopolyhedrovirus)

Shih *et al.* (1997) สร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อรังไข่ของดักแด้หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) และตั้งชื่อเซลล์ไลน์ที่ได้ ดังนี้ IBL-SLO1A อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงคือ TNM-FH เสริมด้วยซีรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่าเวลาที่จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่า (population doubling time) เท่ากับ 21.9 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบการติดเชื้อไวรัส *Sl*NPV (*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus) ซึ่งได้จากการละลายผลึกโปรตีนของไวรัสด้วยสารละลายด่างเพื่อให้อนุภาคของไวรัสหลุดออกมา พบว่าเซลล์ไลน์ IBL-SLO1A ภายหลังจากการปลูกเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ลักษณะของเซลล์มีขนาดเปลี่ยนแปลงไป โดยนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ต่อมาภายหลังจากการปลูกเชื้อนาน 120 ชั่วโมง เซลล์จะแตกออกและปลดปล่อยผลึกโปรตีนของไวรัสออกมา

Lynn and Shapiro (1998) สามารถสร้างเซลล์ไลน์ได้ 7 ชนิดจากเนื้อเยื่อตัวอ่อน (embryos) ของ *Heliothis virescens* พบว่ามีเพียง 3 ชนิดที่สามารถเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิต่ำ คือ 17 องศาเซลเซียส จากการทดสอบความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*Ac*MNPV), *Autographa falcifera* nucleopolyhedrovirus (*Af*MNPV), *Anticarsa gemmatalis* nucleopolyhedrovirus (*Ag*NPV), *Rachoplusia ou* nucleopolyhedrovirus (*Ro*MNPV), *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus (*Ld*MNPV), *Orgyia pseudotsugata* nucleopolyhedrovirus (*Op*MNPV) และ *Helicoverpa zea* nucleopolyhedrovirus (*Hz*SNPV) พบว่าเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิดมีความอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัสทั้งหมด และผลิตผลึกโปรตีนปริมาณสูง ดังนั้นจึงมีประโยชน์ที่จะนำเซลล์ไลน์ทั้ง 7 ชนิดในการผลิตผลึกโปรตีนของไวรัส เพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

สุดาวรรณ เชยชมศรี และคณะ (2542) สร้างเซลล์ไลน์ GLGC-HA-52 เป็นเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของรังไข่ผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Helicoverpa armigera*) โดยเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรกในอาหารชนิด TC100 เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ และเลือดแมลง (hemolymph) 3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการศึกษาเวลาที่จำนวนเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่า โดยใช้เซลล์ไลน์พาสเสจ (passage) ที่ 5 มีค่าเท่ากับ 40 ชั่วโมง เมื่อทำการทดสอบความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus, *Ha*NPV) โดย 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ พบว่าเซลล์ที่ถูกไวรัสเข้าทำลายและสร้างผลึกโปรตีน 80 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนผลึกโปรตีนที่ไวรัสสร้างในนิวเคลียสของเซลล์เฉลี่ย 39 ผลึกโปรตีนต่อเซลล์

ตัวอย่างเซลล์ไลน์ของแมลงและความจำเพาะเจาะจงของไวรัสโรคแมลงชนิดต่าง ๆ สรุปรายละเอียดดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของเซลล์ไลน์แมลงและชนิดของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสที่สามารถทำให้เซลล์แมลงติดเชื้อ (Granados and McKenna. 1995)

Cell line designation and / or species of origin	Baculovirus family / species
Lymantria dispar : Lymantridae	Saturnidae
	Antheraea pernyi MNPV
BTI-EAA	Noctuidae
Estigmene acrea : Arctidae	*Autographa californica* MNPV
IZD-MB503	
Mamestra brassicae : Noctuidae	
Manduca sexta : Sphingidae	
IPLB-SF1254	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
TN368, IPLB-TN-R, BTI-TN5B1-4	
Trichoplusia ni : Noctuidae	
UIV-SL-573, SPC-S1-48, SPC-S1-52	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
NIAS-LeSe-11	
Leucania separata : Noctuidae	
IPRI-MD-108	
Malacosoma disstria : Lasiocampidae	
IPLB-LD64BA	
Lymantria dispar : Lymantridae	
UCR-SE-1	
Spodoptera exigua : Noctuidae	
IPLB-SF-21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	*Spodoptera frugiperda* MNPV
UIV-SL-573	*Spodoptera exemta* MNPV
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
IPLB-SF-21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Cell line designation and / or species of origin	Baculovirus family / species
IPLB-SF-21	*Spodoptera littoralis* MNPV
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
UIV-SL-573, SPC-S1-52	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
UCR-SE-1	*Spodoptera exigua* MNPV
Spodoptera exigua : Noctuidae	
IPLB-SF-21	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
IPLB-SF-21	*Trichoplusia ni* MNPV
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
TN368	
Trichoplusia ni : Noctuidae	
TN368	*Anticarsia gemmatalis* MNPV
Trichoplusia ni : Noctuidae	
Hz-AM	
Heliothis zea : Noctuidae	
IPLB-SF	
Spodoptera frugiperda : Noctuidae	
IAL-PiD	
Plodis interpunctella : Noctuidae	
IPLB-SF21 AEII	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
CLS-79	
Spodoptera littoralis : Noctuidae	
BM-5	Bombycidae
Bombyx mori : Bombycidae	*Bombyx mori* MNPV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

Cell line designation and / or species of origin	Baculovirus family / species
IPRI-01-12	Lymantridae
Orgyia leucostigma : Lymantridae	*Orgyia leucostigma* MNPV
TN368	
Trichoplusia ni : Noctuidae	
IPRI-CF-124	Pyralidae
Choristoneura fumiferana : Tortricidae	*Galleria mellonella* MNPV
IPRI-108	
Malacosoma disstria : Lasiocampidae	*Choristoneura fumiferana* MNPV
IZD-Cp58	
Cydia pomonella : Olethreutidae	*Choristoneura murinana* MNPV
IMC-HZ-1	Noctuidae
Heliothis zea : Noctuidae	*Heliothis zea* SNPV
BCIRL-HV-AMI	
Heliothis virescens : Noctuidae	
BCIRL-HZ-AM1, BCIRL-HZ-AM2,	
BCIRL-HZ-AM3	
Heliothis zea : Noctuidae	
SIE-HA, SIE-HAH	
Heliothis armigera : Noctuidae	
IPRI-01-12	
Orgyia leucostigma : Lymantridae	*Orgyia leucostigma* SNPV
BTI-TN5B1-4	
Trichoplusia ni : Noctuidae	*Trichoplusia ni* SNPV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีการพัฒนาสูตรต่าง ๆ มากมาย ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแต่ละชนิด Wyatt (1956) ได้ทำการศึกษาถึงส่วนประกอบเลือด (hemolymph) ในระยะหนอนของหนอนไหม (*Bombyx mori*) ซึ่งประกอบด้วยสารอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น กรดอะมิโน เกลืออินทรีย์ เกลืออนินทรีย์ และต้องเติมเลือดแมลงลงไปด้วย

ต่อมา Grace (1962) ปรับปรุงสูตรอาหารของ Wyatt โดยเติมวิตามินบีรวมลงในสูตรอาหารของ Wyatt และตั้งชื่ออาหารชนิดใหม่ว่า Grace's medium ซึ่งยังต้องเติมเลือดแมลงเช่นกัน สูตรอาหารของเกรซนี้สามารถใช้เพาะเลี้ยงเซลล์ของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังได้ และเซลล์ไลน์ชนิดแรกที่เกรซสร้างคือ Australian emperor gum moth (*Antheraea eucalypti*) โดยทำการปลูกเซลล์เริ่มแรกจากรังไข่ของระยะดักแด้ ปัจจุบันอาหารของเกรซนิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงในอันดับเลพิดอปเทอรา (Order Lepidoptera) สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.4.1 อาหารที่เติมซีรัม (serum-containing medium)

อาหารชนิดนี้พัฒนาขึ้นมาโดยอาศัยความรู้พื้นฐานทางสรีรวิทยาของแมลง และองค์ประกอบพื้นฐานของเลือดแมลง และใช้ซีรัมของสัตว์มีกระดูกสันหลังแทนเลือดของแมลง เติมโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) เพื่อเพิ่มการเจริญของเซลล์แมลงและไวรัสโรคแมลง การพัฒนาสูตรอาหารเริ่มจาก Hink (1970) ได้พัฒนาสูตรอาหาร TNM-FH จากสูตรอาหารพื้นฐานของเกรซ โดยเสริมด้วยแลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate) และยีสโตเลท (yeastolate) อย่างละ 3.3 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งวิตามินบีรวม นอกจากนี้ยังเสริมด้วยซีรัม (fetal bovine serum, FBS) 10 เปอร์เซ็นต์ แทนเลือดแมลง นอกจากนี้ยังมีสูตรอาหารบางชนิดที่ใช้สูตรอาหารของเกรซเป็นพื้นฐาน ได้แก่ TC-100 หรือ BML-TC/10 (Gardiner and Stockdale. 1975) เป็นสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เพียงชนิดเดียว คือ กลูโคส (glucose) ไม่เติมกรดอินทรีย์ แต่เติมซีรัมและสารสกัดทริปโตส (tryptose extract) (Cameron *et al.* 1989) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่นิยมใช้อีกชนิดหนึ่งคือ IPL-41 (Weiss *et al.* 1981) ซึ่งพัฒนามาจากสูตรอาหารเริ่มต้นคือ IPL (Goodwin. 1975) เมื่อเทียบสูตรอาหาร IPL-41 กับอาหารของเกรซ พบว่า IPL-41 มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) ชนิดต่าง ๆ วิตามิน และส่วนประกอบอื่น ๆ ที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้น การเปรียบเทียบสูตรอาหารทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Grace's medium, IPL-41 และ TC-100 ดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง (ที่มา : O'Reilly *et al.* 1992)

ส่วนประกอบ	Grace's (มิลลิกรัม / ลิตร)	IPL-41 (มิลลิกรัม / ลิตร)	TC-100 (มิลลิกรัม / ลิตร)
Inorganic salts			
$CaCl_2$ (anhydrous)	750.00	500.00	996.49
$CoCl_2.6H_2O$		0.05	
$CuCl_2.2H_2O$		0.20	
$FeSO_4.7H_2O$		0.55	
KCl	4,100.00	1,200.00	2,870.00
$MgCl_2.6H_2O$	2,280.00		
$MgCl_2$			1,067.95
$MgSO_4.7H_2O$	2,780.00		
$MgSO_4$		918.00	1,357.67
$MnCl_2.4H_2O$		0.02	
NaCl		2,850.00	500.00
$NaHCO_3$	350.00	350.00	
$NaH_2PO_4.H_2O$	1,013.00	1,160.00	1,008.36
$(NH_4)(Mo_7O_{24}.4H_2O)$		0.04	
$ZnCl_2$		0.04	
Sugars, Other			
D(-)-Fructose	400.00		
Fumaric acid, free acid	55.00	4.40	
D(+)-Glucose	700.00	2,500.00	1,100.00
α-Ketoglutaric acid	370.00	29.60	
L(-)-Malic acid	670.00	53.60	
Maltose		1,000.00	
Succinic acid	60.00	4.80	
Sucrose	26,680.00	1,650.00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	Grace's (มิลลิกรัม / ลิตร)	IPL-41 (มิลลิกรัม / ลิตร)	TC-100 (มิลลิกรัม / ลิตร)
Amino acids			
β-Alanine	200.00	300.00	
L-Alanine	225.00		225.00
L-Arginine HCl	700.00	800.00	665.11
L-Asparagine	350.00	1,300.00	350.00
L-Aspartic acid	330.00	1,300.00	350.00
L-Cystine	22.00		
L-Cysteine.2Na		119.40.00	28.68
L-Glutamic acid	600.00	1,500.00	600.00
L-Glutamine	600.00	1,000.00	600.00
Glycine, free base	650.00	200.00	650.00
L-Histidine	2,500.00	200.00	
L-Histidine $HCl.H_2O$			3,697.89
L-Isoleucine	50.00	750.00	50.00
L-Leucine	75.00	250.00	75.00
L-Lysine.HCl	625.00	700.00	625.00
L-Methionine	50.00	1,000.00	50.00
L-Phenylalanine	150.00	1,000.00	150.00
L-Proline	350.00	500.00	350.00
Hydroxy-L-Proline		800.00	
DL-Serine	1,100.00	400.00	
L-Serine			550.00
L-Threonine	175.00	200.00	175.00
L-Tryptophan	100.00	100.00	100.00
L-Tyrosine	50.00		
L-Tyrosine.2Na.$2H_2O$		360.40	72.08
L-Valine	100.00	500.00	100.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ	Grace's (มิลลิกรัม / ลิตร)	IPL-41 (มิลลิกรัม / ลิตร)	TC-100 (มิลลิกรัม / ลิตร)
Vitamins			
ρ-Aminobenzoic acid	0.02	0.32	0.02
Biotin	0.01	0.16	0.01
D-Ca Pantothenate	0.02	0.008	0.11
Choline chloride	0.20	20.00	
Folic acid	0.02	0.08	0.02
Isoinositol	0.02	0.04	0.02
Niacin	0.02	0.16	0.02
Pyridoxine HCl	0.02	0.40	0.02
Riboflavin	0.02	0.08	0.02
Thiamine.HCl	0.02	0.08	0.52
Vitamin B_{12}		0.24	0.01
Undefined Ingredients			
Tryptose			2,000.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4.2 อาหารที่ไม่เติมซีรัม (serum-free medium)

ปัจจุบันอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงมีทั้งที่เติมซีรัมปริมาณน้อยและไม่เติมซีรัม อาหารที่ไม่เติมซีรัมซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงได้แก่ Mitsuhashi and Maramorosch's MM medium ซึ่งมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.3 (Mitsuhashi. 1994)

นอกจากนี้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่ไม่เติมซีรัมซึ่งเตรียมได้ง่ายอีกชนิดหนึ่งคือ ISFM (Inlow *et al.* 1989) โดยเติมยีสโตเลท (yeastolate) และไขมันลงในอาหาร IPL-41 ซึ่งไขมันที่ใช้ประกอบด้วย cholesterol, α-tocopherol acetate, cod liver oil, fatty acid methylester โดยมี Tween 80 และ Pluronic F-68 เป็น emulsifying agent สารแขวนลอยไขมันดังกล่าวมีจำหน่ายในรูปการค้า เช่น Inserum I (J.R.H. Bioscience), chemical defined lipid concentrate (CDLC) (GIBCO) เป็นต้น

ปัจจุบันอาหารที่ไม่เติมซีรัมมีจำหน่ายหลายชนิด ได้แก่ Ex-Cell 400, Ex-Cell 401, Sf 900 และ Sf 900 II เป็นต้น อาหารเหล่านี้เป็นอาหารที่ปราศจากโปรตีนหรือมีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนเพียงเล็กน้อย โดยมีส่วนประกอบเช่นเดียวกับอาหาร IPL-41 สำหรับอาหารเกรซได้มีการดัดแปลงเพื่อใช้เป็นอาหารที่ไม่เติมซีรัมเช่นกัน โดยทำการเติม Pluronic F-68 และ low-protein lipid supplement (Ex-Cyte VLE) ลงในอาหารเกรซซึ่งเสริมด้วยแลคทาลบูมินไฮโดรไลเสท และยีสโตเลท อาหารชนิดนี้คือ SFM-LP (สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2543)

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของอาหารชนิด Mitsuhashi and Maramorosch's MM medium (ที่มา : Mitsuhashi. 1994)

ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/100มิลลิลิตร)	ส่วนประกอบ	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/100มิลลิตร)
NaCl	700.00	$CaCl_2.2H_2O$	20.00
$NaH_2PO_4.H_2O$	20.00	D-Glucose	400.00
$NaHCO_3$	12.00	Lactalbumin hydrolysate	650.00
KCl	20.00	TC-Yeastolate	500.00
$MgCl_2.6H_2O$	10.00	Fetal bovine serum	0-20 มิลลิลิตร

Note : pH : 6.5, Osmolarity : 413 mOsm/kg.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

54240

2.5 วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสามารถกระทำได้ 2 แบบ ได้แก่ การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) และการเพาะเลี้ยงแบบแขวนลอย (suspension culture) โดยใช้ภาชนะเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน กรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ภาชนะที่ใช้เพาะเลี้ยงอาจเป็นขวดแก้วหรือขวดพลาสติกก็ได้ แต่ต้องมีพื้นผิวเพียงพอต่อการเจริญและการเกาะติดของเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ขวดเพาะเลี้ยงซึ่งมีพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร และ 75 ตารางเซนติเมตร ปริมาตรของอาหารที่ใช้กับขวดเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4-6 มิลลิลิตร และ 15 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยในปริมาณที่ไม่มากนัก เช่น 50-500 มิลลิลิตร นั้น ส่วนใหญ่ใช้ขวดแก้วรูปชมพู่ (Erlermeyer flask) โดยวางบนเครื่องเขย่าที่ปรับความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 135-150 รอบต่อนาที นอกจากนี้นิยมเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยโดยใช้ขวดแก้วที่มีใบพายพร้อมแท่งแม่เหล็ก เรียกขวดเพาะเลี้ยงชนิดนี้ว่า spinner flask ซึ่งต้องใช้ควบคู่กับเครื่องกวนสารที่ควบคุมความเร็วรอบได้ (stirring platform) สำหรับความเร็วรอบที่ใช้กับ spinner flask เท่ากับ 90-100 รอบต่อนาที ซึ่งในแต่ละสภาวะจะต้องทำการควบคุมปัจจัยให้เหมาะสมกับการเจริญของเซลล์แมลงแต่ละชนิด สำหรับเซลล์ไลน์ของแมลงในกลุ่มผีเสื้อต้องบ่มเซลล์เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์แมลง เช่น Mitsuhashi (1982) รายงานถึงอุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของ *Papilio xuthus* (NIAS-AeAl) เท่ากับ 25 องศาเซลเซียส Vaughn (1976) ใช้อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ *Spodoptera frugiperda* (IPLB 21 และ IPLB-1254) ส่วน Hara *et al.* (1995) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ *Spodoptera exigua* (Se3FH) ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่ Gelernter and Federici (1986) สามารถสร้างเซลล์ไลน์ *Spodoptera exigua* (UCR-SE-1) และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จากการรายงานของ Hink and Strauss (1976) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แมลงในกลุ่มผีเสื้อเท่ากับ 28-30 องศาเซลเซียส ส่วนสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าของ osmolarity ของอาหารเพาะเลี้ยงนั้นมีผลน้อยมากต่อการอยู่รอดของเซลล์และการจำลองตัวเองของไวรัสโรคแมลง แต่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์แมลงจะอยู่ในช่วง pH 6.0-6.7 และค่า osmolarity เท่ากับ 290-360 mOsm/kg (Goodman and McIntosh. 1994) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเซลล์แมลงแต่ละชนิด เช่น การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของ *Spodoptera frugiperda* ซึ่ง O'Reilly *et al.* (1992) รายงานไว้ คือต้องปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 6.2 และค่า osmolarity เท่ากับ 350 mOsm/kg ส่วน Lee and Hua (1992) เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ชนิด PX-1187 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.4 จึงจะเจริญได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การจำแนกชนิดของเซลล์ไลน์

การจำแนกเซลล์ไลน์ของแมลงทำได้หลายวิธี เช่น การใช้วิธีทางอิมมูนวิทยา การตรวจนับจำนวนโครโมโซม และ isozyme pattern ซึ่งการใช้วิธีทางอิมมูนวิทยานั้นพบว่า เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ระหว่างเซลล์ไลน์จากแมลงต่างชนิดกัน ส่วนการจำแนกชนิดของเซลล์แมลงโดยใช้จำนวนโครโมโซมนั้นทำให้เกิดความสับสนได้ง่ายเนื่องจากเซลล์ไลน์ชนิดเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน (McKenna *et al.* 1998) จากการรายงานของ Tabachnick and Knudson (1980) เกี่ยวกับ isozyme pattern ของเซลล์ไลน์แมลงต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน แต่ isozyme pattern ของเซลล์ไลน์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อต่างชนิดของแมลงชนิดเดียวกันจะเหมือนกัน ดังนั้นวิธีนี้จึงใช้ตรวจสอบเซลล์ไลน์ของแมลงได้อย่างถูกต้องและให้ผลที่เด่นชัด ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทาง Polymerase Chain Reaction (PCR) ในการตรวจสอบชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตกันอย่างแพร่หลาย ซึ่งมีการนำเอาเทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบเซลล์ไลน์ของแมลงด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ซึ่งเป็นวิธีการที่ดีอีกวิธีการหนึ่งซึ่งใช้ในปัจจุบัน

โดยทั่วไปเซลล์ไลน์ของแมลงจะมีเซลล์หลายชนิดปะปนอยู่ เซลล์เหล่านี้แตกต่างกันที่รูปร่างและอัตราการเจริญ ดังนั้นการโคลนเซลล์ดังกล่าวออกจากกันจึงเป็นขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญ การจำแนกโคลนของเซลล์ไลน์ทำได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น จำแนกเซลล์ไลน์ของไหมป่า (*Antheraea eucalypti*) สามารถจำแนกได้ถึง 10 โคลน โดยใช้ความแตกต่างด้านขนาด รูปร่าง อัตราการเจริญ และการตอบสนองของเซลล์ต่อไวรัสของหนอนไหม ดังนั้นการพัฒนาเพื่อให้ได้โคลนที่ดีของเซลล์ไลน์จึงเป็นงานพื้นฐานสำคัญและมีประโยชน์มากสำหรับงานวิจัย (McKenna *et al.* 1998)

2.7 นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus)

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส จัดอยู่ในวงศ์บาคูโลวิริดี (Family Baculoviridae) เป็นไวรัสที่สามารถสร้างอนุภาคได้ 2 รูปแบบ คือ อนุภาคไวรัสอิสระ (budded virus, BV หรือ extracellular virus, ECV) และอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน (polyhedra-derived virus, PDV หรือ occluded virus, OV หรือ nonoccluded virus, NOV) (Vialard *et al.* 1995) ลักษณะสำคัญของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส คือ อนุภาคของไวรัสหรือนิวคลีโอแคปสิด (nucleocapsid) มีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod-shaped) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอสายคู่ลักษณะเป็นวงกลม (circular double-stranded DNA) นิวคลีโอแคปสิดมีขนาด 40 - 60 × 250 - 300 นาโนเมตร ส่วนผลึกโปรตีนของไวรัสมีรูปร่างหลายเหลี่ยมเรียกว่า โพลีฮีดรา (polyhedra) มีขนาดประมาณ 0.5-15 ไมโครเมตร มีโปรตีนที่เรียกว่า โพลีฮีดริน (polyhedrin) เป็นองค์ประกอบหลัก ภายในผลึกโปรตีนมีอนุภาคไวรัส (virion) จำนวนมากบรรจุอยู่ภายใน (Adams and McClintock. 1991) เมื่อพิจารณาตามลักษณะของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคไวรัสที่อยู่ในโพลีฮีดรา สามารถแบ่งบาคูโลไวรัสในกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ (Adams and McClintock. 1991 ; Murphy *et al.* 1995)

- Single-embedded nucleopolyhedrovirus (SNPV) คือวิริออน (virion) ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดเพียงอนุภาคเดียวเท่านั้น กระจัดกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีนหรือโพลีฮีดรา ได้แก่ *Helicoverpa armigera* SNPV (*Ha*SNPV), *Helicoverpa zea* SNPV (*Hz*SNPV), *Orgyia psudosugata* SNPV (*Op*SNPV) และ *Trichoplusia ni* SNPV (*Tn*SNPV) เป็นต้น

- Multiple-embedded nucleopolyhedrovirus (MNPV) คือวิริออน (virion) ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดตั้งแต่ 2 อนุภาคขึ้นไป ขนาดของวิริออนขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคของนิวคลีโอแคปสิด ได้แก่ *Autographa californica* MNPV (*Ac*MNPV), *Galleria mellonella* MNPV (*Gm*MNPV), *Spodoptera frugiperda* MNPV (*Sf*MNPV), *Orgyia pseudosugata* MNPV (*Op*MNPV), *Trichoplusia ni* MNPV (*Tn*MNPV) และ *Spodoptera exigua* MNPV (*Se*MNPV) เป็นต้น

2.7.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส

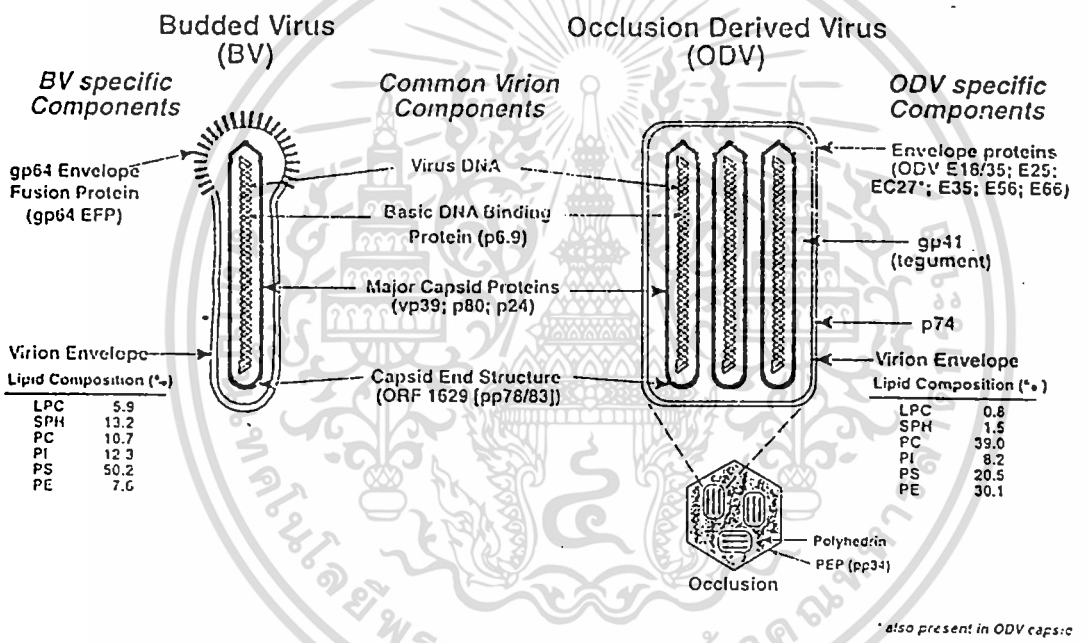
นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสมีนิวคลีโอแคปสิดเป็นรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 40-50 นาโนเมตร ความยาวประมาณ 200-400 นาโนเมตร (Harrap. 1972a) สำหรับความยาวของแคปสิดนั้นจะยืดออกไปได้เพื่อให้เหมาะสมกับความยาวของดีเอ็นเอ เช่นในกรณีที่มีการรีคอมบิแนนท์ด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ (Fraser. 1986)

สำหรับโครงสร้างของนิวคลีโอแคปสิดประกอบด้วย 2 ส่วน คือ นิวคลีโอโปรตีนคอร์ (nucleoprotein core) และแคปสิด ในส่วนของนิวคลีโอโปรตีนคอร์จะประกอบด้วยจีโนมของไวรัสซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ปลายปิดและมีลักษณะเป็นวงกลม มีความยาวอยู่ในช่วง 80-200 kbp. (Burgess. 1977) ขดรวมอยู่กับ basic DNA binding protein สำหรับโปรตีนที่เป็นโครงสร้างที่สำคัญของนิวคลีโอโปรตีนคอร์ คือ protaminelike protein หรือ p 6.9 (basic protein หรือ core protein หรือ vp12) (Tweeten *et al.* 1980 ; Wilson *et al.* 1987)

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสมีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากไวรัสชนิดอื่นที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์ คือ นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสมีอนุภาคไวรัส 2 แบบ (ดังภาพที่ 2.1) (Volkman. 1986) รูปแบบแรกคืออนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน (polyhedra-derived virus, PDV หรือ occluded virus, OV) ไวรัสรูปแบบนี้จะพบอยู่ภายในผลึกไวรัส และเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคระหว่างประชากรแมลง รูปแบบที่สอง อนุภาคไวรัสอิสระ (budded virus, BV หรือ extracellular virus, ECV หรือ nonoccluded virus, NOV) เป็นไวรัสที่ทำให้เกิดการตอบสนองต่อระบบต่าง ๆ ที่เกิดการติดเชื้อภายในตัวแมลงและการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยง นิวคลีโอแคปสิดของ PDV และ BV มีองค์ประกอบทางเคมีและพันธุกรรมคล้ายคลึงกันมาก เนื่องจากถูกสร้างขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์ที่ติดเชื้อเช่นเดียวกัน (Cochran *et al.* 1986 ; Volkman. 1986) แต่สำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

envelope ซึ่งเป็นส่วนที่ห่อหุ้มนิวคลีโอแคปสิดจะมีความแตกต่างกัน โดยที่ BV จะมี envelope ที่ได้มาจากพลาสมาเมมเบรนของเซลล์ที่ติดเชื้อก่อนที่จะเคลื่อนที่ออกสู่ extracellular fluid ที่ส่วนปลายของ envelope มีส่วนยื่นออกมาเรียกว่า peplomers ซึ่งส่วนนี้ประกอบด้วยไกลโคโปรตีนที่ถอดรหัสมาจากยีนของไวรัส (gp64) และพบเฉพาะใน BV เท่านั้น สำหรับ envelope ของ PDV นั้น ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าถูกสร้างขึ้นมาจากส่วนใด จึงเรียกส่วนนี้ว่า *de novo* (Stoltz *et al.* 1973)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสรูปแบบไวรัสอิสระ (budded virus, BV) และรูปแบบไวรัสที่อยู่ภายในผลึกโปรตีน (polyhedra-derived virus, PDV) (ที่มา : Cochran *et al.* 1986)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในแมลง

นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสทำให้แมลงเกิดโรคได้ก็ต่อเมื่อแมลงกินอาหารที่มีผลึกโปรตีนไวรัส (occluded virus) ปนเปื้อนอยู่เข้าไปในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง (midgut) ที่มีสภาพเป็นด่างสูงมาก (pH 9.5-11.5) จะย่อยสลายผลึกโปรตีนออกไป และอนุภาคไวรัสจะหลุดออกจากผลึกโปรตีน (Harrap and Longworth. 1974) จากนั้นจะเข้าสู่เซลล์กระเพาะอาหารส่วนกลางโดยการรวมตัวเข้ากับเนื้อเยื่อของไมโครวิไล (microvilli) (Granados and Williams. 1986) เมื่ออนุภาคไวรัสเข้าไปเพิ่มจำนวนในเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลางแล้วจะแพร่กระจายเข้าสู่ระบบภายในตัวแมลง โดยผ่านทางแอ่งเลือด (hemocoel) และถูกเคลื่อนย้ายโดยเม็ดเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ภายในตัวแมลง ท่ออากาศ ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ เซลล์เนื้อเยื่อผนังลำตัว โดยไวรัสจะไปเพิ่มจำนวนอยู่เฉพาะในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ที่มันเข้าทำลายเท่านั้น (Keddie *et al.* 1989)

การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสของแมลงในระยะตัวหนอนนั้นจะใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน ซึ่งในระยะนี้ตัวหนอนจะยังคงกินอาหารได้ หลังจากนั้นตัวหนอนจะมีอาการเซื่องซึมและหยุดกินอาหาร ผนังลำตัวมีสีซีดลง อาจมีผนังลำตัวเป็นมัน ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นหรือสีครีม ในระยะสุดท้ายของอาการของโรค ตัวหนอนมักพยายามไต่ขึ้นส่วนยอดของลำต้นพืช โดยเกาะอยู่นิ่ง ๆ หยุดกินอาหาร และจะตายในลักษณะใช้ขาเทียม 1 คู่ เกาะต้นพืชเอาไว้ โดยห้อยหัวและส่วนท้องลงเป็นรูปตัววีหัวกลับ เมื่อตัวหนอนตายผนังลำตัวจะแตกง่ายและเปลี่ยนเป็นสีดำอย่างรวดเร็ว การที่ผนังลำตัวของตัวหนอนเปลี่ยนเป็นสีดำนั้นเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenol-oxidase) สำหรับอาการของการติดเชื้อไวรัสที่เกิดภายในตัวหนอน ส่วนของนิวเคลียสของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายจะบวมโตขึ้น และเซลล์จะแตกออกในที่สุด ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ เสียไป ระยะนี้จะพบผลึกไวรัสอยู่เต็มภายในลำตัวของตัวหนอนที่เป็นโรค ทำให้มองเห็นตัวหนอนมีสีขาวขุ่นหรือสีครีม เมื่อตัวหนอนตายผนังลำตัวจะแตกออก ผลึกโปรตีนไวรัสก็จะแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก (Hughes and Wood. 1981 ; O'Reilly *et al.* 1992)

2.7.3 การติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง

กระบวนการของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ คือ early phase, late phase และ very late phase โดยในระยะที่หนึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเตรียมเซลล์เพื่อให้พร้อมสำหรับการจำลองตัวของไวรัส ระยะที่สองจะเป็นการสร้างอนุภาคไวรัส (Budded virus, BV) และระยะที่สามจะเป็นการสร้างผลึกไวรัส (Occluded virus, OV)

- Early phase

การติดเชื้อภายในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง เช่น เซลล์เม็ดเลือด การติดเชื้อจะเกิดขึ้นทันทีที่อนุภาคไวรัส (BV) เข้าสู่เซลล์โดยวิธีการ adsorptive endocytosis (Volkman and Goldsmith. 1985 ; Volkman. 1986) ส่วนของนิวคลีโอแคปสิดจะเคลื่อนที่ผ่านไซโตพลาสซึมไปยังนิวเคลียสโดยผ่านทาง nuclear pore (Granados and Williams. 1986) ภายในนิวเคลียสส่วนของนิวคลีโอโปรตีนคอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะหลุดออกมาจากส่วนปลายของแคปสิด (capsid) โดยที่การหลุดออกมาของนิวคลีโอโปรตีนคอร์นั้นเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ capsid - associated protein kinase ซึ่งจะทำให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตใน basic p 6.9 (Wilson and Consigli. 1986) นอกจากนี้ยังพบว่า ภายหลังจากการปลูกเชื้อไวรัสลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลงเราสามารถพบส่วนของดีเอ็นเอของไวรัสได้ภายในเวลา 30 นาที ทำให้เราทราบว่าดีเอ็นเอของไวรัสจะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์และเริ่มต้นกระบวนการจำลองตัวเองได้ในระยะเวลาอันสั้น (Chisholm and Henner. 1988)

การติดเชื้อของเซลล์ที่เกิดขึ้นในช่วง 6 ชั่วโมงแรกนี้จัดเป็นระยะ early phase โดยในระยะนี้จะมีการจัดเรียงตัวของโครงสร้างภายในเซลล์ขึ้นใหม่ก่อนที่จะมีการจำลองตัวเองของไวรัสเกิดขึ้น ในระยะนี้จะพบโครมาตินกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียสของเซลล์ซึ่งจะมีขนาดใหญ่ขึ้น การเปลี่ยนแปลงในส่วนของไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสนี้จะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่จำเป็นต่อการจำลองตัวของไวรัส (Charlton and Volkman. 1991)

- Late phase

ระยะนี้จะมีการจำลองตัวของไวรัสต่อจากระยะ early phase เป็นช่วงที่มีการแสดงออกของยีนที่เป็น late gene และเป็นช่วงที่มีการสร้างอนุภาคไวรัส (BV) ระยะ late phase นี้จะเกิดขึ้นในช่วง 6-24 ชั่วโมงภายหลังการติดเชื้อ ในระหว่างชั่วโมงที่ 12-24 หลังการติดเชื้อ จะมีการสร้างอนุภาคไวรัส (BV) สูงสุด แต่หลังจากช่วงนี้ไปแล้วการสร้างอนุภาคไวรัส (BV) จะลดลง (Knudson and Harrap. 1976) ในระยะ late phase นี้ จะเกิดโครงสร้างที่เป็นจุดที่มีการรวมตัวกันของอิเลคตรอน (electron-dense structure) หรือที่เรียกว่า virogenic stroma เกิดขึ้นภายในนิวเคลียส (Harrap. 1972b ; Kelly. 1981) โดยจะมีการสร้างแคปสิดขึ้นที่ส่วนปลายของ virogenic stroma จากนั้นจะเกิดการรวมกันของนิวคลีโอโปรตีนคอร์กับแคปสิดเกิดเป็นนิวคลีโอแคปสิด (Fraser. 1986) ต่อมานิวคลีโอแคปสิดก็จะเคลื่อนออกจากนิวเคลียสผ่านไซโตพลาสซึมไปยัง cytoplasmic membrane และเกิดการรวมกันกับเมมเบรนทำให้ไวรัสมี envelope ที่มีโครงสร้างที่มีลักษณะเฉพาะตัว (Raghow and Grace. 1974)

- Very late phase

ระยะ Very late phase หรือ occlusion - specific phase จะเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 20 ภายหลังเกิดการติดเชื้อ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนพบว่า ในระยะนี้จะมีการสร้างเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสขึ้นมาอย่างปราณีต (Harrap. 1972b) สำหรับกลไกของการสร้างเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัส หรือ *de novo* membrane นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ส่วนของนิวคลีโอแคปสิดจะไปรวมกับเมมเบรนดังกล่าวเพื่อพัฒนาเป็นอนุภาคไวรัส โดยนิวคลีโอแคปสิดอาจเรียงอยู่เดี่ยว ๆ ใน envelope (SNPV) หรืออาจเรียงเป็นกลุ่มอยู่ภายใน envelope (MNPV) (Fraser. 1986) ในขั้นตอนการห่อหุ้มไวรัสด้วย envelope นี้เชื่อว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับความคงตัวของผลึกโปรตีนไวรัสด้วย ความสำคัญอีกประการหนึ่งของระยะนี้คือ เป็นระยะที่มีการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสจำนวนมากขึ้นภายในนิวเคลียสของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมลง จนกระทั่งในช่วงสุดท้ายของการติดเชื้อจะพบว่าภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลงจะมีผลึกโปรตีนไวรัส (polyhedra) บรรจุอยู่ภายในจำนวนมาก

2.8 ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส (Cytoplasmic polyhedrosis virus)

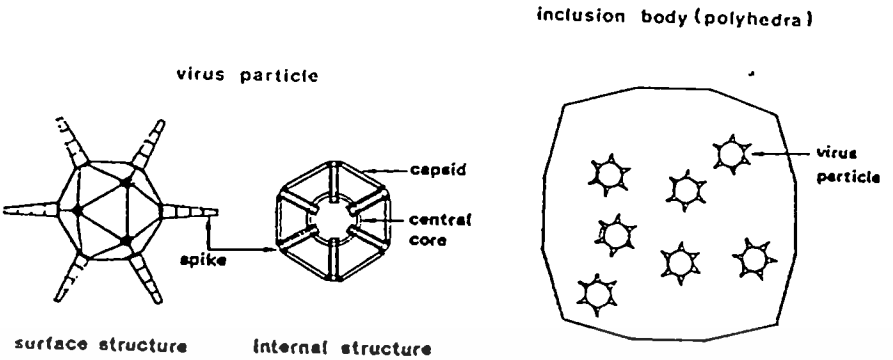
ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส จัดอยู่ในวงศ์รีโอวิริดี (Family Reoviridae) เนื่องจากมีอนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลม 20 หน้า (icosahedral) และประกอบด้วยกรดนิวคลีอิคชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) แต่แตกต่างจากรีโอไวรัสชนิดอื่น ๆ ตรงลักษณะโครงสร้างของอนุภาคไวรัสและการสร้างผลึกโปรตีนในเซลล์ที่ถูกทำลาย ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจะสามารถเพิ่มจำนวนได้เฉพาะในไซโตพลาสซึมของเซลล์เท่านั้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

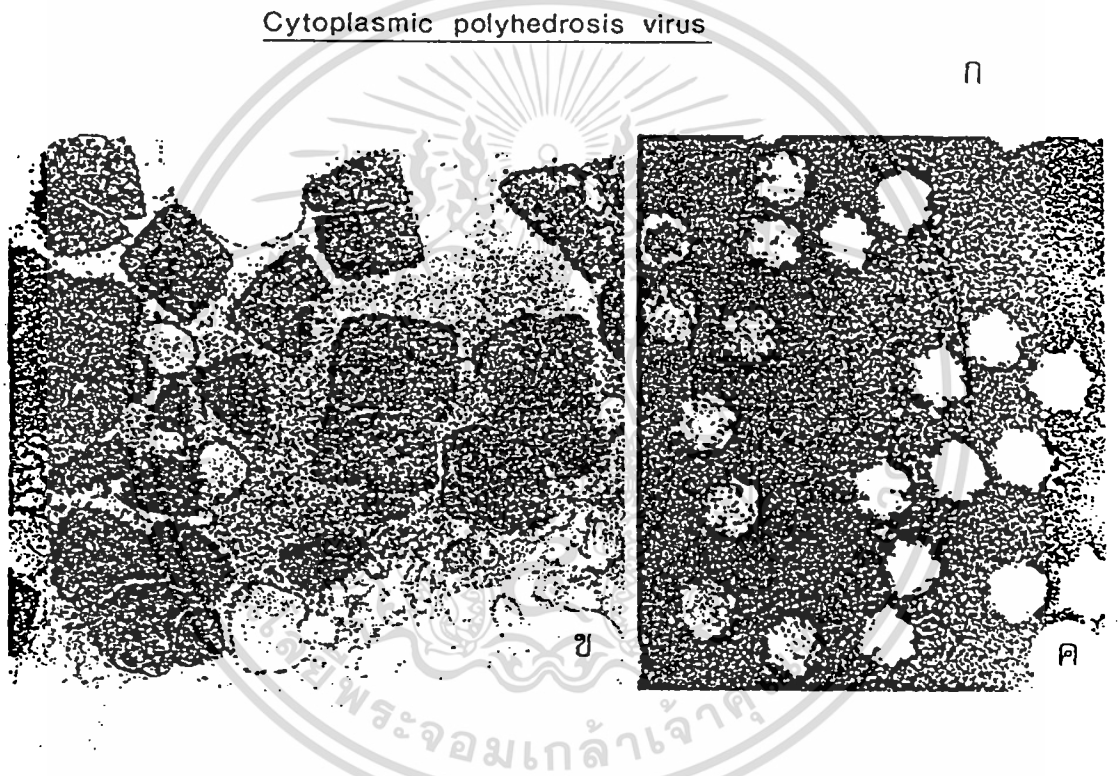
ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส สามารถพบและแยกเชื้อได้จากแมลงมากกว่า 250 ชนิด (Hukuhara and Bonomi. 1992) มีรายงานว่าแมลงในอันดับเลพิดอพเทอรามีมากกว่า 200 ชนิด ที่ถูกทำลายด้วยไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส นอกจากนี้ยังพบในแมลงอันดับดิพเทอรา นิวรอพเทอรา และไฮเมนนอพเทอรา ด้วย (Hunter-Fujita *et al.* 1998) ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสไม่ทำให้แมลงตายทันทีเมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ จึงยังไม่มีการผลิตเชื้อนี้ออกเป็นการค้าใช้ในการกำจัดแมลง (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

2.8.1 โครงสร้างของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส

ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส มีอนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 - 70 นาโนเมตร ประกอบด้วยด้านเท่าทั้งหมด 20 ด้าน (icosahedral หรือ isometric) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิคชนิดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double-stranded RNA) เป็นท่อน ๆ 10 ท่อน แต่ละท่อนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 0.34-2.59 $\times 10^6$ ดาลตัน น้ำหนักโมเลกุลรวมเฉลี่ยประมาณ 15 $\times 10^6$ ดาลตัน กรดนิวคลีอิคมีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น เป็นวง หรือเป็นเส้นรูปเหลี่ยมด้านเท่าหลายด้าน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) แคปสิดเป็นโปรตีนหน่วยย่อย ๆ ประกอบกันขึ้นเป็นรูปทรงกลม อนุภาคของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจึงมีลักษณะเหมือนเปลือก (shell) 2 ชั้น ซ้อนกัน ชั้นในเป็นแกนกลาง (central core) ชั้นนอกเป็นแคปสิด (Hunter-Fujita *et al.* 1998) โครงสร้างผิวนอกของอนุภาคไวรัสเป็นพื้นที่รูปสามเหลี่ยมด้านเท่ายี่สิบอันประกอบกันขึ้น และตรงยอด (vertice) ที่พื้นที่รูปสามเหลี่ยม 5 อัน บรรจบกันจะเป็นพื้นที่รูปห้าเหลี่ยม ซึ่งมีโครงสร้างเป็นหนามแหลมยาวประมาณ 17-20 นาโนเมตร ยื่นออกมาเรียกว่า spike หรือ projection ซึ่งมีทั้งหมด 12 อัน (Lewandowski and Traynor. 1972 ; Payne and Kalmakoff, 1974) หนามแหลมนี้ภายในกลวงและมีกำเนิดยื่นมาจากแกนกลางจึงคล้ายสะพานเชื่อมระหว่างเปลือกทั้งสองชั้นของอนุภาคไวรัส (ดังภาพที่ 2.2 ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





ภาพที่ 2.2 ลักษณะโครงสร้างและไวรัสในกลุ่มไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส (ที่มา : ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

ก. ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส

ข. ผลึกโปรตีนของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส

ค. อนุภาคของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุภาคของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจะไม่มีผนังล้อมรอบ จะอยู่เดี่ยว ๆ กระจัดกระจายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) (ดังภาพที่ 2.2 ข) ผลึกโปรตีนประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ชนิดเดียว มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 - 31,000 ดาลตัน โปรตีนโมเลกุลจะเรียงตัวกันแบบ dot pattern หรือ 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) ผลึกโปรตีนของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสเมื่อเจริญเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 1-1.5 ไมครอน มีรูปร่างต่าง ๆ กัน เช่น รูปหลายเหลี่ยมด้านเท่า รูปสี่เหลี่ยม รูปทรงกลมหรือรูปไข่ และไม่มีผนังล้อมรอบผลึกโปรตีน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) (ดังภาพที่ 2.2 ค)

2.8.2 การติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสในแมลง

ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจะทำลายเฉพาะเซลล์กระเพาะอาหารของแมลงและเพิ่มปริมาณในไซโตพลาสซึมของเซลล์เท่านั้น ผลึกโปรตีนจะถูกย่อยสลายในท่ออาหาร และปล่อยอนุภาคไวรัสเข้าทำลายเซลล์รอบท่ออาหาร ทำให้องค์ประกอบต่าง ๆ ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ถูกทำลาย (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) Kobayashi (1971) รายงานว่า อนุภาค viral core จะแทงผ่านเข้าไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์โดยอาศัยส่วนของ spike ซึ่งช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง อนุภาคไวรัสจะเข้าไปทวีจำนวนได้ในเซลล์ภายใน 24 ชั่วโมง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง rought endoplasmic reticulum เมื่อไวรัสเพิ่มปริมาณมากขึ้น เซลล์จะขยายใหญ่ขึ้นจนผนังเซลล์แตกปล่อยผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัสออกมาในท่ออาหารของแมลง ซึ่งจะถูกขจัดออกด้วยการอาเจียนหรือถ่ายออกมาพร้อมของเสียอื่น ๆ ทางทวารหนัก Miyajima and Kawase (1968) กล่าวว่า เนื่องจากแมลงสามารถสร้างเซลล์รอบท่ออาหารทดแทนขึ้นมาใหม่จาก regenerative cell ของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของแมลง จึงทำให้อาการของโรคอันเกิดจากไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสไม่รุนแรงมากนัก และกินเวลานานกว่าแมลงจะตาย

เนื่องจากไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสมีผลโดยตรงต่อระบบย่อยอาหารของแมลง จึงทำให้การเจริญเติบโตของแมลงผิดปกติ แมลงที่เป็นโรคจะมีขนาดเล็กกว่าปกติมาก กินอาหารน้อยลงจนหยุดกิน อยู่เฉย ๆ เชื่องช้า ตัวเหี่ยวย่น สีซีดจาง วงจรชีวิตจะยาวขึ้น ไม่วางไข่หรือไข่ไม่ฟัก เป็นต้น (ทิพยวดี อรรถธรรม. 2539)

Neilson (1965) ได้รายงานเกี่ยวกับผลของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสในแมลง 4 ชนิด ได้แก่ *Alsophila pometaria* (Harris), *Nymphalis antiopa* (Linnaeus), *Operophtera brumata* (Linnaeus) และ *Paleacrita vernata* (Peck) พบว่าแมลงที่เป็นโรคอันเกิดจากไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจะมีขนาดลำตัวที่เล็กลง ในระยะตัวหนอนจะสามารถพบผลึกไวรัสได้ที่ทางเดินกระเพาะอาหารส่วนกลาง นอกจากนี้ในแมลงชนิด *A. pometaria* และ *O. brumata* ตัวเต็มวัยเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะมีลักษณะของปีกที่ผิดปกติ ส่วนในเพศเมียจะมีพัฒนาการของรังไข่ที่ผิดปกติ และพบว่าไวรัสจะมีผลทำให้ความสามารถต่อการสืบพันธุ์ในตัวเต็มวัยของแมลงทั้ง 4 ชนิดลดลง

Smith and Rivers (1956) ได้ศึกษาเกี่ยวกับไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสที่แยกได้จากแมลง *Vanessa cardui* พบว่าไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสที่แยกได้สามารถจำลองตัวได้ในแมลง *Bupalus piniarius* และ *Operophtera brumata* และเมื่อ Neilson (1964) ได้นำไปทำการศึกษาต่อ พบว่าไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสดังกล่าวนี้สามารถจำลองตัวได้ในแมลงอันดับเลพิดอพเทอรา 11 ชนิด และแมลงอันดับไฮเม็นนอพเทอรา 2 ชนิด

Cunningham and Longworth (1968) รายงานว่า ได้ทำการแยกเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจากแมลง 7 ชนิด ได้แก่ *Aglais urticae*, *Nymphalis io*, *Vanessa cardui*, *Arctia caja*, *Porthetria dispar*, *Phalera bucephala* และ *Euproctis chrysorrhoea*

นอกจากนี้ Anagnou-Veroniki *et al.* (1997) ได้รายงานว่าสามารถแยกเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสได้จากแมลง Olive fly, *Dacus oleae*

สำหรับอาการภายในที่พบในแมลงที่มีการติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส คือ ท่ออาหารของแมลงจะมีสีขาวครีมแทนที่จะเป็นท่อใส ๆ เมื่อเซลล์รอบท่ออาหารแตก ผลึกโปรตีนสีขาวจะไหลเข้าไปในท่ออาหารของแมลง ทำให้แมลงอาเจียรและถ่ายอยู่ตลอดเวลา อันเป็นการแพร่กระจายและถ่ายทอดเชื้อไปสู่แมลงตัวอื่น ๆ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539 ; Kobayashi. 1971)

2.8.3 การติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง

ไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสสามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการติดเชื้อได้ด้วยการนำผลึกไวรัสที่ได้จากกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงไปทำการย่อยด้วยสารละลายด่าง อนุภาคไวรัสที่ถูกย่อยแล้วจะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการติดเชื้อ โดยอนุภาคไวรัสจะไปยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และจะแทงเข้าสู่เซลล์โดย viropexis ภายใน 15 นาที หลังการติดเชื้อ (Belloncik. 1989) ต่อมาจะพบอนุภาคไวรัสเกิดขึ้นในแวคคิวโอและ lysosomelike vesicle ภายหลังจากเกิดการติดเชื้อแล้ว 30 นาที รูปแบบของการติดเชื้อไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงจะเหมือนกับที่เกิดการติดเชื้อในตัวแมลง เซลล์ที่เกิดการติดเชื้อจะมีผลึกไวรัสจำนวนมากอยู่ที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ ผลึกของอนุภาคไวรัสซึ่งมีลักษณะเหลี่ยมด้านเท่านี้จะเกิดขึ้นตอนปลายของการติดเชื้อ สำหรับไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสบางสายพันธุ์รูปแบบของการสร้างผลึกอาจต่างออกไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาระหว่างจีโนมของอนุภาคไวรัสและสภาวะของเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นมีอิทธิพลต่อรูปร่างของผลึกไวรัส (Belloncik and Mori. 1998)

ถึงแม้ว่าการติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสจะเกิดขึ้นที่ทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงเท่านั้น แต่ในเซลล์แมลงที่สร้างจากเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่แตกต่างกันก็จะมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสต่างกันในเซลล์เพาะเลี้ยง ในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนั้นอาจพบว่ามีการติดเชื้อไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสที่ไม่สมบูรณ์ได้หากเชื้อไวรัสนี้มีความรุนแรงอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

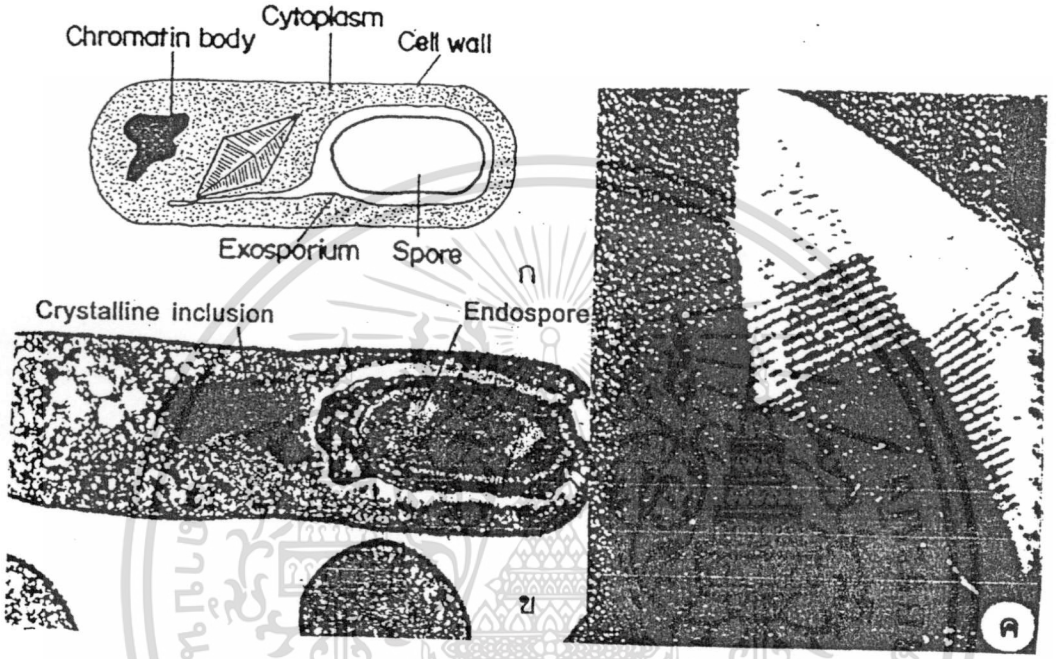
ระดับต่ำ ซึ่งอาจต้องใช้ระยะเวลานานหลายเดือนกว่าจะทำให้เซลล์แสดงอาการติดเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไวรัสนี้มีความรุนแรงมากก็จะทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เกิดการติดเชื้อมีผลึกไวรัสจำนวนมากอยู่ภายในและทำให้เซลล์แตกได้ในที่สุด (Belloncik. 1996) แต่จะไม่พบว่ามีการปลดปล่อยอนุภาคไวรัสจากเซลล์ที่ติดเชื้อสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ (Belloncik. 1989 ; Belloncik *et al.* 1996)

2.9 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis (*Bt.*) จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ชนิด facultative anaerobic bacteria เจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย แต่ในขณะที่กำลังสร้างสปอร์ต้องการสภาพที่มีอากาศเต็มที่ (Aronson *et al.* 1986) รูปร่างของเซลล์เป็นท่อนตรง (rod shape) ขนาดประมาณ 0.7 × 3.5 ไมโครเมตร เคลื่อนที่ได้โดยอาศัยแฟกเจลลา (flagella) สร้างสปอร์อยู่ภายในเซลล์ (endospore) ซึ่งจะอยู่บริเวณปลายข้างหนึ่งของเซลล์ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) (ดังภาพที่ 2.3 ก, ข) ในขณะที่แบคทีเรียชนิดนี้สร้างสปอร์ก็จะสร้างผลึกโปรตีนที่เรียกว่า parasporal inclusion (Aronson *et al.* 1986) หรือ crystal toxin อยู่ทางอีกด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนใหญ่พบ 1 อัน (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) รูปร่างลักษณะของผลึกนี้จะแตกต่างกันแล้วแต่สายพันธุ์ของแบคทีเรีย แต่ส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเหมือนปิรามิด 2 อันประกบกัน (bipyramidal shape) (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) (ดังภาพที่ 2.3 ค.) ผลึกโปรตีนหรือ crystal protein นี้ ประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนที่มีรูปร่างเป็นแบบ dumb-bell shaped ขนาดยาวประมาณ 15 นาโนเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 ดาลตัน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539 ; อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) การสร้างผลึกโปรตีนนี้จะถูกกำกับโดยพลาสมิดดีเอ็นเอ ทำให้สารพิษของ *Bt.* แต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพไม่เหมือนกัน (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) ผลึกโปรตีนนี้สามารถทนอยู่ในน้ำหรือในสภาพแห้งแล้งได้นาน (Fast and Milne. 1979) แต่เมื่อเข้าไปในตัวแมลงจะถูกน้ำย่อย proteolytic enzyme ในกระเพาะอาหารของแมลงย่อยสลายเป็นโปรตีนโมเลกุลย่อย ๆ ซึ่งเป็นพิษต่อแมลง ผลึกโปรตีนจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แมลงที่ได้รับเชื้อแบคทีเรียนี้เป็นโรคตาย (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539 ; Tojo and Aizawa. 1983 ; Aronson *et al.* 1986)

เชื้อ *Bt.* แบ่งแยกออกเป็นสายพันธุ์ (subspecies หรือ varieties) ได้มากกว่า 20 สายพันธุ์ การจำแนกเชื้อในสมัยแรกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และคุณสมบัติทางเคมีบางชนิด ต่อมาในปี ค.ศ. 1902 นักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศส Dr.de Barjac และ Dr.Bonnefoi ได้เสนอวิธีการจำแนกทาง serology technique โดยอาศัยคุณสมบัติของ H-antigen (flagella) ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ถึง 21H serotype (ดังตารางที่ 2.4) (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้เกิดโรคในแมลง

ก. แสดงลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เมื่อสร้างสปอร์และผลึกโปรตีนเสร็จสมบูรณ์ (ที่มา : ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

ข. ภาพถ่ายอิเลคตรอนแสดงโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรีย (ที่มา : Boucias and Pendland. 1998)

ค. ภาพถ่ายอิเลคตรอน shadow cast ของผลึกโปรตีน (ที่มา : ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 สายพันธุ์ต่าง ๆ ของเชื้อแบคทีเรีย *Bt.* แยกโดยใช้ H-antigen

(ที่มา : อัจฉรา ตันติโชดก. 2534)

H Serotype	Subspecies
1	*thuringiensis*
2	*finitimus*
3 3a	*alesti*
3a : 3b	*kurstaki*
4 4a : 4b	*sotto*
4a : 4b	*dendrolimus*
4a : 4c	*kenyae*
5 5a : 5b	*galleriae*
5a : 5c	*canadensis*
6	*entomocidus*
	subtoxicus
7	*aizawai*
8 8a : 8b	*morrisoni*
8a : 8c	*ostriniae*
9	*tolworthi*
10	*darmstadiensis*
11 11a : 11b	*toumanoffii*
11a : 11c	*kyushuensis*
12	*thompsoni*
13	*pakistani*
14	*israelensis*
15	*dakota*
16	*indiana*
17	*tohokuensis*
18	*kumamotoensis*
19	*tochigiensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

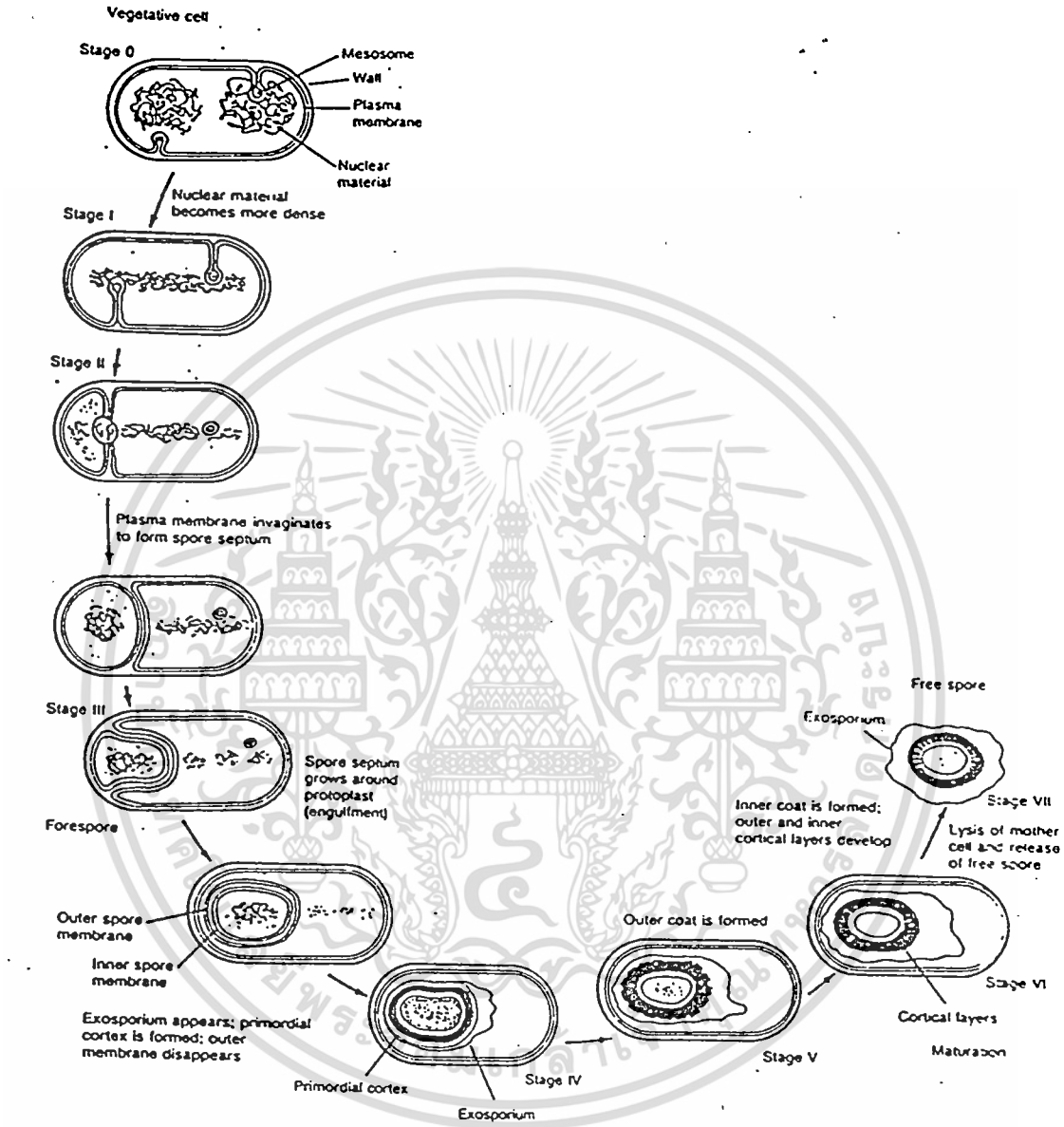
H Serotype	Subspecies
20	*yunnanensis*
21	*colmeri*
U	*wuhanensis*
ND	*tenebrionis*

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นว่าใน 5 serotype คือ H3, H4, H5, H8 และ H11 แบ่งย่อยออกเป็น a, b, c เนื่องจากว่ามี antigen subfacter แตกต่างกัน การจำแนกเชื้อ *Bt.* ยังต้องอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วย ใน serotype H6 จะมี 2 สายพันธุ์ คือ entomocidus และ subtoxicus เนื่องจากผลทางชีวเคมีต่างกัน (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534)

ทิพย์วดี อรรถธรรม (2539) ได้จัดจำแนกสารพิษที่สร้างโดยเชื้อ *Bt.* ออกเป็น 5 ชนิด ดังนี้

1) เดลต้า-เอ็นโดท๊อกซิน (delta-endotoxin) สารพิษชนิดนี้พบครั้งแรกโดย Hannay เมื่อปี ค.ศ. 1953 ในหนอนไหม มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน เช่น crystal protein หรือ parasporal body (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) ขณะที่เซลล์มีการสร้างสปอร์ก็จะสร้างผลึกโปรตีนในเวลาเดียวกัน (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) (ดังภาพที่ 2.4) เซลล์แบคทีเรียจะสลายตัวในกระเพาะอาหารเนื่องจากน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแมลง แล้วปลดปล่อยสปอร์และผลึกโปรตีนออกมา ซึ่งผลึกโปรตีนจะถูกย่อยสลายเป็นหน่วยย่อย ๆ ทำให้เกิดเป็นสารพิษ (Tanada and Kaya. 1993) โดยสารพิษนี้จะทำให้ epithelial cell ของกระเพาะอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง เซลล์จะบวมพองแยกสลายจากกันและหลุดออกจาก basement membrane ต่อมาเซลล์จะแตกทำให้สารต่าง ๆ ในกระเพาะอาหารและในช่องว่างในตัวแมลงเกิดการผสมปนกัน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) ในบางกรณีสารพิษมีผลต่อความสามารถของผนังกระเพาะอาหารในการซึมผ่านเข้าออกของสารต่าง ๆ ได้แก่ โพแตสเซียมไอออนซึมผ่านจากกระเพาะอาหารเข้าไปในเลือดหรือช่องว่างในตัวของแมลง ทำให้ปริมาณโพแตสเซียมไอออนในเลือดสูงขึ้น (Blankemeyer. 1981) การเปลี่ยนแปลงไอออนในกระเพาะอาหารและเลือดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในตัวแมลงเปลี่ยนไป (Knowles *et al.* 1992) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการส่งและรับความรู้สึกที่ถ่ายทอดผ่านรอยต่อไซแนป (synapse) ของระบบประสาท และเป็นอัมพาตทั่วตัว สารพิษชนิดนี้มีผลเฉพาะเจาะจงกับแมลง ปัจจุบันพบว่ามีผลเฉพาะกับหนอนผีเสื้อบางชนิด ยุง ริ้น และ blackflies เท่านั้น (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.4 แสดงระยะต่าง ๆ ของการสร้างสปอร์ใน *Bacillus* (ที่มา : Brock and Madigan. 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เบต้า-เอ็กโซท็อกซิน (beta-exotoxin) สารพิษชนิดนี้อาจมีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ได้แก่ fly-toxin, heat-stable exotoxin, thuringiensis (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534), thermostable exotoxin และ fly factory เป็นสารประกอบพวกนิวคลีโอไทป์ ประกอบด้วยอะดินีน, ไรโบส, กลูโคส และกรดฟอสโฟรีเลท อัลโลมูซิก (phosphorelated allomucic acid) ทนความร้อนได้ดี ละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เป็นอันตรายต่อแมลง โดยจะมีผลต่อระบบฮอร์โมน กระบวนการเมตาโบลิซึม และการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงในอันดับเลพิดอพเทอรา, ดิพเทอรา, โคลีออพเทอรา, ไฮเมนนอพเทอรา (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) นอกจากนี้ยังเป็นพิษต่อแมลงในอันดับเฮมิพเทอรา, ไอซอพเทอรา และออร์ธอปเทอรา รวมทั้งไส้เดือนฝอย และไร อีกด้วย (Levinson *et al.* 1990) แมลงที่ได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะมีผลทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลง โดยเฉพาะส่วนปาก หนวด และปีก การเปลี่ยนแปลงจะเห็นในระยะลอกคราบ ดักแด้ และในขณะที่มีการเจริญเติบโต ตัวเต็มวัยมีรูปร่างไม่สมบูรณ์ วงจรชีวิตสั้น หรือไม่สืบพันธุ์ (Faust. 1974)

3) อัลฟา-เอ็กโซท็อกซิน (alpha-exotoxin) สารพิษนี้มีชื่อเรียกต่าง ๆ กัน ได้แก่ lecithinase C, phospholipase C, Toumanoff's factor, Mouse factor, thermosensitive exotoxin (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) และ heat-labile exotoxin เป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ละลายน้ำได้ (อัจฉรา ตันติโชดก. 2534) มีคุณสมบัติพิเศษคือเป็น hemolysin คือทำลายเซลล์เม็ดเลือด และมีผลในการขัดขวางการทำงานในระบบสรีรวิทยาหลายอย่างในตัวแมลง (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

4) แกมมา-เอ็กโซท็อกซิน (gamma-exotoxin) เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน อ่อนแอต่ออากาศ ก๊าซออกซิเจน และแสงอาทิตย์ ปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับกลไกการเข้าทำลายแมลงของสารพิษชนิดนี้

5) Louse factor พบโดย Gingrich ในปี ค.ศ. 1974 ซึ่งพบว่ามีเหาถึง 4 ชนิด ที่แสดงอาการผิดปกติเมื่อได้รับเชื้อ *Bt.* var. *kurstaki* (HD-1) ซึ่งเป็น *Bt.* ที่ไม่สร้างเอ็กโซท็อกซิน และพบว่าอาการผิดปกติไม่ได้เกิดจากเอ็นโดท็อกซิน จึงรายงานว่าคงเป็นสารพิษอีกชนิดหนึ่งที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

สำหรับสารพันธุกรรมที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนนั้น Chilcott and Wigley (1993) ได้รายงานว่า ปัจจุบันมีการจำแนกโปรตีนที่มีอยู่ในผลึกโปรตีนของ *Bt.* ออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความเป็นพิษต่อแมลงและลำดับยีนที่คล้ายคลึงกัน (ดังตารางที่ 2.5 และ 2.6) ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มที่ 1 โปรตีน CryI ประกอบด้วย 8 subclasses (A-H) เป็นผลึกรูปร่างปิรามิดคู่ ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 130 - 140 กิโลดาลตัน เป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับเลพิดอพเทอรา

กลุ่มที่ 2 โปรตีน CryII (A, B และ C) เป็นผลึกรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ ประกอบด้วยโปรตีนขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับเลพิดอพเทอราและดิพเทอรา

กลุ่มที่ 3 โปรตีน CryIII มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 72-75 กิโลดาลตัน มีความเป็นพิษเฉพาะตัวอ่อนแมลงในอันดับโคลีออพเทอราเท่านั้น

กลุ่มที่ 4 โปรตีน CryIV พบใน *Bt.* ที่สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ ประกอบด้วย 4 subclasses (CryIVA, B, C และ D) มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 128, 74 และ 72 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

กลุ่มที่ 5 โปรตีน CryV มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนแมลงในอันดับเลพิดอพเทอราและโคลีออพเทอรา

กลุ่มที่ 6 โปรตีน CytA และ B พบใน *Bt.* ที่ฆ่าแมลงในอันดับดิพเทอรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 แสดงยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่พบใน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ต่าง ๆ (ที่มา : Hofte and Whiteley. 1989)

ยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีน	สายพันธุ์ของ *Bacillus thuringiensis*
cryIA(a)	*kurstaki* HD-1, *aizawai*
	sotto, *entomocidus*
cryIA(b)	*berliner* 1715, *kurstaki* NRD-12
	aizawai IC-1, *aizawai* IPL-7
	kurstaki HD-1
cryIA(c)	*kurstaki* HD-73
cryIB	*thuringiensis* HD-2, *entomocidus* HD-110
cryIC	*entomocidus* 601, *aizawai* HD-173
	entomocidus HD-110
cryIC(b)	*galleriae*
cryID	*aizawai* HD-68
cryIE	*kenyae*
cryIF	*aizawai* EG6346
cryIIA	*kurstaki* HD-263, *kurstaki* HD-1
cryIIB	*kurstaki* HD-1
cryIIIA	*san diego*, *tenebrionis* EG2158
cryIIIB	*pakistani*, *tolworthi*
cryIIIC	*kurstaki*
cryIIID	*kurstaki*
cryIVA	*israelensis*
cryIVB	*israelensis*
cryIVC	*israelensis*
cryIVD	*israelensis*
cryV	*kurstaki*
cytA	*israelensis*, *morrisoni* PG-14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 แสดงคุณสมบัติและชนิดของยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลงของ *Bacillus thuringiensis* (ที่มา : Lereclus *et al.* 1993)

Gene type[a]	Predicted molecular weight (kDa)	Host range[b]	Examples of target insects
cryIA(a)	132.2	L	*Manduca sexta, Bombyx mori, Pieris brassicae, Plutella xylostella,*
cryIA(b)	131	L	*Pieris brassicae, Manduca sexta, Heliothis virescens*
cryIA(c)	130	L/D	*Pieris brassicae, Aedes aegypti*
	133.3	L	*Heliothis virescens, Manduca sexta, Trichoplusia ni, Ostrinia nubilalis, Pieris brassicae*
cryIB	138	L	*Pieris brassicae*
cryIC	134.8	L	*Spodoptera lituralis, Spodoptera exigua, Mamesyra bassicae, Pieris brassicae*
cryID	132.5	L	*Manduca sexta, Spodoptera exigua*
cryE	130	L	*Manduca sexta,Spodoptera lituralis,Spodopter exigue*
cryF	133.6	L	*Ostrinia nubilalis, Heliothis virescens, Spodoptera exigue*
cryIIA	70.9	L/D	*Heliothis virescens,Lymantria dispar,Manduca sexta, Aedes aegypti*
cryIIB	70.8	L	*Manduca sexta,Lymantria dispar,Heliothis virescens, Trichoplusia ni*
cryIIC	69.5	L	*Manduca sexta, Lymantria dispar, Trichoplusia ni*
cryIIIA	73.1	C	*Leptinotarsa decemlineata, Phaedon cochleariae*
cryIIIB	74.2	C	*Leptinotarsa decemlineata*
cryIVA	134.4	D	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi, Culex pipiens*
cryIVB	127.8	D	*Aedes aegypti, Anopheles stephensi*
cryIVC	77.8	D	*Aedes aegypti*

[a]According to Hofte and Whiteley (1989)

[b]L : lepidopteran, D : diptera, C : coleoptera

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

Gene type[a]	Predicted molecular weight (kDa)	Host range[b]	Examples of target insects
CryIVD	72.4	D	*Aedes aegypti, Culex pipiens*
CryVA	81.2	L/C	*Diabrotica* spp., *Leptinotarsa decemlineata, Ostrinia nubilalis*
CytA	27.2	non-specific	

[a]According to Hofte and Whiteley (1989)

[b]L : lepidopteran, D : diptera, C : coleoptera

Charpentier *et al.* (1995) ได้สร้างเซลล์ไลน์ขึ้น 3 ชนิด คือ *A.t.*GRIP-1, 2 และ 3 ซึ่งสร้างได้จากตัวอ่อนที่อยู่ในระยะไข่และตัวหนอนที่เพิ่งฟักจากไข่ของแมลง *Aedes triseriatus* (Diptera : Culicidae) และนำเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นนี้ทดสอบการตอบสนองต่อสารพิษเดลต้า-เอ็นโดท็อกซินจาก *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* เปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ ATC10 จาก *Aedes aegypti* พบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นทั้ง 3 ชนิด สามารถตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรียดังกล่าวได้ดีกว่าเซลล์ไลน์ ATC10

Gill and Hornung (1987) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการละลายผลึกโปรตีนของแบคทีเรีย *Bt.* var. *israelensis* ในสารละลายต่างชนิดกัน และได้รายงานว่าเซลล์ไลน์ที่ได้จาก *Aedes albopictus*, *Culex tarsalis* และ *Spodoptera frugiperda* สามารถตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* สายพันธุ์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้ Goldberg and Margalit (1977) และ Undeen and Berl (1979) ได้รายงานว่า สารพิษของ *Bt.* var. *israelensis* สามารถใช้ในการควบคุมแมลงจำพวกยุง ได้แก่ *Aedes* และ *Culex* รวมถึง Blackfly ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง Amstrong *et al.* (1985) ได้รายงานว่า สารพิษ *Bt.* สายพันธุ์ดังกล่าวมีผลต่อลูกน้ำยุงและเซลล์ไลน์ของยุงได้ดี โดยได้ทำการศึกษาถึงผลของสารพิษที่ได้จาก *Bt.* var. *israelensis* ต่อเซลล์ไลน์ของ *Aedes albopictus* พบว่าสารพิษจาก *Bt.* ชนิดนี้มีผลต่อเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบ

Charpentier *et al.* (2002) ได้สร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของแมลง *Leptinotarsa decemlineata* และนำเซลล์ไลน์ไปทดสอบกับสารพิษจาก *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างได้จากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจะมีการตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* ได้ดีต่างกัน โดยพบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ส่วนใหญ่ตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* var. *tenebrionis* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังศึกษาการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นกับสารพิษ destruxin ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษจากเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae* พบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นทุกชนิดตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราดังกล่าวได้เป็นอย่างดี

Gibson *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสารพิษของ *Bt.* subsp. *kurstaki* พบว่าสามารถฆ่าตัวหนอนของแมลง *Heliothis virescens* ได้ผลดี และหากนำมาเพิ่มประสิทธิภาพของสารพิษด้วยกรดแทนนิก (tannic acid) ก็จะทำให้สารพิษจากแบคทีเรียชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

อัจฉรา ตันติโชดก (2534) กล่าวว่า เชื้อ *Bt.* จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงเมื่อแมลงกินผลึกของเชื้อเข้าไป น้ำย่อยในลำไส้ของแมลงที่มีสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมประมาณ 8.9 หรือมากกว่านั้น จะละลายผลึกซึ่งเป็น protoxin ให้เป็น true toxin คือ เดลต้า-เอ็นโดท็อกซินออกมา สารพิษชนิดนี้จะไปทำลายระบบย่อยอาหารและอวัยวะของแมลง ทำให้ขากรรไกรแข็ง กินอาหารไม่ได้ เคลื่อนไหวช้าลงจนกระทั่งหยุดการเคลื่อนไหว และทำให้แมลงตายในที่สุด ดังนั้นการที่แมลงศัตรูพืชจะตายเร็วหรือช้า หรือไม่ตาย ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ คือ

- ความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ของแมลง แมลงแต่ละชนิดจะมีสภาพความเป็นกรด-ด่างภายในลำไส้ไม่เหมือนกัน ที่เหมาะสมที่สุดคือ 8.9 หรือสูงกว่านี้
- น้ำย่อยภายในลำไส้ของแมลง ซึ่งจะไปละลายผลึกสารพิษ
- ชนิดของแมลง อายุ ขนาด ความแข็งแรง วัยที่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดโรคได้ง่ายคือระยะตัวอ่อน
- สภาพแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด พืชอาหาร เป็นต้น
- ชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากเชื้อ *Bt.* มีหลายสายพันธุ์ และยังแยกได้อีกหลายสายพันธุ์ย่อย (strain) จึงต้องทำการทดสอบก่อนที่จะนำไปใช้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.10 เชื้อรา *Metarrhizium anisopliae*

เชื้อรา *M. anisopliae* จัดอยู่ในอาณาจักร Mycota แขนงย่อย Eumycotina ชั้น Deuteromycetes อันดับ Hyphomycetes เป็นเชื้อราที่ไม่มีวงจรชีวิตที่ครบสมบูรณ์ให้เห็น พบเฉพาะระยะสืบพันธุ์ที่ไม่อาศัยเพศ (asexual stage) โดยจะมีการสร้างสปอร์ทั้งแบบ motile spore หรือ zoospore และแบบ nonmotile spore ที่เรียกว่า conidia พบการดำรงชีวิตทั้งแบบที่เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic) และเป็นผู้ย่อยสลาย (saprophytic) (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539) เชื้อรา *M. anisopliae* จัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพดีชนิดหนึ่ง ในปี ค.ศ. 1879 Metchnikoff ชาวรัสเซียเป็นผู้สังเกตพบโรค green muscardine fungus ในแมลง Wheat cockchafer, *Anisoplia austriaca* Hbst. จึงตั้งชื่อเชื้อรานี้ว่า *M. anisopliae* (มลิวัลย์ ปันยารชุน. 2534) ต่อมาค้นพบว่าเชื้อรานี้มี 2 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งตามขนาดของสปอร์ ได้แก่ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ซึ่งจะสร้างสปอร์ที่มีความยาวประมาณ 9 ไมโครเมตร สายพันธุ์นี้ไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมาย สามารถทำให้เกิดโรคได้ในแมลงอันดับโคลีออพเทอรา เลพิดอพเทอรา ออร์ทอพเทอรา เฮมิพเทอรา และไฮเมนนอพเทอรา นอกจากนี้ยังพบว่ามีความรุนแรงต่อลูกน้ำยุง ปลวก และ spittlebug ด้วย อีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *M. anisopliae* var. *major* สร้างสปอร์ที่มีความยาว 18 ไมโครเมตรขึ้นไป สายพันธุ์นี้มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายสูง มีรายงานว่าใช้ควบคุมแมลง scarabeid beetle และ rhinoceros beetle ในมะพร้าวบริเวณดินแดนตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก (McCoy *et al.* 1988) มลิวัลย์ ปันยารชุน (2534) รายงานว่า มีแมลงมากกว่า 200 ชนิด ที่ติดโรคจากเชื้อรา *M. anisopliae* การศึกษาความแตกต่างของเชื้อราแต่ละชนิด (species) ในต่างสายพันธุ์ (strain) พบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถทำให้เกิดโรคแก่ด้วงแรดมะพร้าว, *Orycles rhinoceros* L. ในการทดลองจากหลาย ๆ สายพันธุ์ พบว่ามีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สามารถทำให้เกิดโรคแก่ด้วงแรดมะพร้าวได้

เชื้อรา *M. anisopliae* จะเข้าทำลายแมลงโดยสปอร์ของเชื้อจะงอกผ่านทะลุผนังลำตัวของแมลง แต่ก็มีรายงานว่าเชื้อนี้สามารถผ่านเข้าทางปากและรูเปิดของท่ออากาศที่ผนังของลำตัวแมลงได้ด้วย (มลิวัลย์ ปันยารชุน. 2534) Schabel (1976) รายงานว่า เชื้อรา *M. anisopliae* ทำให้ด้วงงวง *Hylobius pales* เกิดการติดเชื้อโดยผ่านทาง buccal cavity และ Lacey *et al.* (1988) รายงานว่าเชื้อราชนิดนี้ทำให้ลูกน้ำยุงเกิดการติดเชื้อโดยผ่านเข้าทาง siphon tip

Charpentier *et al.* (2002) ได้สร้างเซลล์ไลน์จากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ ของแมลง *Leptinotarsa decemlineata* และนำเซลล์ไลน์ไปทดสอบกับสารพิษจาก *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างได้จากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจะมีการตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* ได้ดีต่างกัน โดยพบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างจากเนื้อเยื่อต่าง ๆ ส่วนใหญ่ตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* var. *tenebrionis* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังศึกษาการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่าง ๆ ที่สร้างขึ้นกับสารพิษ destruxin ซึ่งเป็นสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิษจากเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae* พบว่าเซลล์ไลน์ที่สร้างขึ้นทุกชนิดตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราดังกล่าวได้เป็นอย่างดี

Roberts (1970) กล่าวว่า กระบวนการของเชื้อราในการทำให้แมลงเกิดการติดเชื้อสามารถแบ่งเป็นระยะได้ดังนี้

1. ระยะที่ติดกับผิวลำตัวแมลง (cuticle) เชื่อกันว่าแรงทางเคมีและแรงทางไฟฟ้าสถิตมีส่วนร่วมด้วย ปฏิกิริยาร่วมระหว่างสารประกอบไลโปไพลิค (Lipopylic compound) บนผิวของสปอร์และไขมันบนผิวลำตัวของแมลงอาศัยอาจมีความสำคัญต่อการงอกของสปอร์

2. ระยะการงอกของสปอร์ โดยทั่วไปสปอร์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงจะฟักตัวในสภาพแวดล้อมที่อุดมสมบูรณ์ เช่น ในดิน เป็นต้น ถึงแม้ว่าความชื้นและอุณหภูมิจะพอเหมาะกับการงอกก็ตาม สปอร์เหล่านี้จะงอกได้ทันทีภายหลังจากที่ติดไปกับผนังลำตัวของแมลง อาจเป็นเพราะมีการกระตุ้นทางเคมีโดยสารบนผิวลำตัวแมลงและการกระตุ้นทางสรีรวิทยา ซึ่งสัมพันธ์กับกระบวนการที่ทำให้เกิดการติดเชื้อบนผนังลำตัวของแมลง หรือเป็นเพราะการที่สปอร์ของเชื้อราติดอยู่บนผนังลำตัวแมลงทำให้เชื้อราสร้างสารที่ทำให้เกิดการงอกได้ดีขึ้น และกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์

Sosa-Gomez *et al.* (1997) รายงานว่า จากการทดลองในแมลง stinkbug, *Nezara viridula* พบว่าสปอร์ของเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถยึดเกาะผิวลำตัวของแมลงบริเวณที่มีเส้นขนอยู่หนาแน่นได้ดีกว่าบริเวณส่วนหัวและอก จากการทดลองดังกล่าวทำให้พบว่าบริเวณลำตัวแมลง stinkbug ที่มีเส้นขนอยู่หนาแน่นกว่าบริเวณอื่น อาจทำให้เกิดการกระตุ้นทางเคมีทำให้มีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อราดีขึ้น

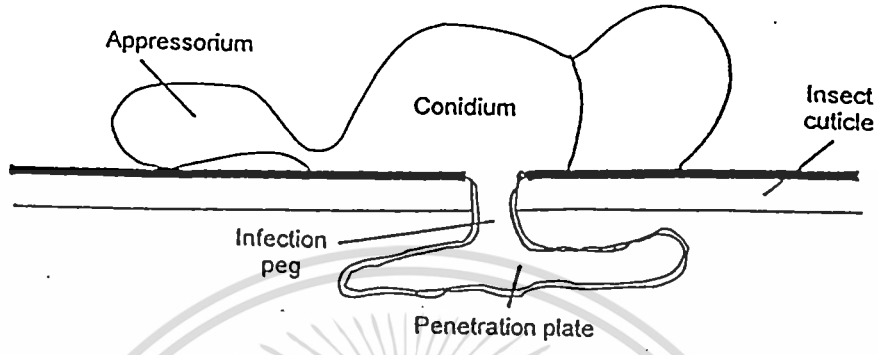
3. ระยะที่เชื้อราแทงผ่านผนังลำตัวของแมลง เชื้อรา *M. anisopliae* จะมี germ tube สั้น ๆ งอกออกมา และใช้ germ tube หรือ injection peg ที่สร้างขึ้นจากสปอร์ แทงทะลุผิวลำตัวแมลงเข้าไปภายใน โดยมี appressorium เป็นส่วนที่ช่วยยึดผิวลำตัวแมลงไว้ (ดังภาพที่ 2.5) ในระยะนี้เชื้อราจะมีการสร้างเอนไซม์ช่วยย่อยสลายผิวลำตัวของแมลง (Boucias and Pendland. 1998) เช่น sub-tilisin-like protease, metalloprotease, trypsin, aminopeptidase, dipeptidyl peptidase และ chitinase (St.Leger. 1995, 1998 ; St.Leger *et al.* 1987, 1989,1992)

4. ระยะการพัฒนาในตัวแมลง การติดเชื้อในระยะนี้เชื้อรา *M. anisopliae* จะสร้าง penetration peg เพื่อแทงผนังลำตัวชั้นนอก (epicuticle) ของแมลง เมื่อแทงผ่านเข้าสู่ชั้น procuticle แล้วส่วนปลายของ penetration peg จะขยายตัว เรียกว่า penetration plate โดยจะขยายตัวขนานไปกับผิวลำตัวแมลง (ดังภาพที่ 2.5) และพัฒนาเป็นเส้นใยของเชื้อรา (Boucias and Pendland. 1998) เส้นใยนี้จะเข้าไปเจริญตามทางเดินโลหิตและขยายจำนวนในเลือด โดยเส้นใยจะแตกหักออกเป็นท่อนสั้น ๆ และเข้าไปทำลายอวัยวะต่าง ๆ เช่น เซลล์ไขมัน เป็นต้น ภายหลังจากที่แมลงตายหรือก่อนตายเล็กน้อย จะพบเส้นใยของเชื้อราขยายไปทั่วภายในลำตัวแมลงจนลำตัวเต็มไปด้วยเชื้อราหนาแน่นและแข็ง (Robert. 1970) เมื่อแมลงตายเส้นใยจะงอกทะลุผ่านผนังลำตัวขึ้นมาสร้างก้าน

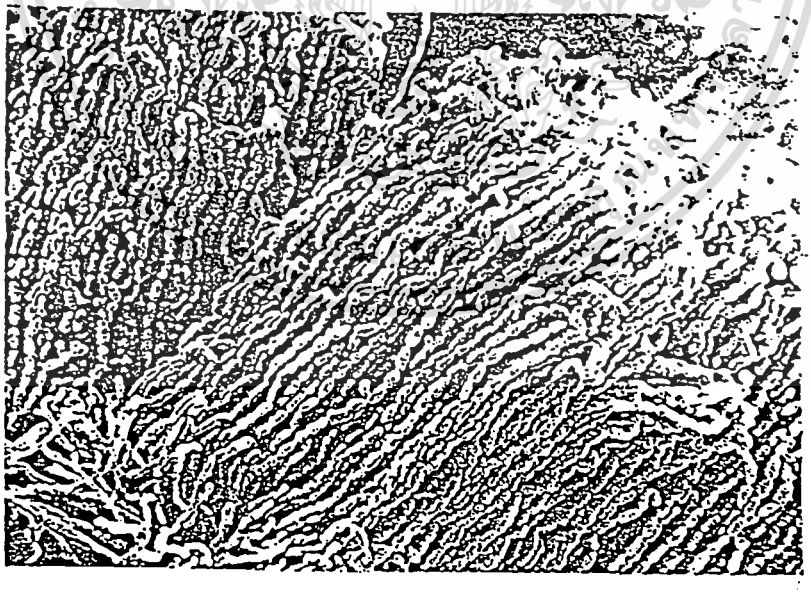
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชูสปอร์ซึ่งจะอยู่รวมกันหนาแน่น และสร้างสปอร์ที่เรียกว่า conidia ที่ปลายก้านเหล่านั้น โดยจะยื่นยาวต่อออกไปเป็นสาย (ดังภาพที่ 2.6) สปอร์เมื่อแรกสร้างจะเป็นสีขาว และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่อแก่ขึ้นจนถึงสีเขียวเข้มเกือบดำ ในที่สุดซากแมลงจะแห้งและมีเชื้อราคลุมเต็มตัวไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นเข้าปะปน (ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 แสดงส่วนประกอบของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการเข้าทำลายแมลง (ที่มา : Boucias and Pendland. 1998)



ภาพที่ 2.6 แสดงกลุ่มของ conidia ของเชื้อรา *M. anisopliae* (ที่มา : Boucias and Pendland. 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

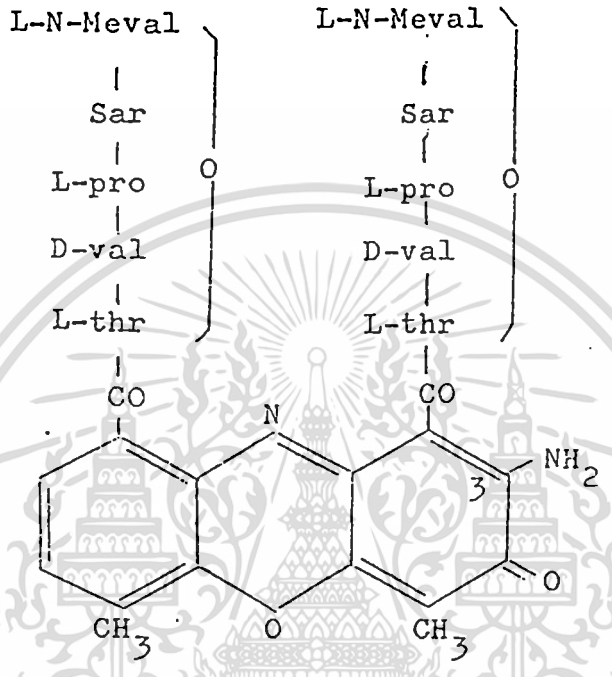
Hanel (1982) รายงานว่า เชื้อรา *M. anisopliae* จะเจริญและเข้าสู่ทางเดินโลหิตของหนอน Elateridae ใช้เวลา 6 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ส่วนในไร *Nasutitermis* กระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะพบส่วนของเส้นใยเชื้อราในเลือดของไร และเส้นใยจะเข้าทำลายเซลล์ไขมันภายใน 72 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อแล้วไรก็จะตาย โดยที่ 96 ชั่วโมง หลังจากได้รับเชื้อ จะพบเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่หนาแน่นภายในช่องว่างของลำตัว

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารพิษที่สร้างจากเชื้อรา *M. anisopliae* ได้แก่ กลุ่มของ depsipeptides ที่เรียกว่า destruxin A และ B ซึ่งมีผลทำให้ระยะตัวหนอนของแมลงเป็นอัมพาต และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียมในกล้ามเนื้อของแมลง (Dumas *et al.* 1996) นอกจากนี้ยังพบสารพิษ destruxin (C, E) ที่สร้างโดยเชื้อราชนิดนี้ จากการทดสอบสารพิษ destruxin E จะทำให้เซลล์บริเวณกระเพาะอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแมลงในอันดับเลพิดอพเทอราแสดง cytopathic effect และมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ที่ไมโตครอนเดีย, endoplasmic reticulum และนิวเคลียส ซึ่งจากการทดสอบสารพิษชนิดนี้ต่อแมลง *Galleria mellonella* และในเซลล์เพาะเลี้ยง ผลการทดสอบสารพิษ destruxin E กับแมลงชนิดนี้ พบว่ามีผลต่อ mulpighian tubule และเม็ดเลือดของแมลง เช่นเดียวกับที่มีผลต่อเซลล์ที่ทางเดินอาหารส่วนกลาง (Cerenius *et al.* 1990) นอกจากนี้เชื้อรา *M. anisopliae* ยังสามารถผลิตสารพิษชนิดอื่น ๆ อีก ได้แก่ hydropholein ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้เกิดโรค Dutch elm disease กับพืชบางชนิด แต่ไม่เป็นพิษกับแมลง และยังผลิตสารพิษพวก cytochalasins ซึ่งมีผลต่อ actin filament elongation และ swainsonine ที่ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ α-mannosidase ซึ่งมีผลในการยับยั้ง tumor growth และ metastasis (Patrick *et al.* 1995 ; Sim and Perry. 1997)

2.11 ผลของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี (Actinomycin-D) ต่อการเจริญของเซลล์

แอคติโนมัยซิน-ดี เป็นสารปฏิชีวนะชนิดหนึ่งในพวกแอคติโนมัยซิน (actinomycins) Waksman and Woodruff (1940) ได้สกัดแอคติโนมัยซิน-ดีจากแบคทีเรียพวกแอคติโนมัยซีเตส (actinomycetes) (สูตรโครงสร้างของแอคติโนมัยซิน-ดีจะแสดงดังภาพที่ 2.7) Foley (1956) ได้บันทึกว่าแอคติโนมัยซินสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Helmsing (1970) Guidice and Novelli (1963) ได้รายงานถึงแอคติโนมัยซิน-ดีสามารถยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส Kirk (1960) และ Shafer and Worton (1973) ได้กล่าวว่า แอคติโนมัยซิน-ดีสามารถยับยั้งการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิค นอกจากนั้น Samuels (1964) พบว่า การยับยั้งของแอคติโนมัยซิน-ดีต่อดีเอ็นเอ ที่กัวนีน (guanine) จะเท่ากับ 1 : 1 โมลาร์ หรือสามารถยับยั้งได้ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



L-thr = L - threonine Sar = Sarcosine

D-val = D - valine L-N-Meval = L-N-methylvaline

L-pro = L - proline

ภาพที่ 2.7 แสดงสูตรโครงสร้างของแอคติโนมัยซิน-ดี (ที่มา : Goldberg. 1965)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีต่อโครโมโซมนั้น Ostertag and Kersten (1965) ได้ศึกษาถึงผลของแอคติโนมัยซิน-ดีในด้านที่เป็นสาเหตุของการแตกหักของแท่งโครมาติด (chromatids) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน โดยทำการทดลองแบบ *in vitro* พบว่า แอคติโนมัยซิน-ดีทำให้โครมาติดแตกหักตรงบริเวณใกล้เซ็นโตรเมียร์ ซึ่งเป็นการสนับสนุนความเห็นของ Somers and Hsu (1962) ซึ่งกล่าวว่า บริเวณใกล้ ๆ เซ็นโตเมียร์เป็นบริเวณที่มีกัวนีนกับไซโตซีนจับคู่กันอยู่มาก การแตกหักของโครมาติดอาจเกิดจากการเกาะรวมตัวกันของแอคติโนมัยซิน-ดีกับโมเลกุลของดีเอ็นเอที่กัวนีน เช่นเดียวกับที่ Samuels (1964) บันทึกไว้ และสอดคล้องกับรายงานของ Goldberg (1965) ว่า แอคติโนมัยซิน-ดีจะเข้าเกาะรวมตัวกับดีเอ็นเอเกลียวคู่โดยจะเกาะกับดีเอ็นเอตรงดีออกซีกัวโนซิน และ Hsu *et al.* (1975) ได้ศึกษาในเซลล์ของไซนีส แฮมเตอร์ แบบ *in vitro* พบว่าแอคติโนมัยซิน-ดีทำให้โครโมโซมเกือบทั้งหมดคลายตัวออก ซึ่งการคลายตัวของโครโมโซมนี้เชื่อว่าเป็นเพราะการแย่งที่กันระหว่างโมเลกุลของฮีสโตนและแอคติโนมัยซิน-ดีในการที่จะไปเชื่อมกับด้านที่จะเชื่อมเกาะของดีเอ็นเอ Miles (1970) ได้ทำการทดลองโดยใช้สารกัมมันตภาพรังสี เพื่อศึกษาตำแหน่งการแตกหักของโครโมโซมของคนที่ชักนำโดยแอคติโนมัยซิน-ดี กลับพบว่าด้านของแอคติโนมัยซิน-ดีที่ชักนำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมไม่ตรงกับด้านของแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีสารกัมมันตภาพรังสี ดังนั้นจึงยังไม่เป็นที่ยอมรับและสรุปแน่นอนเกี่ยวกับการเชื่อมของแอคติโนมัยซิน-ดีกับโมเลกุลของดีเอ็นเอบนโครโมโซม นอกจากนี้ Ostertag and Kersten (1965) ยังพบว่า การแตกหักของโครโมโซมจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแอคติโนมัยซิน-ดี และมีการแตกหักของโครโมโซมที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของโครโมโซม และยังพบว่าแอคติโนมัยซิน-ดีไม่เพียงแต่จะชักนำให้เกิดการแตกหักของโครมาติดเท่านั้น แต่ยังสามารถทำให้รูปร่างของโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปอีกด้วย

สำหรับผลของแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีต่อวงจรชีวิตของเซลล์นั้น ได้มีการศึกษาพบว่า แอคติโนมัยซิน-ดีนี้สามารถยังยั้งการเจริญของเซลล์ได้ในระยะ G_1, S-phase และ G_2 ดังเช่น Bal and Ste.Marine (1969) รายงานว่า การยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์จะเริ่มขึ้นในระยะเริ่มแรกของระยะ S-phase นอกจากนี้ Epstein *et al.*(1972) ได้รายงานว่า แอคติโนมัยซิน-ดีจะมีผลต่อระยะต้น ๆ ของ G_1 แต่จะไม่มีผลในตอนปลายของระยะ S-phase และในระยะ G_1 และ G_2 แอคติโนมัยซิน-ดีจะยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเออีกด้วย (Rickenson. 1970 ; Doida and Okada. 1972 ; Baxter and Byyoel. 1975) สำหรับในเซลล์แมลงนั้นพบว่าสารแอคติโนมัยซินมีผลทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า apoptosis ได้ (Crook *et al.* 1993 ; Clem and Miller, 1994) ซึ่ง Kerr *et al.*(1972) และ Wyllie (1980) ได้อธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวไว้ว่า เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางพันธุศาสตร์ของเซลล์ในการควบคุมการสืบพันธุ์โดยจะทำให้เซลล์ตายลง หรือเป็นการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นโดยเซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาอย่างเห็นได้ชัด ต่อมาจะเกิดการหดตัวรวมกันแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์จากนั้นจะเกิดการหดตัวของเซลล์ ในช่วงท้ายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ โครงสร้างของเซลล์แตกสลาย และเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอและมีผลให้เซลล์ตายลง (Eastman *et al.* 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 แมลงและเชื้อโรคแมลง

3.1.1 ระยะไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณอุทัย เกตุนุติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3.1.2 ไวรัสโรคแมลงชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (*Ha*SNPV), *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (*Ac*MNPV), *Galleria mellonella* nucleopolyhedrovirus (*Gm*MNPV), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) และ *Helicoverpa armigera* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Ha*CPV), *Euxoa scandens* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Es*CPV), *Choristoneura fumiferana* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Cf*CPV), *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Bm*CPV) และ *Dendrolimus punctatus* cytoplasmic polyhedrosis virus (*Dp*CPV) ได้รับความอนุเคราะห์จาก คุณอุทัย เกตุนุติ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และ Prof. Dr. Serge Belloncik

3.1.3 สารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ซึ่งเป็นสูตรทางการค้า คือ Thuricide® (var. *kurstaki*) จาก Thermo Ecotek Corporation (Ontario, แคนาดา), Teknar-HPD® (var. *israelensis*) จาก Zoecon Canada Inc. (Mississauga. Ontario, แคนาดา), Trident® (var. *tenebrionis*) จาก Sandoz Agro Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา) และ blank ซึ่งประกอบด้วย Thuricide® จาก Thermo Ecotek Corporation (Ontario, แคนาดา) ที่มีฤทธิ์เฉื่อย ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Serge Belloncik

3.1.4 สารพิษ destruxins จากเชื้อรา *Matarrhizium anisopliae* ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Serge Belloncik

3.2 อุปกรณ์

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

3.2.2 ตู้บ่มเชื้อชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (incubator) จากบริษัท Sheldon Manufacturing, U.S.A.

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, Japan

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

3.2.5 เครื่องนับเซลล์ (cell counter) จากบริษัท Gemmy Industrial Co.

3.2.6 ฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) จากบริษัท Boeco, Germany

3.2.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath) จากบริษัท Memmert, Germany

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

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

3.2.10 ชุดกรองและแผ่นเมนเบรนขนาด 0.2, 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 และตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จากบริษัท Sanyo electric treading Co. Ltd.

3.2.13 ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากบริษัท ซันโย ยูนิเวอร์เซล อิเลคตริค จำกัด (มหาชน), ประเทศไทย

3.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, CyberScan : model pH2000) จากบริษัท Eutech Cybernetics, singapore

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

3.2.16 เครื่องดูดสารแบบอัตโนมัติ (automated pro pipet, Jencon : Powerpette plus) จากบริษัท Jencons Scientific Ltd., U.S.A.

3.2.17 หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 10 มิลลิลิตร จากบริษัท Pyrex, U.S.A.

3.2.18 ปิเปตต์แก้ว ขนาด 1, 5, 10 และ 25 มิลลิลิตร จากบริษัท Schott, Germany

3.2.19 จานหลุมชนิด 96 หลุม (96 well Tissue culture plate, Corning) จากบริษัท Corning Incoporated, U.S.A.

3.2.20 ขวดแก้วสำหรับบรรจุสาร ขนาด 50, 100, 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (DURAN) จากบริษัท Schott, Germany

3.2.21 ขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร (Sterile erlenmayer flask, DURAN) จากบริษัท Schott, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.22 หลอดพลาสติกทนอุณหภูมิต่ำ (Cryovial) จากบริษัท Aktiengesellschaft & Co., Germany

3.2.23 เครื่องผลิตน้ำบริสุทธิ์ (water - purification equipment, FiSteam Cyclon : model WSC901.PDC.5, WSCo44. MH3.4 และ WSC900. RIB.9) จากบริษัท Jencons (Scientific) Ltd.

3.2.24 เครื่องเขย่า (Orbital shaker, Gemmy : model VRN-200) จากบริษัท Gemmy Industrial Co., Taiwan

3.2.25 โกร่งบดยา

3.2.26 ชุดอิเล็คโทรโฟรีซีสแบบแนวตั้ง จากบริษัท Bio-rad labulatory, U.S.A.

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ (Grace's) และ TC 100 จากบริษัท Life Technology, U.S.A.

3.3.2 แลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสท (lactalbumin hydrolysate 50X) จากบริษัท Life Technology, U.S.A.

3.3.3 ยีสโตเลท (yeastolate 50X) จากบริษัท Life Technology, U.S.A.

3.3.4 เจนตามัยซิน (gentamycin) จาก องค์การเภสัชกรรม, ประเทศไทย

3.3.5 ซีรัม (Fetal bovine serum, FBS) จากบริษัท Life Technology, U.S.A.

3.3.6 พลูโรนิค โพลีออล เอฟ 68 (pluronic polyol F-68) จากบริษัท Life Technology, U.S.A.

3.3.7 ทริปแพนบลู (Trypan blue) จากบริษัท Sigma, U.S.A.

3.3.8 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodesyl sulfate) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.9 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) จากบริษัท Merck, Germany

3.3.10 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) จากบริษัท Baker Analyzed, U.S.A.

3.3.11 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) จากบริษัท Carlo Erba Reagenti

3.3.12 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล (ethanol) จาก องค์การสุรา กรมสรรพสามิต, ประเทศไทย

3.3.13 ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) จากบริษัท Amresco, U.S.A.

3.3.14 แอล-ซีสเตอีน (L-Cystein) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.15 เมทานอล (methanol) จากบริษัท Merk, Germany

3.3.16 กรดอะซิติก (acetic acid) จากบริษัท Merk, Germany

3.3.17 สารละลายโคซีมิด (colcemid® solution) จากบริษัท Life technology, U.S.A.

3.3.18 สีย้อม Giemsa's stain จากบริษัท Merk, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.19 Tris-HCl จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.20 กรดซิตริก (citric acid) จากบริษัท Baker analyzed, U.S.A.

3.3.21 ซูโครส (sucrose) จากบริษัท น้ำตาลทรายมิตรผล จำกัด, ประเทศไทย

3.3.22 บรอมฟีนอล บลู (Bromphenol blue) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.3.23 ไตรทรอน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.24 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) จากบริษัท Merk, Germany

3.3.25 ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Bradford dye จากบริษัท Bio-Rad Laboratory, Canada

3.3.26 โบวายซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) จากบริษัท Bio-Rad Laboratory, Canada

3.3.27 แอคติโนมัยซิน-ดี (actinomycin-D) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.28 กลีเซอรอล (glycerol) จากบริษัท Pharmacia Biotech., Sweden

3.3.29 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) จากบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

3.3.30 เททระเมทิลีนไดอามีน (tetramethylenediamine) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.31 บิวทานอล (butanol) จากบริษัท Merk, Germany

3.3.32 Tris-base จากบริษัท Promega Corporation, U.S.A.

3.3.33 ไกลซีน (glycine) จากบริษัท Promega Corporation, U.S.A.

3.3.34 Fast blue RR salt จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.35 อัลฟาแนปทิลอะซิเตท (α-napthyl acetate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.36 กรดมาลิก (malic acid) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.37 แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) จากบริษัท Fuka, Switzerland

3.3.38 ฟีนาไซด์ เมโทรซัลเฟต (phenazine methosulphate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.39 ไนโตร บลู เททระโซเลียม (nitro blue tetrazolium) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.40 เททระโซเลียม เอ็มทีที (tetrazolium MTT) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.41 กลูโคสซิกฟอสเฟต (glucose-6-phosphate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.42 นิโคตินามาย อะดินีน ไดฟอสเฟต (nicotinamide adenine diphosphate) จากบริษัท Sigma, Germany

3.3.43 อะซิโตน (acetone) จากบริษัท Sharlau Chemie S.A., Spain

3.3.44 กลูทารอลดีไฮด์ (glutaraldehyde) จากบริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Ltd., Australia

3.3.45 อะคลิลาไมด์ (acrylamide) จากบริษัท Amersham International, England

3.3.46 บีส-อะคลิลาไมด์ (bis-acrylamide) จากบริษัท Amersham International, England

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.47 โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (sodium hydrogen carbonate) จากบริษัท Merk, Germany

3.3.48 โพแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride) จากบริษัท Merk, Germany

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง

อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงที่ใช้ในการทดลองนี้มี 2 ชนิด คือ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซและอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100

- อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ มีวิธีการเตรียมดังนี้

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสำเร็จรูปเกรซ (incomplete) ชนิดของเหลว
ปริมาตร 500 มิลลิลิตร มาเติมด้วยเจนตามัยซินลงไปในปริมาณ 1 มิลลิลิตร

↓

นำแลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสทชนิด 1X และยีสโตเลทชนิด 1X ซึ่งได้มาจาก
การนำแลคทาลบูมิน ไฮโดรไลเสทชนิด 50X และยีสโตเลทชนิด 50X มาทำให้เจือจาง
แล้วนำมากรองบนตัวกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร อย่างละ 10 มิลลิลิตร
ใส่ลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ

↓

จากนั้นนำซีรัมมาใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของ
ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง โดยกรองบนตัวกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่ผ่านการเติมสารต่าง ๆ ข้างต้น
มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.2

↓

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเรียบร้อยแล้ว
ไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 มีวิธีการเตรียมดังนี้

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงสำเร็จรูป TC 100 ชนิดผง มาละลายในน้ำ deionized-distill water (di-H_2O) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.0-6.1

↓

จากนั้นนำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 ที่ละลายน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และมีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0-6.1 มากรองบนตัวกรองผ่านเมนเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

เติมเจนตามัยซินปริมาณ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง ชนิด TC 100 (incomplete) ที่ผ่านการกรองเรียบร้อยแล้ว

↓

นำซีรัมมาใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 ที่ผ่านการกรองเรียบร้อยแล้ว ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง โดยกรองบนตัวกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

↓

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 ที่ผ่านการเติมสารต่าง ๆ ข้างต้น มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 6.2

↓

นำอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเรียบร้อยแล้ว ไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (primary culture) จากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

การสร้างกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน เริ่มทำการปลูกเซลล์ ดังขั้นตอนต่อไปนี้

ไข่ที่แม่ผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันวางบนผ้าขาวบาง

↓

ฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของไข่ด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ ฟอร์มาลดีไฮด์ นาน 10 นาที

↓

ล้างผ่านน้ำไหล 2 ครั้ง

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผึ่งให้แห้งและเก็บไว้ในที่ปลอดเชื้อ เป็นเวลา 2 วัน

↓

แยกไข่ที่มีตัวอ่อนอยู่ภายในมองเห็นเป็นจุดสีดำ จำนวน 200-300 ฟอง
ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว

↓

ฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของไข่ด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล นาน 10 นาที

↓

นำไปปั่นให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

↓

ดูดเอทานอลทิ้ง และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซ (incomplete) ลงไป และทำการปั่น
ให้ตกตะกอนที่ 3,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง และดูดอาหารออกทิ้งไป

↓

เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วย
ซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ (20% FBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

↓

บดเนื้อเยื่อตัวอ่อนออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยแท่งแก้ว

↓

เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
ลงในหลอดแก้ว ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงดูดออกมาใส่ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่
25 ตารางเซนติเมตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

↓

นำขวดเพาะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

↓

เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดเกรซที่เสริมด้วยซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
และเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำตามขั้นตอนนี้อีกครั้ง
รวมปริมาตรของอาหารในขวดเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 มิลลิลิตร

↓

ดูดอาหารเดิมออกทิ้งปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และเติมอาหารใหม่ลงไปปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
(อัตราส่วน 1 : 1) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ทำตามขั้นตอนนี้
จนกระทั่งเซลล์เจริญแผ่กว้างออกไปจากกลุ่มเซลล์เริ่มแรกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์
ของพื้นที่ผิวของขวดเพาะเลี้ยง

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดูดอาหารเดิมออกทิ้งทั้งหมด และเติมอาหารใหม่ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร
เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 5 วัน
จนกระทั่งเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงหรือเจริญคลุมพื้นที่ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

↓

ทำการถ่ายเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงขวดใหม่ต่อไป

3.4.3 การถ่ายเซลล์เพาะเลี้ยง (subculture)

หลังจากเพาะเลี้ยงกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันได้ประมาณ 3 เดือน สังเกตการเจริญของเซลล์ที่เจริญแผ่กว้างออกไปจากกลุ่มเซลล์เริ่มแรกจนกระทั่งประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ผิวขวดเพาะเลี้ยงจึงจะทำการถ่ายเซลล์ วิธีการถ่ายเซลล์ที่สะดวกที่สุดคือ การเคาะเบา ๆ ให้เซลล์หลุดออกจากผิวขวดเพาะเลี้ยง แต่ถ้าเซลล์เกาะติดแน่นจะใช้วิธีการขูดเซลล์ด้วย rubber policeman ทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยงจนหมด สังเกตได้จากการใช้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope ย้ายเซลล์ที่หลุดออกมา ใส่ลงในขวดเพาะเลี้ยงขวดใหม่ โดยใช้ปริมาตรของเซลล์ที่ลอยอยู่ในอาหารเดิม 1 ส่วน (2.5 มิลลิลิตร) ต่ออาหารใหม่ 1 ส่วน (2.5 มิลลิลิตร) นำไปเก็บไว้ที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 5 วัน เซลล์ที่ได้นี้เรียกว่า เซลล์ไลน์ (cell line) และนับเป็นเซลล์ไลน์พาสเสจที่ 1 (the first passage) เมื่อเซลล์รุ่นที่ 1 เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง จะทำการถ่ายเซลล์เป็นพาสเสจที่ 2 ทำเช่นนี้เรื่อยไป

3.4.4 การศึกษาการเจริญของเซลล์

ศึกษาการเจริญของเซลล์ในลักษณะที่เป็นการเจริญแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer) โดยใช้จำนวนเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ 2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอาหาร TC 100 ที่เติมซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวัน โดยการขูดเซลล์ด้วย rubber policeman และนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์

3.4.5 การวิเคราะห์คารีโอไทป์

วิธีการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lee and Hou (1992) และ Lucassen (1993) ดังนี้ นำเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ซึ่งมีอายุ 2 วัน ที่มีการเจริญในระยะ log phase จำนวน 2×10^5 เซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ (25-T flask) นำมาเติมด้วย สารละลายโคซีมิด (colcemid® solution) ที่มีความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการขูดเซลล์ให้หลุดจากพื้นผิวภาชนะเพาะเลี้ยง แล้วจะนำในทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแยกตะกอนเซลล์มาทำให้แขวนลอย ในสารละลายโพแตสเซียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.56 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 30 นาที แล้วทำการตรึงเซลล์โดยทำให้แขวนลอยในสารละลายเมทานอลต่อกรดอะซิติกที่มีอัตราส่วน 3 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงนำสารละลายเซลล์แขวนลอยมาทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเมทานอลต่อกรดอะซิติกอัตราส่วน 3 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อตรึงเซลล์ นำเซลล์ที่ถูกตรึงไว้มาหยดบนสไลด์แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำมาย้อมด้วยสารละลาย Giemsa (อัตราส่วนของสีย้อม Giemsa's stain ต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1 ต่อ 15 ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยจุ่มสไลด์ลงในสารละลาย Giemsa เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นและวางผึ่งให้แห้ง จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

3.4.6 การวิเคราะห์ไอโซไซม์

การวิเคราะห์ไอโซไซม์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Harris and Hopkinson (1977) จะเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์อื่น ๆ ได้แก่ เซลล์ไลน์ของ *H. armigera* (HA-831), *Spodoptera exigue* (SE-1), *Ostrinia nubilalis* (AFKM-ON-H) กับเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-1 รวมทั้งตัวหนอนของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (*H. armigera*) โดยนำเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่มีอายุ 3 วันมาทำให้แขวนลอยใน 150 ไมโครลิตรของ lysis buffer (0.15M Tris-HCl ที่ pH7.1, 46mM Citric acid, ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์, Triton X-100 1 เปอร์เซ็นต์) และทำให้เซลล์แตกโดยนำไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนของ supernatant มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ โดยนำไปทำอิเล็คโทรโฟรีซีสใน 30 เปอร์เซ็นต์ T, 2.7 เปอร์เซ็นต์ C อะคริลาไมด์เจล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าศักย์ไฟฟ้าที่ 200 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วนำมาย้อมสีเพื่อตรวจหา esterase, malate dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

3.4.7 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลง

การทดสอบการจำลองตัวของไวรัสโรคแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น *Ha*SNPV, *Ac*MNPV, *Gm*MNPV, *Se*MNPV, *Ha*CPV, *Es*CPV, *Cf*CPV, *Bm*CPV และ *Dp*CPV เป็นต้น โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ใช้ไวรัสในรูปแบบอนุภาคไวรัสอิสระ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อเซลล์จำนวน 1×10^6 เซลล์ ในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร ระยะเกาะติดของไวรัสกับเซลล์ (adsorption period) 1 ชั่วโมง จากนั้นดูด inoculum ออกไปและล้างส่วนที่ติดค้างออกด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 (incomplete medium) 2 ครั้ง ๆ ละ 1 มิลลิลิตร (เฉพาะเซลล์ที่ทดสอบกับนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส) จากนั้นเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิด TC 100 เสริมด้วยซีรัม 10 เปอร์เซ็นต์ ปรับให้มีปริมาตร 5 มิลลิลิตร และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลการทดลองโดยสังเกตการเกิด cytopathic effect (CPE) และการสร้างผลึกโปรตีนเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.8 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษ

3.4.8.1 สารพิษจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis*

การทดสอบนี้จะใช้สารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* ซึ่งเป็นสูตรทางการค้า คือ Thuricide® (var. *kurstaki*) จาก Thermo Ecotek Corporation (Ontario, แคนาดา), Teknar-HPD® (var. *israelensis*) จาก Zoecon Canada Inc. (Mississauga. Ontario, แคนาดา), Trident® (var. *tenebrionis*) จาก Sandoz Agro Canada Inc. (Mississauga, Ontario, แคนาดา) และ blank ซึ่งประกอบด้วย Thuricide® จาก Thermo Ecotek Corporation ที่มีฤทธิ์เฉื่อย

สำหรับผลึกโปรตีนของแบคทีเรีย *Bt.* ซึ่งเป็นสูตรทางการค้า และ blank จะทำการทดลองตามวิธีการของ Thomas and Ellar (1983) ซึ่งวิธีการนี้จะถูกนำมาประยุกต์ใช้โดย Charpentier *et al.* (1995) โดยนำผลึกสปอร์ของ *Bt.* ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ใน 4.5 มิลลิลิตรของ incomplete medium แล้วเติม 0.5M Na_2CO_3 (pH10.5) ลงไป 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับสภาพความเป็นกรด-ด่าง ให้มีค่าเท่ากับ 7 โดยใช้ 1N HCl จากนั้นนำไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนของ supernatent ไปกรองผ่านแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทำโดยใช้ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของ Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories. Mississauga. Ontario, แคนาดา) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นมาตรฐาน และทำการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford (Bradford. 1976) (วิธีการวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก)

ในการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษของแบคทีเรีย *Bt.* ทำโดยปลูกเซลล์ที่ระดับความหนาแน่น 35,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยใส่สารละลายเซลล์ที่มีความหนาแน่นดังกล่าวหลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารละลายสารพิษของแบคทีเรียที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตั้งแต่ 1/2 จนถึง 1/1024 ในปริมาณหลุมละ 50 ไมโครลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 8 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ แล้วสังเกต cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปหาค่า Tissue Culture Toxicity Dose ($TCTD_{50}$)

3.4.8.2 สารพิษ destruxins จากเชื้อรา *Metarrhizium anisopliae*

นำผงเชื้อรา *M. anisopliae* ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาละลายในอะซิโตนปริมาณ 2.9 มิลลิลิตร จากนั้นเติม incomplete medium ลงไปอีก 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์หนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยทำการทดสอบที่ระดับความเจือจางของสารพิษจากเชื้อราระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ที่ระดับความเจือจาง 1/2 จนถึง 1/1024 ตามลำดับ ระดับความเจือจางละ 4 หลุม จำนวน 3 ซ้ำ โดยทำการปลูกเซลล์ที่ระดับความหนาแน่น 35,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุม ๆ ละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำสารละลายสารพิษของเชื้อราที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ใส่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร แล้วสังเกต cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ที่ 72 ชั่วโมง แล้วนำไปหาค่า Tissue Culture Toxicity Dose ($TCTD_{50}$) ต่อไป

สำหรับการทดลองเปรียบเทียบ จะนำอะซิโตนปริมาตร 2.9 มิลลิลิตร ผสมกับ incomplete medium ปริมาณ 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปกรองผ่านแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบการตอบสนองของเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม โดยทำการทดสอบที่ระดับความเจือจางละ 4 หลุม ตั้งแต่ที่ระดับความเจือจาง 1/2 จนถึง 1/1024

3.4.8.3 สารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี

นำสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี ปริมาณ 2 มิลลิกรัม มาละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จะได้สารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซินดีที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติม incomplete medium ลงไป 7.9 มิลลิลิตร จะได้ stock solution ของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 8 มิลลิลิตร เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลอง

ในการนำมาทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ กระทำโดยปลูกเซลล์ที่ระดับความหนาแน่น 35,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม โดยใส่สารละลายเซลล์ที่ระดับความหนาแน่นของเซลล์ดังกล่าวลงไปหลุมละ 150 ไมโครลิตร จากนั้นใส่สารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร ที่แต่ละระดับความเจือจางตั้งแต่ pure จนถึง 1/1024 โดยใส่ระดับความเจือจางละ 4 หลุม แล้วสังเกต cytopathic effect (CPE) ของเซลล์ที่ 7 วัน แล้วนำไปหาค่า Tissue Culture Toxicity Dose ($TCTD_{50}$) ต่อไป สำหรับการทดลองเปรียบเทียบจะทำเช่นเดียวกันแต่จะใช้เฉพาะเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

3.4.9 การตรวจดูการแตกหักของดีเอ็นเอในเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*

นำเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่มีอายุ 3 วัน มาทำการเปลี่ยนถ่ายเอาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วใส่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน จึงนำเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ไปทำการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแตกหักของดีเอ็นเอ สำหรับการตรวจสอบในเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารพิษจากเชื้อรานั้น จะนำเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่มีอายุ 3 วัน มาทำการเปลี่ยนถ่ายเอาอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมออก แล้วใส่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับความเจือจางของสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่อยู่ในระดับ 1/10 ลงไป ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 วัน จึงนำเซลล์ไลน์ที่เตรียมไว้ไปทำการสกัดดีเอ็นเอ ในการทดสอบกับสารพิษจากเชื้อรานี้จะทำการเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ด้วย ซึ่งมีกระบวนการเช่นเดียวกับที่ทำในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 แต่จะใช้อาหารเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่มีระดับความเจือจางของสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่อยู่ในระดับ 1/10000 แทน (วิธีการสกัดดีเอ็นเอดูในภาคผนวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มแรกของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน

กลุ่มเซลล์เริ่มแรกซึ่งได้จากเนื้อเยื่อของตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ (embryonated eggs) ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน โดยทำการปลูกเซลล์ครั้งแรกเมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2543 ณ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากการสังเกตการเจริญของกลุ่มเซลล์พบว่าเซลล์มีการแบ่งตัวแผ่ออกไปจากกลุ่มเซลล์ที่ปลูกครั้งแรก (explant) (ภาพที่ 4.1 ก) ลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน จากภาพที่ 4.1 ข พบเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีแวคคิวโอลคล้าย companion cells ส่วนภาพที่ 4.1 ค ลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่เป็นรูปกระสวย (fibroblast-like cells) และพบเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (epithelial-like cells) อยู่บ้างเล็กน้อย สำหรับลักษณะของเซลล์อีกชนิดหนึ่งที่พบคือ myoblast-like cells ซึ่งเซลล์ชนิดนี้มีการหดตัวได้ในระยะแรกที่ทำการปลูกเซลล์ จนกระทั่งประมาณ 3-6 เดือนหลังปลูกเซลล์เริ่มแรก (ภาพที่ 4.1 ง)

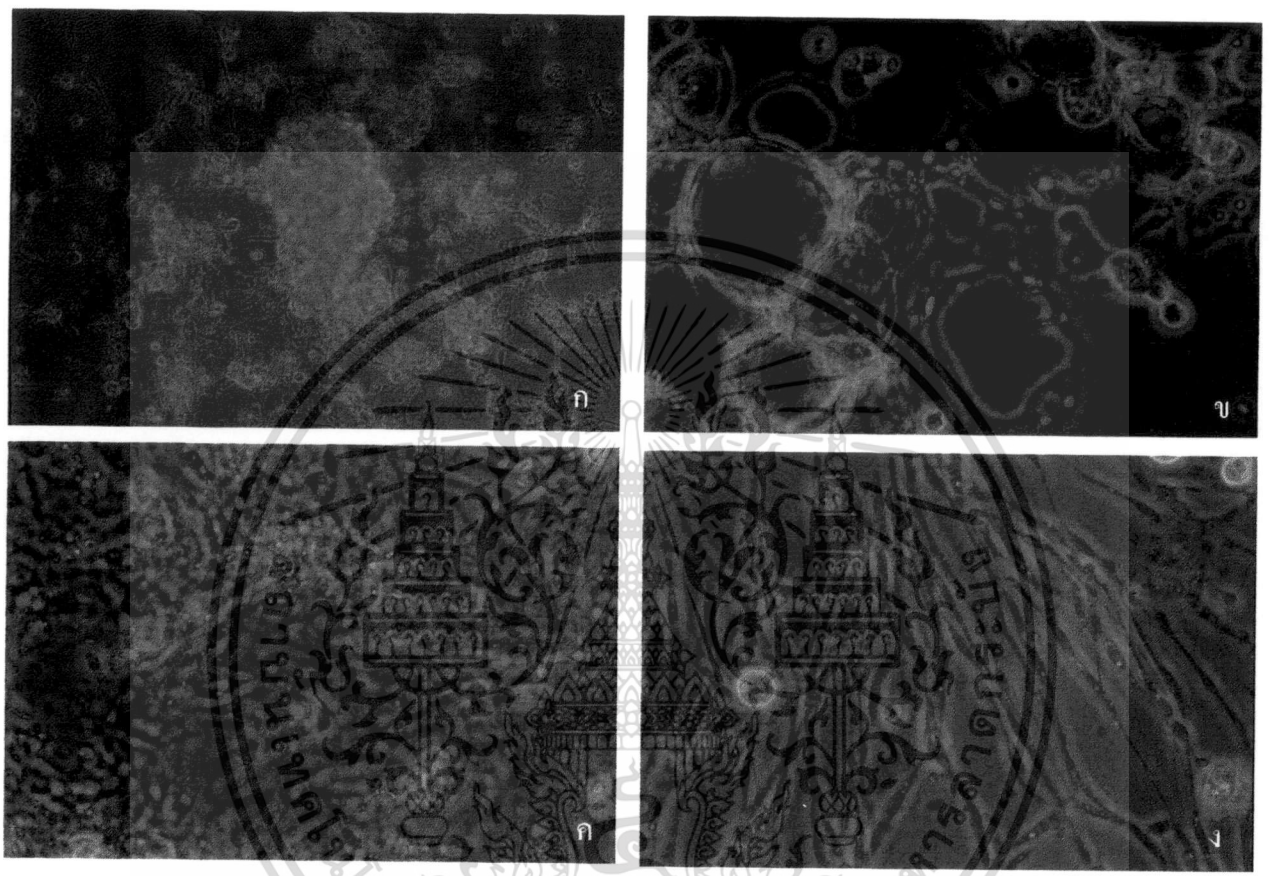
ภายหลังจากการปลูกเซลล์ได้นาน 107 วัน พบว่าเซลล์แบ่งตัวเจริญปกคลุมพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ได้เป็นพาสเสจ (passage) ที่ 1 เมื่อเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงจะทำการถ่ายเซลล์ต่อไป จากภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นลักษณะของเซลล์พาสเสจที่ 2 เซลล์ส่วนใหญ่มี 2 รูปแบบ คือ ลักษณะเป็นแบบกระสวย (fibroblast-like cells) (ภาพที่ 4.2 ก และ ข) และเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (epithelial-like cells) (ภาพที่ 4.2 ค และ ง) จากการตรวจวัดขนาดของเซลล์พาสเสจที่ 46 พบว่าเซลล์ที่มีรูปร่างกลม (epithelial-like cells) จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 8-24 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ที่มีรูปร่างแบบกระสวย (fibroblast-like cells) จะมีความกว้างเฉลี่ย 12-32 ไมโครเมตร ความยาวเฉลี่ย 16-36 ไมโครเมตร และพบเซลล์รูปร่างกลมที่มีขนาดใหญ่ (giant cell) ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 48 ไมโครเมตร ปัจจุบันได้ทำการถ่ายเซลล์ถึงพาสเสจที่ 80 (วันที่ 1 พฤษภาคม 2546) ลักษณะของเซลล์ไลน์ที่ได้ดังแสดงในภาพที่ 4.3 เซลล์ไลน์ที่พบมี 2 รูปแบบ คือ เซลล์รูปร่างกลม (epithelial-like cells) และเซลล์รูปกระสวย (fibroblast-like cells) ซึ่งจะพบเห็นได้ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน เซลล์ไลน์ที่ได้ตั้งชื่อดังนี้ KMITL-HA-E1 ซึ่งมีความหมายดังนี้

KMITL	หมายถึง	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
HA	หมายถึง	ชนิดของแมลงที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อเริ่มต้น คือ *Helicoverpa armigera*
E	หมายถึง	แหล่งของเนื้อเยื่อเริ่มต้นที่ใช้ในการสร้างเซลล์ไลน์ ซึ่งได้มาจาก Embryo
1	หมายถึง	เลขที่ของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจดูโครงสร้างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 61 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปที่บริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์จะพบไมโตคอนเดรียจำนวนมาก มีแวคคิวโอลและเอ็นโดพลาสมิคเรติคูลัมปรากฏให้เห็นอยู่บ้าง นอกจากนั้นยังพบกลุ่มของดีเอ็นเอที่ขดรวมกันอยู่ภายในบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนี้สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ที่สร้างขึ้นนี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนของไวรัสหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น (แบคทีเรีย เชื้อรา และไมโครพลาสมา) (ภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะรูปร่างของกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (explant) ที่มีอายุ 107 วัน

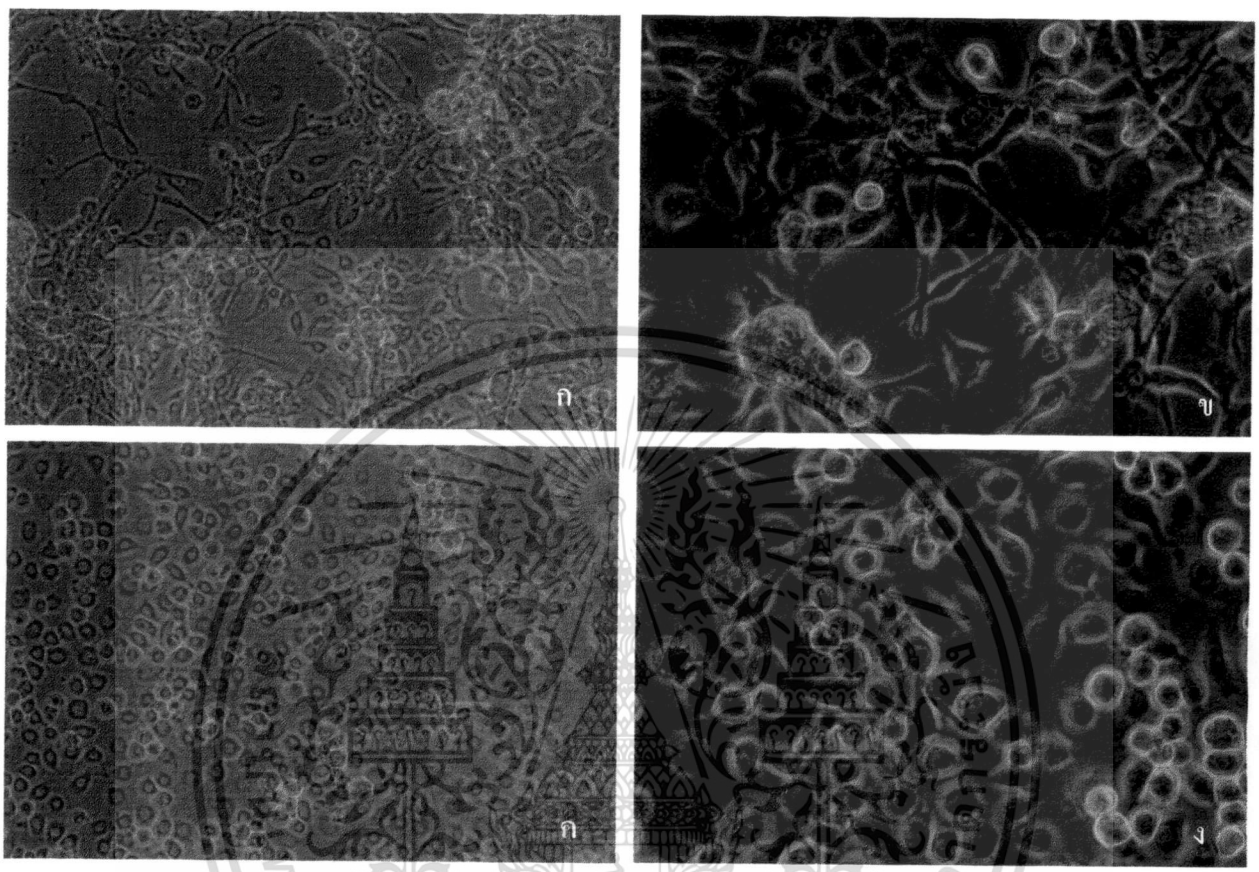
ก. กลุ่มเซลล์เริ่มแรกที่มีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ กัน (กำลังขยาย 100 เท่า)

ข. กลุ่มเซลล์เริ่มแรกที่มีกลุ่มเซลล์รูปร่างแบบ companion cells (กำลังขยาย 400 เท่า)

ค. กลุ่มเซลล์เริ่มแรกที่มีกลุ่มเซลล์รูปร่างแบบกระสวย (fibroblast-like cells) (กำลังขยาย 400 เท่า)

ง. กลุ่มเซลล์เริ่มแรกที่มีกลุ่มเซลล์รูปร่างแบบ myoblast-like cells (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 2

ก. เซลล์ไลน์อายุ 22 วัน มีรูปร่างแบบกระสวย (fibroblast-like cells) (กำลังขยาย 200 เท่า)

ข. เซลล์ไลน์อายุ 22 วัน รูปร่างส่วนใหญ่เป็นแบบกระสวย (fibroblast-like cells) (กำลังขยาย 400 เท่า)

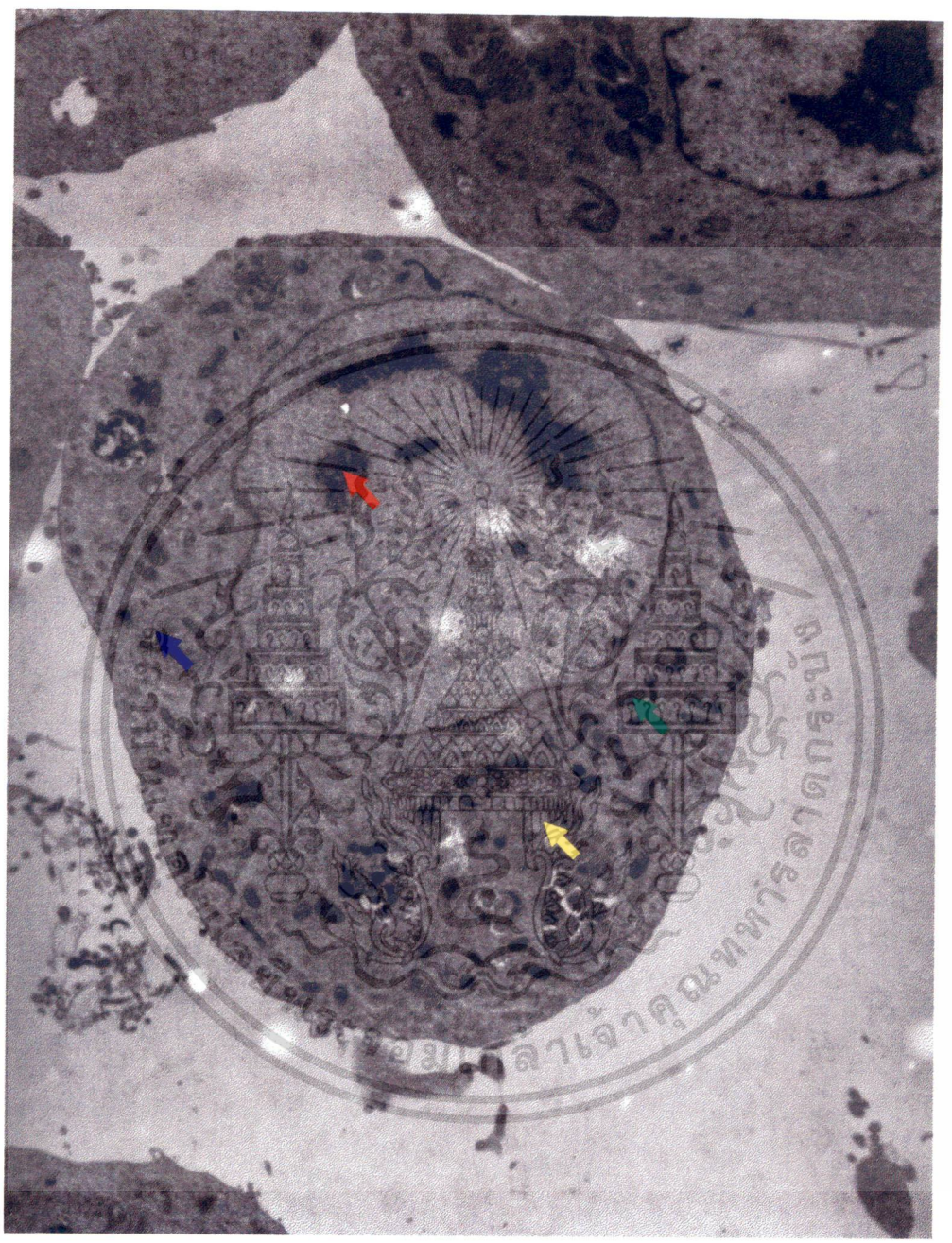
ค. เซลล์ไลน์อายุ 7 วัน เซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม (epithelial-like cells) (กำลังขยาย 400 เท่า)

ง. เซลล์ไลน์อายุ 7 วัน พบเซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม (epithelial-like cells) (กำลังขยาย 200 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะรูปร่างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 80 อายุ 3 วัน ซึ่งจะพบเซลล์ 2 รูปแบบ คือ epithelial-like cells และ fibroblast-like cells

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



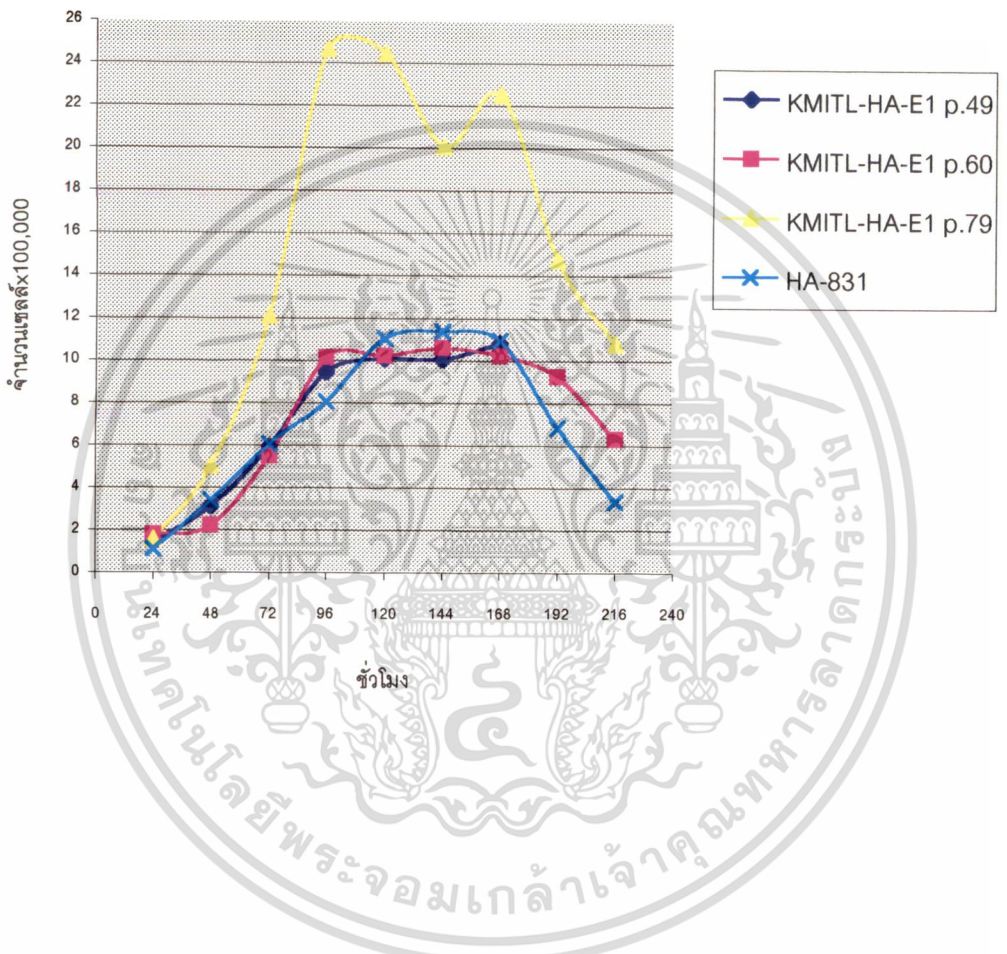
ภาพที่ 4.4 แสดงโครงสร้างของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่กำลังขยาย 11,500× ไซโตพลาสซึมของเซลล์ประกอบด้วยไมโตคอนเดรีย (➡), แวคคิวโอล (➡), เอ็นโดพลาสมิคเรติคูลัม (➡) และพบกลุ่มของดีเอ็นเอ (➡) ขดอยู่รวมกันภายในนิวเคลียสของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การศึกษาการเจริญของเซลล์

จากการทดลองหากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 (ภาพที่ 4.5) พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 49 จะมีช่วงการเจริญระยะ lag phase ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดขึ้นก่อนช่วง log phase ที่มีการเจริญนั้น อยู่ประมาณ 48 ชั่วโมง อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้ว 96 ชั่วโมง จำนวนของเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ผิว 25 ตารางเซนติเมตร มากที่สุดประมาณ 5.41×10^6 เซลล์ ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 1.08×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.4 เท่า สำหรับเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 60 จะมีช่วงการเจริญระยะ lag phase อยู่ประมาณ 24 ชั่วโมง อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้ว 96 ชั่วโมง จำนวนของเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงมากที่สุดประมาณ 5.3×10^6 เซลล์ ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 1.06×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.3 เท่า ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 79 จะมีช่วงการเจริญระยะ lag phase อยู่ประมาณ 30 ชั่วโมง อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้ว 96 ชั่วโมง จำนวนของเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงมากที่สุดประมาณ 12.34×10^6 เซลล์ ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 2.47×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้น 12.34 เท่า สำหรับช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่า (doubling time) ของเซลล์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 49, 60 และ 79 จะอยู่ที่ 55.43, 60.92 และ 40.82 ชั่วโมงตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ HA-831 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่ได้จาก *H. armigera* พบว่ามีช่วงการเจริญระยะ lag phase อยู่ประมาณ 24 ชั่วโมง อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้ว 120 ชั่วโมง จำนวนของเซลล์ในภาชนะเพาะเลี้ยงมากที่สุดประมาณ 5.7×10^6 เซลล์ ซึ่งมีความหนาแน่นของเซลล์เป็น 1.14×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มากกว่าปริมาณเซลล์เริ่มต้น 5.7 เท่า และพบว่าเซลล์มีช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า อยู่ที่ 53.39 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



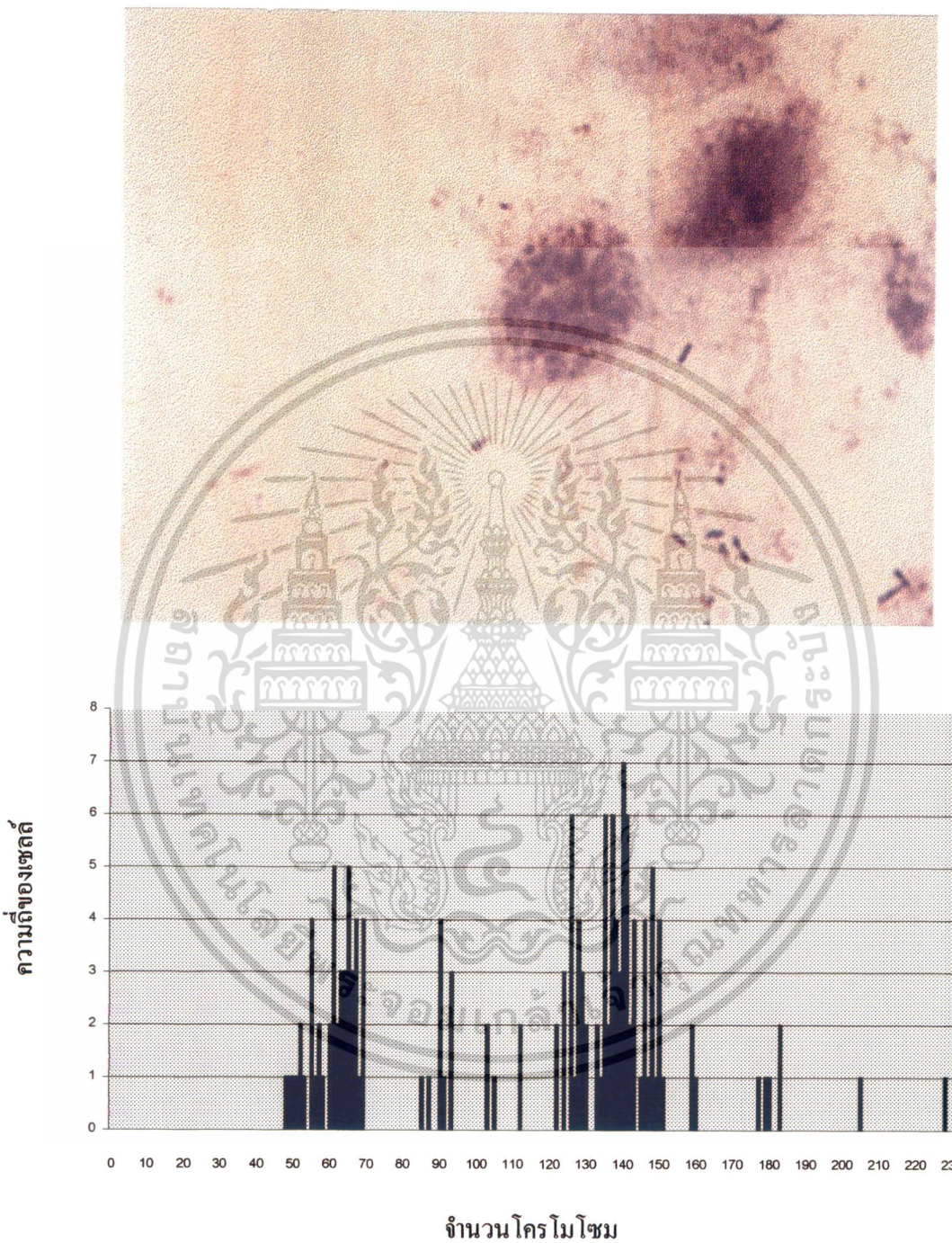
ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 49, 60 และ 79 และเซลล์ไลน์ HA-831 ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด TC100 ที่มีซีรัมเป็นส่วนประกอบอยู่ 10 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การวิเคราะห์คารีโอไทป์

จากการตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่านิวเคลียสของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ประกอบด้วยโครโมโซมจำนวนมาก ซึ่งจะเห็นเป็นลักษณะจุดสีม่วงอมชมพู (ภาพที่ 4.6 ก) จากการสุ่มตัวอย่างเซลล์จำนวน 150 ตัวอย่างมาทำการตรวจนับจำนวนโครโมโซม พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงระหว่าง 48-228 โครโมโซม มีค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 111.45 (ภาพที่ 4.6 ข) โดยที่เซลล์จำนวน 81 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 54 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 122-151 โครโมโซม และเซลล์จำนวน 47 ตัวอย่างหรือคิดเป็น 31.33 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 48-69 โครโมโซม ทำให้กล่าวได้ว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความแปรเปลี่ยนของจำนวนโครโมโซมเป็นอย่างมากเนื่องจากบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมมากถึง 228 โครโมโซม แต่ในบางเซลล์จะพบโครโมโซมเพียง 48 โครโมโซมเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะคารีโอไทป์ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่มีการเจริญในช่วง log phase

ก. แสดงลักษณะของเซลล์ในระยะเมตาเฟส

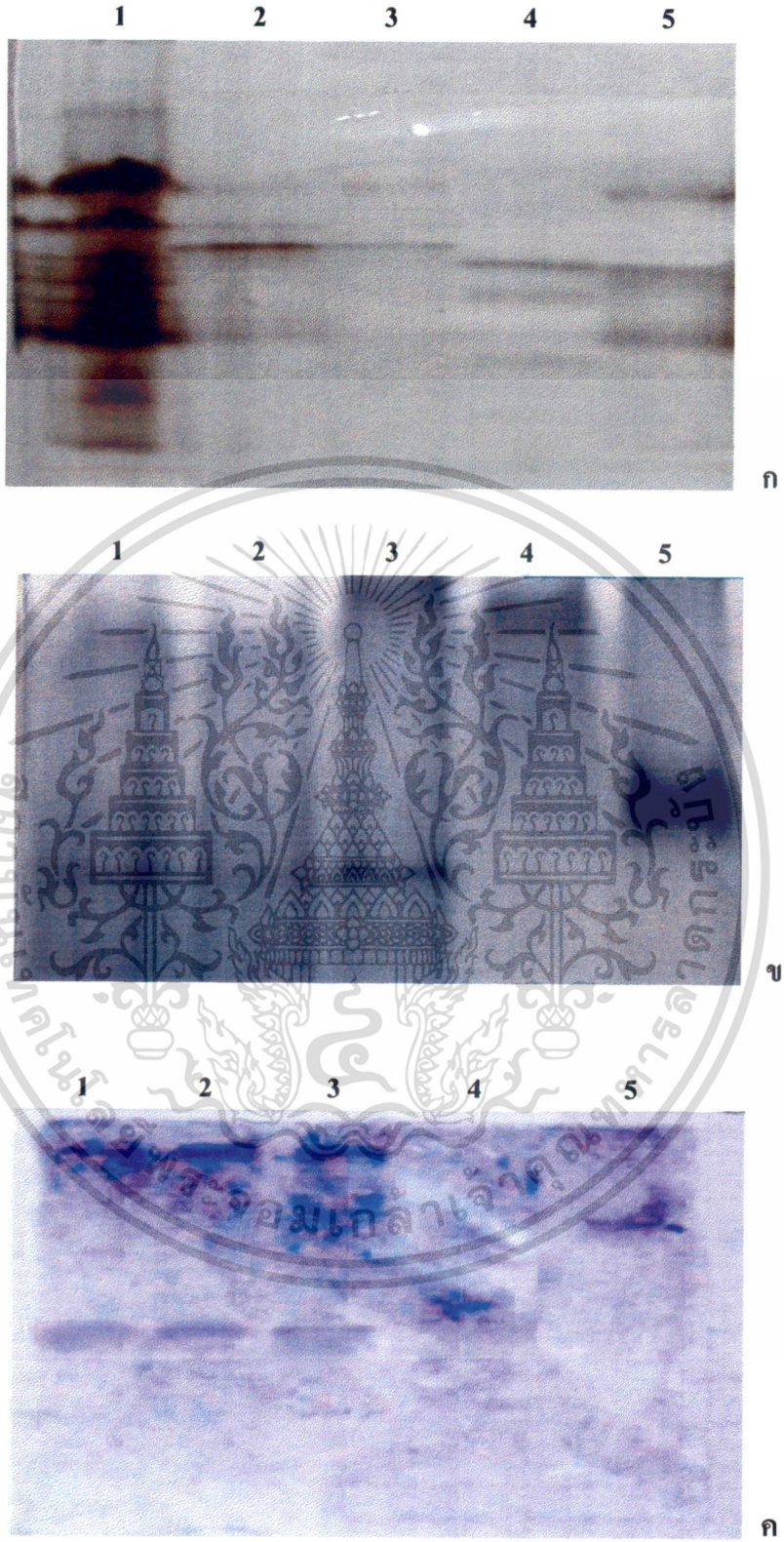
ข. แสดงจำนวนโครโมโซมจากตัวอย่างที่สุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์ไอโซไซม์

จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์ด้วยการนำไปย้อมสีในสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ esterase (EST), malate dehydrogenase (MDH) และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) ในการตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 โดยเปรียบเทียบกับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ HA-831 ที่ได้จาก *H. armigera*, เซลล์ไลน์ SE-1 ที่ได้จาก *Spodoptera exigua*, เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ที่ได้จาก *Ostrinia nubilalis* และเนื้อเยื่อของตัวหนอนระยะที่ 3 ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน (ภาพที่ 4.7) พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ที่สร้างได้ เมื่อนำไปย้อมสีในสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ EST จะมีรูปแบบไอโซไซม์ที่คล้ายกับรูปแบบไอโซไซม์ของเนื้อเยื่อจากตัวหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันและเซลล์ไลน์ HA-831 แต่จะมีความแตกต่างกับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ SE-1 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ส่วนรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อนำไปย้อมสีในสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ MDH พบว่ามีรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกับรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏในเนื้อเยื่อจากตัวหนอนเจาะสมอฝ้าย และมีรูปแบบที่คล้ายกับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ HA-831 แต่จะต่างกับรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏในเซลล์ไลน์ SE-1 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H สำหรับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เมื่อนำไปย้อมสีในสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ G6PDH พบว่ามีรูปแบบไอโซไซม์เหมือนกับรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏในเนื้อเยื่อจากตัวหนอนเจาะสมอฝ้ายและเซลล์ไลน์ HA-831 แต่จะต่างกับรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏในเซลล์ไลน์ SE-1 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 แสดงรูปแบบไอโซไซม์ของ (1) ตัวหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันวัยที่ 3, (2) เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1, (3) เซลล์ไลน์ HA-831, (4) เซลล์ไลน์ SE-1 และ (5) เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ในสารละลายซับสเตรทของ (ก) esterase, (ข) malate dehydrogenase และ (ค) glucose-6-phosphate dehydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลง

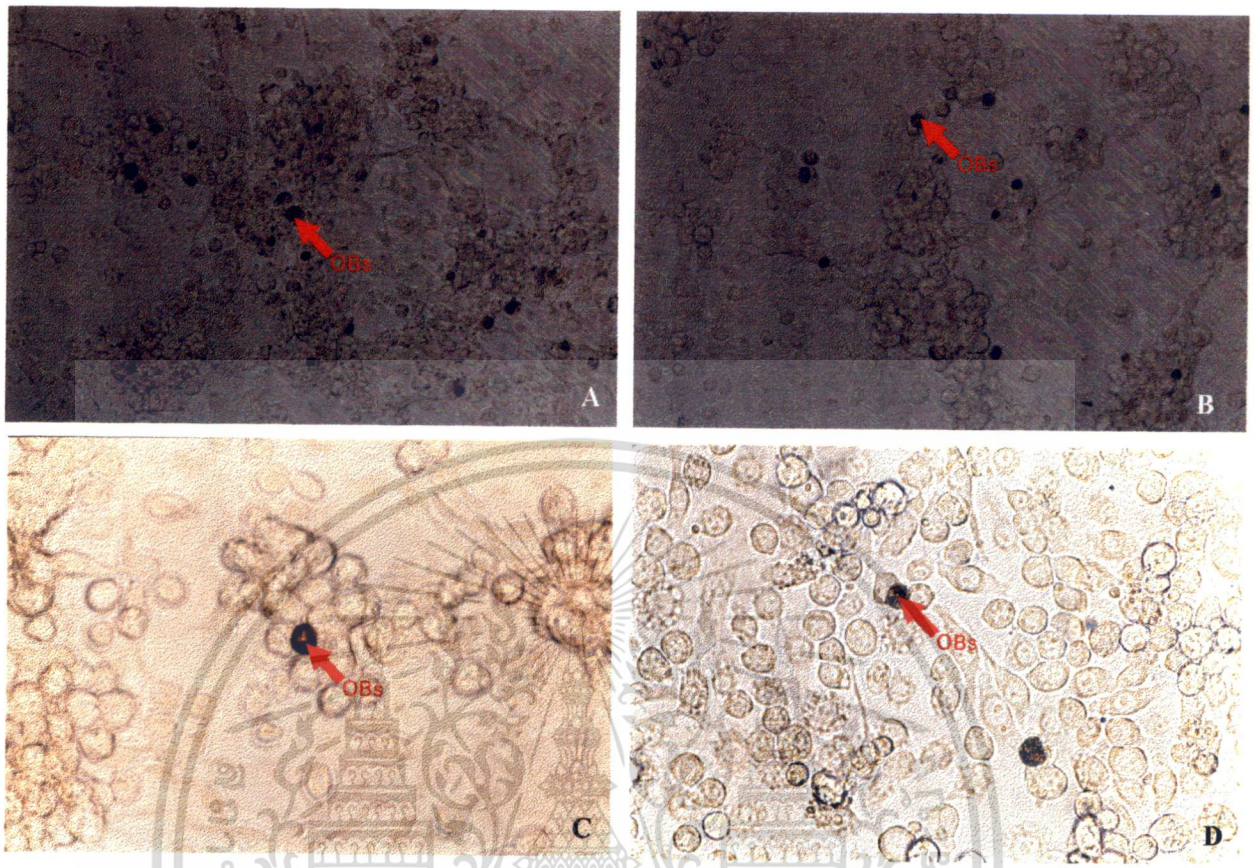
จากการศึกษาถึงคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส 4 ชนิด ได้แก่ *Ha*SNPV *Ac*MNPV *Gm*MNPV และ *Se*MNPV นั้น พบว่ามีเพียงเฉพาะ *Ac*MNPV *Gm*MNPV และ *Ha*SNPV เท่านั้นที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ลักษณะของเซลล์ที่เกิดโรคที่ติดเชื้อจากบาคูโลไวรัสนั้นบริเวณนิวเคลียสของเซลล์จะเป็นบริเวณที่เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย โดยส่วนนิวเคลียสจะขยายใหญ่ขึ้น ภายในมีโครงสร้างแน่นทึบ บริเวณรอบ ๆ จะใส ผลึกของไวรัสขนาดเล็กจะปรากฏขึ้นกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส สำหรับการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส *Ha*SNPV นั้น เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจแรก ๆ จะสามารถตอบสนองต่อเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้ โดยพบว่าเชื้อไวรัส *Ha*SNPV สายพันธุ์นครสวรรค์ สามารถจำลองตัวและสร้างผลึกไวรัสภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 1 ได้ (ภาพที่ 4.8 ก) แต่ในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 2 จะพบเซลล์ที่มีการติดเชื้อลดลง (ภาพที่ 4.8 ข) นอกจากนี้ยังเห็นได้ว่าในเซลล์ไลน์พาสเสจต่อ ๆ มา จะมีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสได้ลดลงเรื่อย ๆ โดยจะพบว่าเซลล์ไลน์พาสเสจที่ 17 และ 30 จะมีความสามารถในการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส *Ha*SNPV ได้ลงลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.8 ค และ 4.8 ง) ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในพาสเสจต่อ ๆ มาหลังจากนี้ไม่พบว่ามีการตอบสนองต่อไวรัส *Ha*SNPV อีก สำหรับการตอบสนองของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อไวรัส *Ac*MNPV จะเริ่มมีผลึกไวรัสปรากฏให้เห็นในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ โดยพบว่าเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อจะมีผลึกไวรัสอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 ข) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส (ภาพที่ 4.9 ก) หลังจากนั้นอีก 2 วัน พบว่าผลึกไวรัสมีการขยายขนาดขึ้นและเพิ่มจำนวนขึ้นเล็กน้อยภายในนิวเคลียสของเซลล์ (ภาพที่ 4.9 ค) และที่ระยะ 7 วัน หลังจากได้รับเชื้อ จะพบว่าเซลล์แตกและมีการปลดปล่อยผลึกไวรัสสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 4.9 ง) แต่การตอบสนองของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของ *Ac*MNPV นั้นก็ไม่ดีนัก เนื่องจากพบเซลล์ที่เกิดการติดเชื้ออยู่ในปริมาณที่ไม่มากนัก ส่วนคุณสมบัติในการเป็นเซลล์อาศัยของ *Gm*MNPV นั้นพบว่าสามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยเริ่มพบเห็นผลึกไวรัสเกิดขึ้นในวันที่ 4 หลังจากได้รับเชื้อ (ภาพที่ 4.10) แต่หลังจากนั้นผลึกไวรัสก็ไม่ได้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น หรือมีเซลล์ข้างเคียงในบริเวณนั้นเกิดการติดเชื้ออีกเลย ดังนั้นการตอบสนองของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของ *Gm*MNPV จึงอยู่ในระดับที่ต่ำมาก เนื่องจากพบเซลล์เพียงไม่กี่เซลล์เท่านั้นที่เกิดการติดเชื้อ ส่วน *Se*MNPV นั้นพบว่าไม่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 และเซลล์ไลน์ดังกล่าวก็ไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ ตอบสนองต่อเชื้อไวรัสนี้เลย

สำหรับการศึกษาถึงคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL - HA - E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัส 5 ชนิด ได้แก่ *Es*CPV *Cf*CPV *Bm*CPV *Dp*CPV และ *Ha*CPV นั้น พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีการตอบสนองต่อเชื้อไวรัส *Es*CPV เท่านั้น โดยลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อจะพบผลึกของไวรัสเกิดขึ้นอยู่บริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ ต่างจากเซลล์ที่ไม่ได้รับเชื้อซึ่งจะไม่มีผลึกไวรัสอยู่ภายในเซลล์ และเซลล์ก็มีการเจริญเติบโตเป็นปกติ (ภาพที่ 4.11 ก) สำหรับเซลล์ที่มีการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้จะเริ่มมีผลึกไวรัสปรากฏให้เห็นในบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ในวันที่ 3 หลังจากได้รับเชื้อ (ภาพที่ 4.11 ข) หลังจากนั้นผลึกของไวรัสจะมีการเพิ่มจำนวนและขยายขนาดใหญ่ขึ้น และพบว่าไวรัส *Es*CPV นี้สร้างผลึกได้ 2 ลักษณะ คือ ผลึกที่มีลักษณะกลม และผลึกรูปเหลี่ยมที่มีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 4.11 ค) โดยเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อมักจะอยู่ในบริเวณใกล้ ๆ กัน และมีเซลล์ที่ติดเชื้ออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม หลังจากเกิดการติดเชื้อมักพบเซลล์ที่ติดเชื้อมีผลึกของไวรัสอยู่ภายในเซลล์บริเวณไซโตพลาสซึมจนแน่น (ภาพที่ 4.11 ง) ถ้าปล่อยทิ้งไว้มักจะไม่ค่อยพบว่าเซลล์แตกหรือมีการปล่อยผลึกไวรัสสู่อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สำหรับเชื้อไวรัส *Cf*CPV *Ha*CPV และ *Bm*CPV ไม่พบว่าสามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 แต่พบว่าเซลล์ไลน์ HA-831 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H สามารถเกิดการติดเชื้อ *Cf*CPV ได้ แต่จำนวนของเซลล์ที่ติดเชื้อนั้นพบในระดับที่ต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV จะพบผลึกไวรัส (OBs) อยู่ในนิวเคลียสของเซลล์

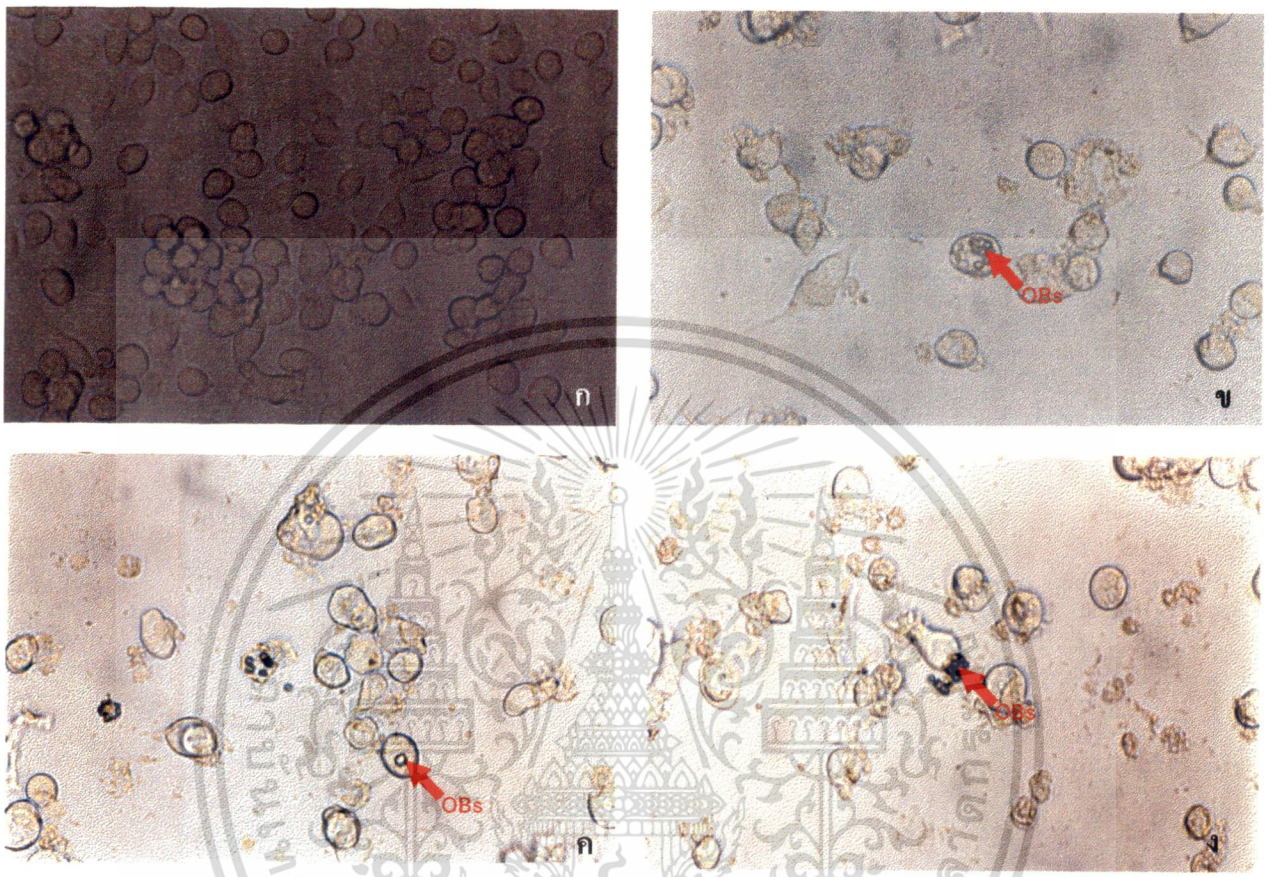
ก. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 1 เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV พาสเสจที่ 1 สายพันธุ์นครสวรรค์ ที่ระยะ 6 วันหลังจากได้รับเชื้อ (กำลังขยาย 200 เท่า)

ข. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 2 เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV พาสเสจที่ 1 สายพันธุ์นครสวรรค์ ที่ระยะ 6 วันหลังจากได้รับเชื้อ (กำลังขยาย 200 เท่า)

ค. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 17 เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV สายพันธุ์นครสวรรค์ ที่ระยะ 5 วันหลังจากได้รับเชื้อ (กำลังขยาย 400 เท่า)

ง. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจที่ 30 เกิดการติดเชื้อ *Ha*SNPV พาสเสจที่ 3 สายพันธุ์นครสวรรค์ ที่ระยะ 7 วันหลังจากได้รับเชื้อ (กำลังขยาย 400 เท่า)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะของเซลล์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Ac*MNPV

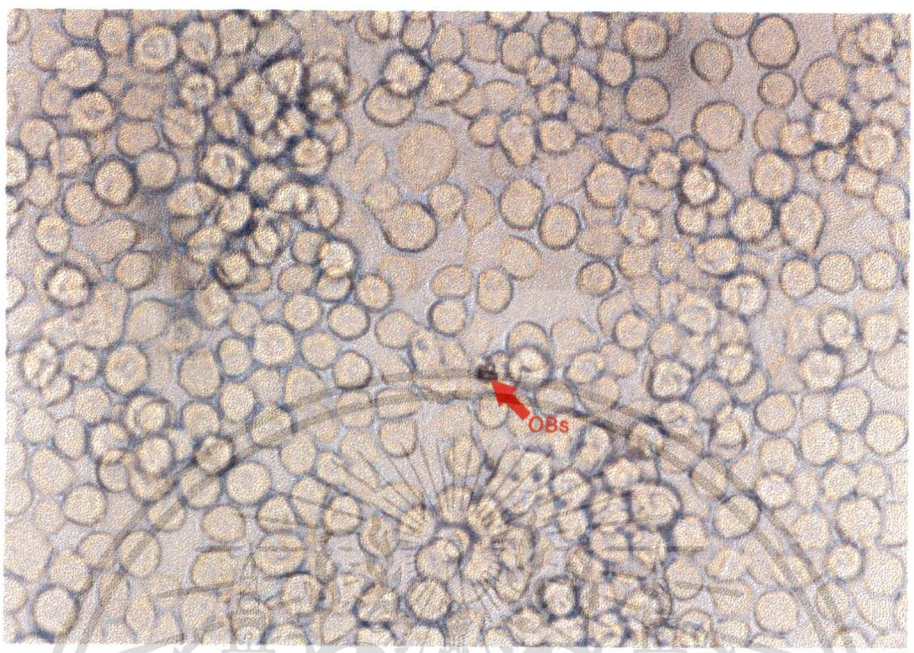
ก. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 อายุ 3 วัน ที่ไม่ได้รับเชื้อ

ข. ระยะ 3 วันหลังการติดเชื้อ จะพบผลึกไวรัส (OBs) ขนาดเล็กอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์

ค. ระยะ 5 วันหลังการติดเชื้อ ผลึกไวรัส (OBs) มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีการเพิ่มจำนวนในเซลล์

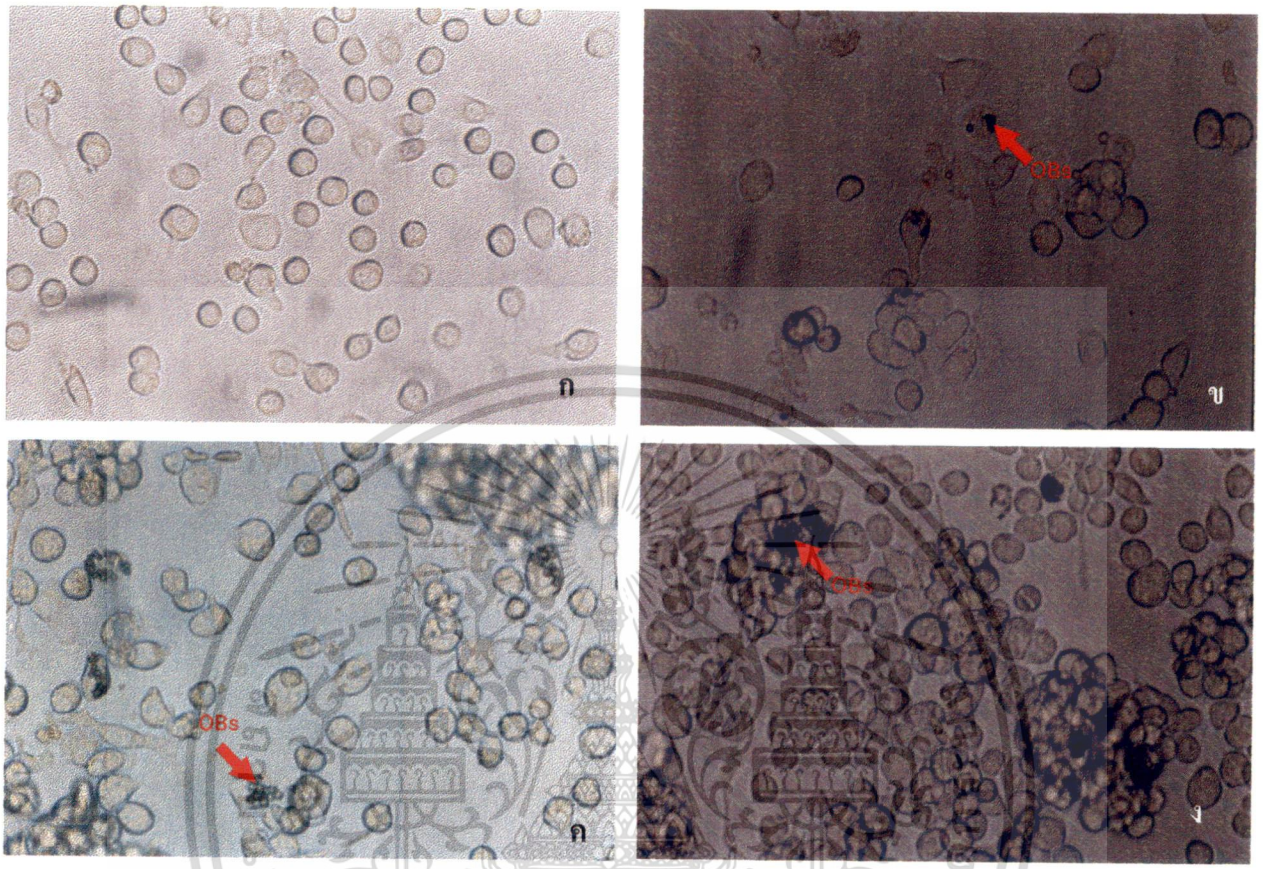
ง. ระยะ 7 วันหลังการติดเชื้อ มีการปลดปล่อยผลึกไวรัส (OBs) สู่อาหารเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 อายุ 4 วัน เกิดการติดเชื้อ *Gm*NPV ที่ระยะ 4 วันหลังจากได้รับเชื้อ จะพบผลึกไวรัส (OBs) อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 แสดงลักษณะของเซลล์ KMITL-HA-E1 ที่เกิดการติดเชื้อ *Es*CPV จะพบผลึกไวรัส (OBs) อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์

ก. เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 อายุ 3 วัน ที่ไม่ได้รับเชื้อ

ข. ระยะ 3 วันหลังการติดเชื้อ เริ่มพบผลึกไวรัส (OBs) อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์

ค. ระยะ 8 วันหลังการติดเชื้อ ผลึกไวรัส (OBs) ขนาดใหญ่ขึ้น พบทั้งผลึกที่มีรูปร่างกลมและผลึกที่มีรูปร่างเหลี่ยม

ง. ระยะ 10 วันหลังการติดเชื้อ พบว่าภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์จะมีผลึกไวรัส (OBs) อยู่เต็ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.*

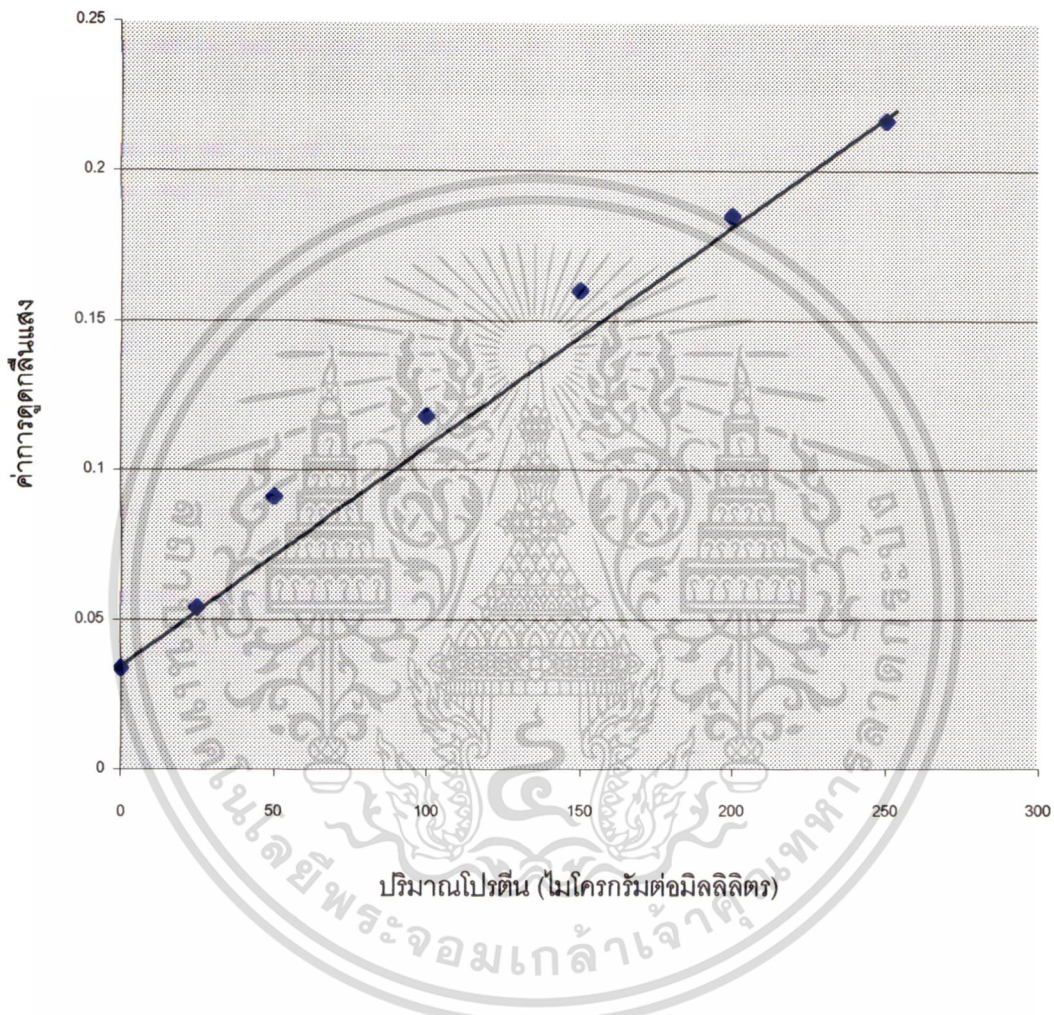
ในการทดสอบความเป็นพิษจากผลึกโปรตีนของแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผลิตเป็นสูตรทางการค้า โดยตรวจวัดปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงเปรียบเทียบกับระดับของสารละลายอัลบูมินความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมินระดับต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมิน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง
0	0.034
25	0.054
50	0.091
100	0.118
150	0.160
200	0.185
250	0.217

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถนำมาสร้างกราฟมาตรฐานได้ดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 แสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายอัลบูมินที่ระดับความเข้มข้น 0-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนสารพิษจากแบคทีเรียเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของสารละลายอัลบูมินที่ระดับต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียสูตรต่าง ๆ มีค่าการดูดกลืนแสงแตกต่างกัน เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียสูตรต่าง ๆ มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงของความเข้มข้นของอัลบูมินที่ระดับต่าง ๆ ทำให้ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนสารพิษของแบคทีเรียสูตรต่าง ๆ ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของโปรตีนของแบคทีเรีย *Bt.* สูตรต่าง ๆ

ชนิดของแบคทีเรีย	Thuricide®	Teknar®	Trident®	Blank
ค่าการดูดกลืนแสง	0.178	0.202	0.119	0.149
ปริมาณโปรตีน (μg/ml)	186.00	226.56	101.19	136.90

จากการทดสอบสารพิษของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ กันในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม แล้วสังเกตดู cytopathic effect ต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีการตอบสนองต่อ Thuricide® ตั้งแต่หลังจากได้รับสารพิษ 1 วัน โดยเซลล์เริ่มมีอาการผิดปกติ มีเม็ดกรานูลเล็ก ๆ อยู่ภายในเซลล์จำนวนมาก เมื่อได้รับสารพิษที่ระดับความเจือจาง 1/8 แต่ที่ระดับความเจือจางสูงกว่านี้เซลล์ยังไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่จะแสดงอาการเมื่อเซลล์ได้รับสารพิษผ่านไป 2 วัน ซึ่งพบว่าที่ระดับความเจือจางของสารพิษ 1/32 เริ่มมีเซลล์ที่แสดงอาการผิดปกติให้พบได้ และจะพบเซลล์ที่มีอาการผิดปกตินี้ได้มากขึ้นในวันถัดไป ส่วนวันที่ 3 หลังจากเซลล์ได้รับสารพิษ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ทดสอบกับสารพิษ Thuricide® ที่ระดับความเจือจางสูงกว่า 1/32 ก็ไม่ปรากฏอาการผิดปกติแต่อย่างใด สำหรับ Teknar® ก็ทำให้เซลล์แสดงอาการเมื่อได้รับสารพิษเช่นเดียวกับ Thuricide® หลังจากเซลล์ได้รับสารพิษ 1 วัน จะมีเม็ดกรานูลปรากฏอยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมากจนถึงระดับความเจือจางของสารพิษ 1/8 ส่วนวันที่ 2 หลังจากเซลล์ได้รับสารพิษ ที่ระดับความเจือจาง 1/16 เริ่มมีเซลล์ที่มีเม็ดกรานูลปรากฏขึ้น จนกระทั่งในวันที่ 3 หลังจากเซลล์ได้รับสารพิษ ที่ระดับความเจือจาง 1/32 ก็มีเซลล์ที่ปรากฏอาการผิดปกติดังกล่าวเกิดขึ้นเช่นกัน ส่วนสารพิษที่ได้จากแบคทีเรียสูตร Trident® และ Blank เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พบว่าเซลล์มีการตอบสนองต่อสารพิษในระดับต่ำ โดยวันที่ 3 หลังจากเซลล์ได้รับสารพิษ พบว่าระดับความเจือจางของสารพิษสูงสุดที่ทำให้เซลล์มีอาการผิดปกติคือระดับความเจือจาง 1/8 หลังจากนั้นในวันที่ 7 เมื่อลองตรวจดูการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ ไม่พบว่ามีสารพิษชนิดใดที่หลังจากวันที่ 3 ที่เซลล์ได้รับสารพิษแล้ว จะทำให้เซลล์ที่ได้รับสารพิษในระดับความเจือจางที่สูงขึ้นมีอาการผิดปกติเกิดขึ้นแต่อย่างใด (ภาพที่ 4.13) เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar®, Trident® และ Blank จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.987, 13.060, 26.753 และ 15.258 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

สำหรับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H พบว่าหลังจากที่เซลล์ได้รับสารพิษจากแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ 3 วัน เซลล์จะมีอาการบวมพอง มีเม็ดกรานูลขนาดเล็กอยู่ภายในจำนวนมาก บางครั้งเซลล์จะมีขนาดใหญ่และมีผนังเซลล์บางมาก โดยพบว่าเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ตอบสนองต่อระดับความเจือจางสูงสุดของสารพิษชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Thuricide®, Teknar®, Trident® และ Blank ที่ระดับความเจือจาง 1/64, 1/32, 1/8 และ 1/8 ตามลำดับ และไม่พบว่าหลังจากวันที่ 3 เมื่อเซลล์ได้รับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเจือจาง 1/64, 1/32, 1/8 และ 1/8 ตามลำดับ และไม่พบว่าหลังจากวันที่ 3 เมื่อเซลล์ได้รับสารพิษแล้วจะมีการตอบสนองต่อสารพิษที่ระดับความเจือจางสูงขึ้น เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ ของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ที่ตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar®, Trident® และ Blank จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.453, 5.491, 26.034 และ 16.639 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ส่วนเซลล์ไลน์ Sf9 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์อีกชนิดหนึ่งที่นำมาใช้เปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* ชนิดต่าง ๆ พบว่าเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารพิษและมีการตอบสนองต่อสารพิษของแบคทีเรียนั้นจะมีลักษณะอาการเหมือนกับในเซลล์ไลน์ 2 ชนิดข้างต้น คือ มีเม็ดกรานูลเล็ก ๆ อยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก บางครั้งเซลล์จะมีผนังบางหรือมีแวคคิวโอลขนาดใหญ่เกิดขึ้นในเซลล์ จากการทดลองพบว่าระดับความเจือจางสูงสุดที่ทำให้เซลล์ไลน์ Sf9 ตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ ในวันที่ 3 หลังจากได้รับสารพิษ Thuricide®, Teknar®, Trident® และ Blank คือ 1/64, 1/32, 1/8 และ 1/8 ตามลำดับ เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ ของเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar®, Trident® และ Blank จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.453, 5.652, 25.315 และ 16.639 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ภาพที่ 4.13 เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่แสดงอาการผิดปกติเนื่องจากได้รับสารพิษจาก *Bt.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษจากผลึกโปรตีนของเชื้อแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผลิตเป็นสูตรทางการค้า โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ชนิดอื่น ได้แก่ เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design ; RCBD) ของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด กับสารพิษที่ได้จากแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่า มี treatment บาง treatment ที่มีค่า $TCTD_{50}$ ต่างจาก treatment อื่น ๆ หลังจากแยก Sum of Square ของ treatment ออกเป็น 3 ส่วน คือ ชนิดของเซลล์ไลน์ ชนิดของสารพิษ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (interaction) ระหว่างชนิดของเซลล์ไลน์กับชนิดของสารพิษ พบว่า ทั้ง 3 ส่วนมีอิทธิพลทำให้ค่า $TCTD_{50}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.3) แสดงให้เห็นว่าค่า $TCTD_{50}$ จะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ไลน์และชนิดของสารพิษที่นำมาทำการทดสอบ

ตารางที่ 4.3 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในการทดลองแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ

SOV	df	SS	MS	F
Block	2	4.738	2.369	1.877
Treatment	11	3058.647	278.059	220.332**
A (cell line)	2	38.120	19.06	15.103**
B (toxin)	3	2934.842	978.281	775.183**
A × B	6	85.685	14.281	11.316**
Error	22	27.771	2.262	
Total	35	3091.156		

Coefficient of variation (C.V.) = 0.717 %

** แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสารพิษแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละสายพันธุ์

ชนิดของสารพิษจาก *Bt.*	$TCTD_{50}$ (μg/ml)		
	KMITL-HA-E1	AFKM-ON-H	Sf9
Thuricide®	2.987 ก	1.453 ก	1.454 ก
Teknar-HPD®	13.060 ข	5.491 ข	5.652 ข
Trident®	26.753 ง	26.034 ง	25.315 ง
Blank	15.258 ค	16.639 ค	16.639 ค

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ $TCTD_{50}$ แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละชนิด ที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ จะพบว่า เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะมีความสามารถในการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละชนิดได้ดีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide® ได้ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Teknar-HPD® ได้ดีรองลงมาที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 13.060 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และจะตอบสนองต่อสารพิษ Blank และ Trident® ได้ลดน้อยลงตามลำดับ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 15.258 และ 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบสารพิษแบคทีเรีย *Bt.* แต่ละสายพันธุ์ ที่มีผลต่อความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด

ชนิดของเซลล์ไลน์	$TCTD_{50}$ (µg/ml)			
	Thuricide®	Teknar-HPD®	Trident®	Blank
KMITL-HA-E1	2.987 ข	13.060 ข	26.753 ก	15.258 ก
AFKM-ON-H	1.453 ก	5.491 ก	26.034 ก	16.639 ก
Sf9	1.454 ก	5.652 ก	25.315 ก	16.639 ก

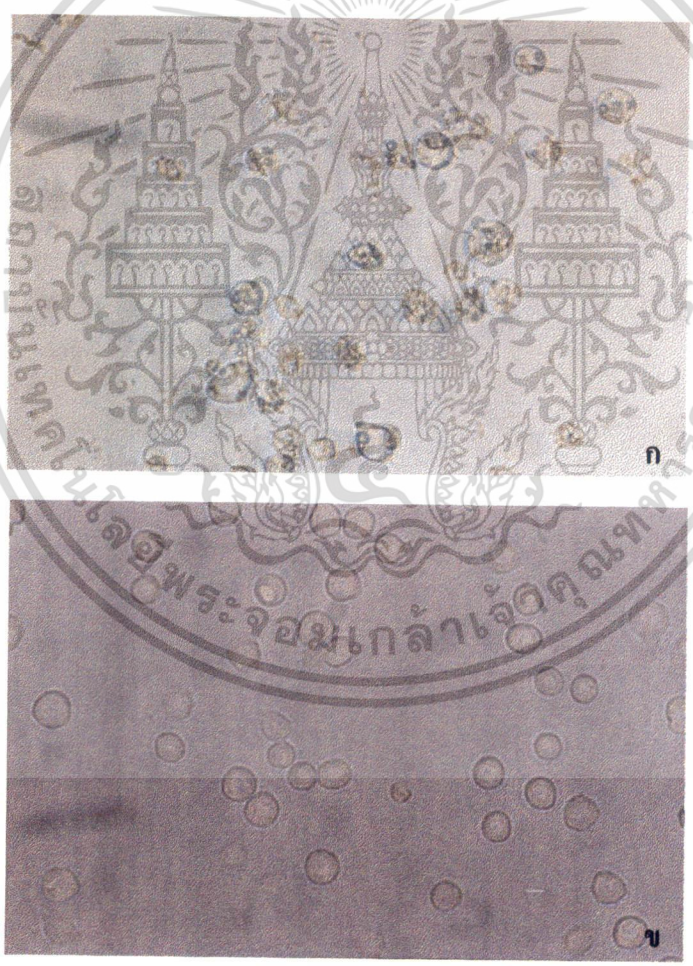
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

จากตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ $TCTD_{50}$ แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* ชนิดต่าง ๆ พบว่า Thuricide® จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และ Sf9 ได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 1.453 และ 1.454 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สำหรับ Teknar-HPD® จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และ Sf9 ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 5.491 และ 5.652 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 13.060 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วน Trident® และ Blank จะมีผลต่อเซลล์ไลน์แต่ละชนิดในระดับที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย Trident® จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1, เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 26.753, 26.034 และ 25.315 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Blank จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1, เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 15.258, 16.639 และ 16.639 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*

จากการทดสอบความเป็นพิษของเชื้อรา *M. anisopliae* หลังจากที่ได้รับสารพิษแล้ว 3 วัน พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราจะมีลักษณะอาการคล้ายกัน คือ เซลล์บางส่วนจะตายซึ่งพบเห็นว่ามีเซลล์แตกกระจายอยู่ ส่วนเซลล์ที่ผิดปกติจะมีเม็ดกรานูลจำนวนมากอยู่ภายในเซลล์ บางครั้งมีจำนวนมากจนทำให้เซลล์โป่งพองจนมีขนาดใหญ่และมีผนังเซลล์บางมาก ทำให้เซลล์แตกออกได้โดยง่าย ส่วนเซลล์ที่ไม่ได้รับสารพิษจากเชื้อราแต่ได้รับอะซิโตนที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ นั้น เซลล์จะไม่มีอาการผิดปกติแต่ประการใด (ภาพที่ 4.14)



ภาพที่ 4.14 แสดงเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่มีอาการผิดปกติเมื่อได้รับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* (ก) เปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ที่ได้รับอะซิโตน (ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบสารพิษของเชื้อราที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ในภาชนะเพาะเลี้ยงแบบ 96 หลุม พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 หลังจากได้รับสารพิษแล้ว 3 วัน จะพบเซลล์ที่แสดงการตอบสนองต่อสารพิษจนถึงระดับความเจือจางสูงสุด 1/512 ซึ่งที่ระดับความเจือจางดังกล่าวจะไม่พบเซลล์ที่แสดงอาการผิดปกติในทุกหลุม เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ ของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษจากเชื้อราจะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 จะพบเซลล์แสดงการตอบสนองต่อสารพิษที่ระดับความเจือจางสูงสุด 1/32000 ในวันที่ 3 หลังจากได้รับสารพิษ และมีค่า $TCTD_{50}$ เฉลี่ยเท่ากับ 0.0049 และ 0.0046 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการทดลองดังกล่าวทำให้ทราบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ได้น้อยกว่าเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความทนทานต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ได้มากกว่าเซลล์ไลน์ชนิดอื่น

จากการทดสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษ destruxins รูปแบบผงจากเชื้อรา *M. anisopliae* โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด กับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* พบว่ามี treatment หรือเซลล์ไลน์บางชนิดมีค่า $TCTD_{50}$ ที่ตอบสนองต่อสารพิษนี้แตกต่างจากเซลล์ไลน์อื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิดกับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	2	0.15934	0.79670	316.26**
Block	2	0.00053	0.00026	1.05
Error	4	0.00100	0.00025	
Total	8	0.16087		

Coefficient of variation (C.V.) = 16.06 %

** แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หากพิจารณาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ Duncan's multiple Range Test (DMRT) ของสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ จะพบว่าสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ได้ดีที่สุด ในระดับที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0046 และ 0.0049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะตอบสนองต่อสารพิษนี้ได้น้อยกว่าเซลล์ไลน์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยมีค่า $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ ของสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด

ชนิดของเซลล์ไลน์	$TCTD_{50}$ (µg/ml)
KMITL-HA-1	0.2870 ข
AFKM-ON-H	0.0049 ก
Sf9	0.0046 ก

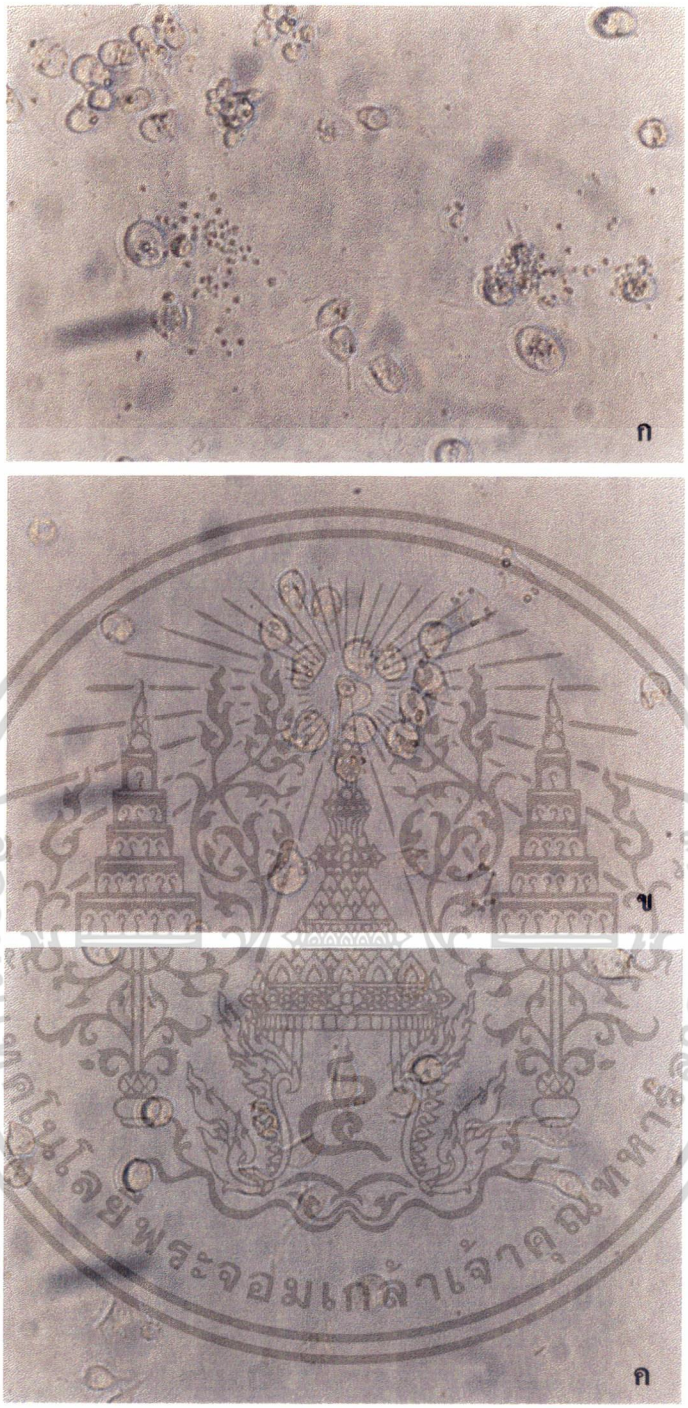
ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าความลวามแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ต่อการตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี

จากการทดลองเกี่ยวกับการตอบสนองต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดีของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 จากการสังเกต cytopathic effect ของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่ระดับความเจือจางของสารแอคติโนมัยซิน-ดีระดับต่าง ๆ หลังจากเซลล์ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีผ่านไป 1 วัน พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีที่ระดับความเจือจาง 1/4 เซลล์แตกและตายเกือบทั้งหมด ส่วนที่ระดับความเจือจาง 1/16 ซึ่งเป็นระดับสูงสุดที่เซลล์มีการตอบสนองต่อสารชนิดนี้ พบว่าเซลล์บางส่วนมีเม็ดกรานูลเล็ก ๆ อยู่ภายใน พบเซลล์แตกกระจายอยู่บ้าง และเซลล์ไม่ค่อยมีการแบ่งตัวเพิ่มปริมาณทำให้ความหนาแน่นของเซลล์อยู่ในระดับที่ต่ำแตกต่างกับการทดลองเปรียบเทียบอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.15) เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0131 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 หลังจากเซลล์ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีผ่านไป 7 วัน พบว่าที่ระดับความเจือจาง 1/64 เป็นระดับความเจือจางสูงสุดที่ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อสารชนิดนี้ โดยพบว่าระดับความหนาแน่นของเซลล์มีความแตกต่างกับการทดลองเปรียบเทียบอย่างเห็นได้ชัด และพบเซลล์ที่มีเม็ดกรานูลเล็ก ๆ อยู่ภายในจำนวนมากปรากฏอยู่ด้วย เมื่อนำมาหาค่า $TCTD_{50}$ จะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.0035 และ 0.0033 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการตอบสนองต่อแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ทุกระดับความเจือจาง พบว่าไม่มีผลต่อเซลล์ไลน์ทุกชนิด เนื่องจากเซลล์จะมีลักษณะและการเจริญเหมือนกันกับการทดลองเปรียบเทียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 ลักษณะของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ผ่านไปเป็นระยะเวลา 1 วัน

ก. ที่ระดับความเจือจางของสารแอคติโนมัยซิน-ดี เท่ากับ 1/4

ข. ที่ระดับความเจือจางของสารแอคติโนมัยซิน-ดี เท่ากับ 1/16

ค. ที่ระดับความเจือจางของแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1/2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบการตอบสนองต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดีของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ดังที่กล่าวข้างต้น เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ทั้ง 3 ชนิด กับสารแอคติโนมัยซิน-ดี พบว่ามี treatment หรือเซลล์ไลน์บางชนิดมีระดับ $TCTD_{50}$ ที่ตอบสนองต่อสารชนิดนี้แตกต่างจากเซลล์ไลน์อื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 วิเคราะค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิดกับสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี

SOV	df	SS	MS	F
Treatment	2	0.00019021	0.0000951	2219.52**
Block	2	0.00000009	0.00000004	1
Error	4	0.00000017	0.00000004	
Total	8	0.16087		

Coefficient of variation (C.V.) = 3.12 %

** แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

หากทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบ DMRT ของระดับ $TCTD_{50}$ ของสารแอคติโนมัยซิน-ดีที่มีผลต่อการตอบสนองต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ จะพบว่าเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H สามารถตอบสนองต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดีได้ดีไม่แตกต่างกันที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0033 และ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะตอบสนองต่อสารปฏิชีวนะชนิดนี้แตกต่างกับเซลล์ไลน์อื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0131 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ ของสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดีต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด

ชนิดของเซลล์ไลน์	$TCTD_{50}$ (µg/ml)
KMITL-HA-E1	0.0131 ข
AFKM-ON-H	0.0035 ก
Sf9	0.0033 ก

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่าความความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หากต้องการตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดใหม่ KMITL-HA-E1 ต่อสารพิษจากแบคทีเรีย เชื้อรา และสารแอคติโนมัยซิน-ดี โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ก็สามารถนำมาทำการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบ่บสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ได้ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนในการทดลองแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ของเซลล์ไลน์ 3 ชนิด กับสารทดสอบ

SOV	df	SS	MS	F
Block	2	3.245	1.623	1.855
Treatment	17	5089.541	299.385	347.718**
A (cell line)	2	27.161	13.581	15.774**
B (toxin)	5	4957.640	991.528	1151.600**
A × B	10	104.74	10.474	12.165**
Error	34	29.266	0.861	
Total	53	5122.052		

Coefficient of variation (C.V.) = 0.59 %

** แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

จากการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์เกี่ยวกับอิทธิพลของสารพิษชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารพิษจากเชื้อแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ สารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* และสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี ที่ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนอง พบว่ามี treatment บางชนิดที่มีค่า $TCTD_{50}$ ต่างจาก treatment อื่น ๆ หลังจากแยก Sum of Square ของ treatment ออกเป็น 3 ส่วน คือ ชนิดของเซลล์ไลน์ ชนิดของสารพิษ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย (interaction) ระหว่างชนิดของเซลล์ไลน์กับชนิดของสารพิษ พบว่าทั้ง 3 ส่วนมีผลทำให้ค่า $TCTD_{50}$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (ตารางที่ 4.10) แสดงให้เห็นว่าค่า $TCTD_{50}$ จะมีค่ามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ไลน์และชนิดของสารพิษที่นำมาทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่ตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ

ชนิดของสารพิษจาก *Bt.*	$TCTD_{50}$ (μg/ml)		
	KMITL-HA-E1	AFKM-ON-H	Sf9
Thuricide®	2.987 ข	1.453 ข	1.454 ข
Teknar-HPD®	13.060 ค	5.491 ค	5.652 ค
Trident®	26.753 จ	26.034 จ	25.315 จ
Blank	15.258 ง	16.639 ง	16.639 ง
Fungi toxin	0.287 ก	0.0049 ก	0.0046 ก
Actinomycin-D	0.013 ก	0.0035 ก	0.0033 ก

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

จากตารางที่ 4.11 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ $TCTD_{50}$ แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของสารพิษแต่ละชนิดที่มีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ จะพบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความสามารถในการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราและสารแอคติโนมัยซิน-ดีได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.287 และ 0.013 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar-HPD®, Blank และ Trident® ได้ดีรองลงมาตามลำดับ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987, 13.060, 15.258 และ 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H มีความสามารถในการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราและสารแอคติโนมัยซิน-ดี ได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0049 และ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar-HPD®, Blank และ Trident® ได้ดีรองลงมาตามลำดับ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 1.453, 5.491, 16.639 และ 26.034 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สำหรับเซลล์ไลน์ Sf9 มีความสามารถในการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราและสารแอคติโนมัยซิน-ดี ได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0046 และ 0.0033 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide®, Teknar-HPD®, Blank และ Trident® ได้ดีรองลงมาตามลำดับ ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 1.454, 5.652, 16.639 และ 25.315 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยจะมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าเฉลี่ย $TCTD_{50}$ เปรียบเทียบสารพิษชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อความสามารถในการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิด

ชนิดของเซลล์ไลน์	$TCTD_{50}$ (µg/ml)					
	Thuricide®	Teknar-HPD®	Trident®	Blank	Fungi toxin	Actinomycin-D
KMITL-HA-E1	2.987 ข	13.060 ข	26.753 ก	15.258 ก	0.287 ข	0.013 ข
AFKM-ON-H	1.453 ก	5.491 ก	26.034 ก	16.639 ก	0.0049 ก	0.0035 ก
Sf9	1.454 ก	5.652 ก	25.315 ก	16.639 ก	0.0046 ก	0.0033 ก

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .01

จากตารางที่ 4.12 เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของ $TCTD_{50}$ แบบ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ของเซลล์ไลน์แต่ละชนิดที่นำมาทดสอบการตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ พบว่าสารพิษ Thuricide® จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และ Sf9 ได้ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 1.453 และ 1.454 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะสามารถตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวได้น้อยที่สุดที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AZFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 สำหรับ Teknar-HPD® จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และ Sf9 ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 5.491 และ 5.652 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะสามารถตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวได้น้อยที่สุดที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 13.060 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ส่วน Trident® และ Blank จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์แต่ละชนิดในระดับที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดย Trident® จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1, เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 26.753, 26.034 และ 25.315 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และ Blank จะมีผลต่อเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1, เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 15.258, 16.639 และ 16.639 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* จะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ได้ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0049 และ 0.0046 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะสามารถตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวได้น้อยที่สุดที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ส่วนสารแอคติโนมัยซิน-ดีจะมีผลต่อการตอบสนองของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ได้ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

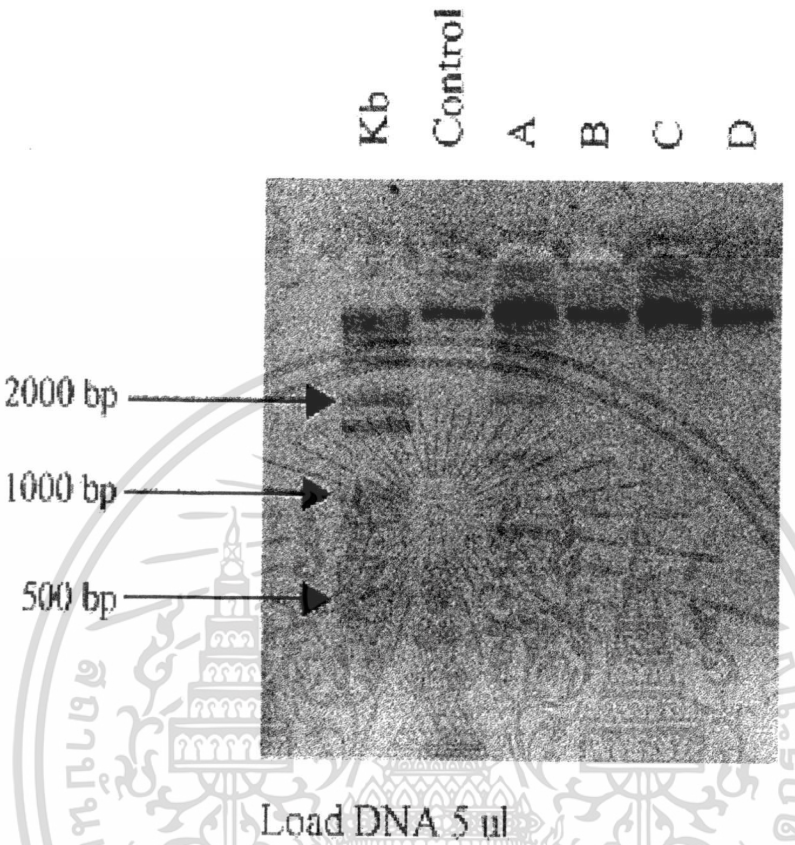
0.0035 และ 0.0033 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะสามารถตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวได้น้อยที่สุดที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.013 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 การตรวจดูการแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซินดีและสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*

จากการนำเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วยสารแอคติโนมัยซิน-ดี ที่ระดับความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 วัน ไปทำการสกัดดีเอ็นเอ และทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ใน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel พบว่าแถบของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นชั้น ๆ ซึ่งจะแตกต่างกับลักษณะแถบของดีเอ็นเอที่สกัดจากเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสารดังกล่าวโดยแถบของดีเอ็นเอปรากฏเป็นแถบเพียงแถบเดียว แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอของเซลล์ปกติไม่มีการแตกหัก แต่การแตกหักของดีเอ็นเอของเซลล์เกิดจากการได้รับสารปฏิชีวนะแอคติโนมัยซิน-ดี ทำให้เห็นลักษณะแถบของดีเอ็นเอเป็นชั้น ๆ เนื่องจากชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดการแตกหักจะมีน้ำหนักโมเลกุลที่ไม่เท่ากัน สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ 3 ชนิด คือ เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารพิษ destruxins จากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ระดับความเจือจาง 1/10 ส่วนเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ได้รับสารพิษ destruxins จากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ระดับความเจือจาง 1/10000 เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีส ใน 1 เปอร์เซ็นต์ agarose gel พบว่าแถบของดีเอ็นเอปรากฏเป็นแถบเพียงแถบเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารพิษจากเชื้อราไม่มีผลทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์ที่นำมาทดสอบเกิดการแตกหัก (ภาพที่ 4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.16 แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบกับสารแอคติโนมัยซิน-ดีและสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae*

A คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ทดสอบกับสารแอคติโนมัยซิน-ดี ที่ระดับความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร

B คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ทดสอบกับสารพิษจากเชื้อรา ที่ระดับความเจือจาง 1/10

C คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H ที่ทดสอบกับสารพิษจากเชื้อรา ที่ระดับความเจือจาง 1/10000

D คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ทดสอบกับสารพิษจากเชื้อรา ที่ระดับความเจือจาง 1/10000

Control คือ ลักษณะแถบดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ที่สร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อตัวอ่อนที่อยู่ภายในไข่ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน ได้ตั้งชื่อว่า KMITL-HA-E1 พบว่าในช่วงแรกกลุ่มเซลล์เริ่มแรก (explant) จะมีรูปร่างแตกต่างกันไปหลายรูปแบบ ได้แก่ รูปร่างแบบกระสวย (fibroblast-like cells), รูปร่างกลม (epithelial-like cells), รูปร่างแบบ myoblast-like cells และเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มีแวคคิวโอลคล้าย companion cells แต่หลังจากที่ทำการถ่ายเซลล์ผ่านไป 2 ครั้ง พบว่ามีเฉพาะเซลล์ที่มีรูปร่างแบบกระสวยและเซลล์ที่มีรูปร่างกลมเท่านั้นที่เหลืออยู่และสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณต่อไปได้จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

จากการศึกษาการเจริญของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พาสเสจ (passage) ที่ 49, 60 และ 79 พบว่าช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็น 2 เท่า จะอยู่ที่ 55.43, 60.92 และ 40.82 ชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยทั่วไปจะลดลงหลังจากถ่ายเซลล์แล้ว 96 ชั่วโมง มีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 1.08×10^6, 1.06×10^6 และ 2.47×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ผ่านการถ่ายเซลล์มาหลายครั้งจะมีการเจริญของเซลล์ดีขึ้นจนมีความหนาแน่นของเซลล์อยู่ในปริมาณที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ HA-831 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่สร้างได้จากหนอนเจาะสมอฝ้ายเช่นเดียวกัน พบว่ามีช่วงเวลาที่ทำให้เซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าอยู่ที่ 53.39 ชั่วโมง และมีความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 1.44×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากค่าดังกล่าวเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันกับรายงานของ Shih *et al.* (1997) ซึ่งกล่าวว่า ช่วงเวลาที่ทำให้ประชากรของเซลล์เพิ่มเป็นสองเท่าของเซลล์ไลน์ IBL-SLO1A จาก *Spodoptera litula* อยู่ที่ 21.9 ชั่วโมง, เซลล์ไลน์ IPLB-21 และ IPLB-1254 จาก *S. frugiperda* อยู่ที่ 23 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ, เซลล์ไลน์ UCR-SE-1 จาก *S. exigua* อยู่ที่ 56 ชั่วโมง แสดงให้เห็นได้ว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่สร้างขึ้นนี้มีการเจริญของเซลล์ได้ดีปานกลางเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ชนิดอื่น

สำหรับการนับจำนวนโครโมโซมของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 พบว่ามีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 48-228 โครโมโซม ซึ่งพบว่า 51 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างมีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 122-151 โครโมโซม และ 31.33 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนโครโมโซมอยู่ระหว่าง 48-69 โครโมโซม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sudeep *et al.* (2002) กล่าวว่า เซลล์ไลน์จาก *H. armigera* มีจำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วง 45 ถึง 185 โครโมโซม และพบว่าบางเซลล์มีจำนวนโครโมโซมได้มากกว่า 300 โครโมโซม สำหรับเซลล์ไลน์ที่ได้จากเนื้อเยื่อของหนอนผีเสื้อพบโครโมโซมโพลีพลอยด์ (polyploid) จำนวนมากถือว่าเป็นสิ่งปกติ (Shih *et al.* 1997) นอกจากนี้ Lee and Hou (1992) รายงานว่าใน *Plutella xylostella* มีจำนวนโครโมโซม 21-180 โครโมโซม ในขณะที่ *Bombyx mori* พบจำนวนโครโมโซม 31-270 โครโมโซม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการวิเคราะห์ไอโซไซม์จากการย้อมสีในสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ esterase, malate dehydrogenase และ glucase-6-phosphate dehydrogenase จะพบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะมีรูปแบบไอโซไซม์คล้ายกับรูปแบบไอโซไซม์ของตัวหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันวัยที่ 3 และเซลล์ไลน์ HA-831 แต่จะมีรูปแบบไอโซไซม์ที่แตกต่างกับรูปแบบไอโซไซม์ของเซลล์ไลน์ SE-1 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H สำหรับแถบไอโซไซม์ที่ปรากฏบนเจลที่พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของแถบไอโซไซม์ไม่เท่ากันนั้น Conklin and smith (1971) อธิบายว่า ปริมาณความเข้มข้นของแถบไอโซไซม์ที่ไม่เท่ากันนั้น อาจเนื่องมาจากมีการแสดงออกของยีนหรืออัลลีลที่แตกต่างกัน แถบไอโซไซม์ที่มีความเข้มมากแสดงว่ามีปริมาณของกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าแถบไอโซไซม์ที่มีความเข้มน้อย นอกจากนี้สารบางชนิดที่เป็นส่วนประกอบที่อยู่ในสารสกัดอาจมีผลต่อจำนวนแถบไอโซไซม์บนแผ่นเจล โดยสารเหล่านี้อาจรบกวนแถบไอโซไซม์ทำให้เห็นแถบไอโซไซม์เป็นแถบเดียวหรือเป็นปื้น (Anderson. 1968 ; Simpson and Withers. 1986)

จากการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ในการเป็นเซลล์อาศัยของไวรัสโรคแมลง พบว่าในกลุ่มของบาคูโลไวรัสนั้น *Ac*MNPV, *Gm*MNPV และ *Ha*SNPV เท่านั้น ที่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์ชนิดใหม่นี้ โดย *Ac*MNPV จะมีความสามารถในการจำลองตัวในเซลล์ไลน์ชนิดนี้ได้ดีกว่า *Gm*MNPV แต่ก็ไม่สามารถทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเกิดการติดเชื้อได้มากเท่าที่ควร ซึ่งสังเกตจากปริมาณของเซลล์ที่มีผลึกไวรัสอยู่ภายในนิวเคลียสจะพบว่ามีเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อในปริมาณที่ไม่มากนัก ส่วนการตอบสนองของเซลล์ไลน์ต่อเชื้อ *Ha*SNPV นั้น ในระยะแรกเซลล์จะมีการติดเชื้อได้พอสมควร แต่เมื่อทำการถ่ายเซลล์ผ่านไปหลาย ๆ ครั้งกลับพบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีการตอบสนองต่อเชื้อไวรัสชนิดดังกล่าวได้ลดลง โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อลดลงเรื่อย ๆ ในเซลล์พาสเสจต่อ ๆ มา จนในที่สุดเชื้อไวรัส *Ha*SNPV ก็ไม่สามารถจำลองตัวได้ในเซลล์ไลน์นี้ สำหรับไวรัสในกลุ่มของไซโตพลาสมิคโพลีฮีโดรซีสไวรัสนั้น พบว่ามีเฉพาะ *Es*CPV เท่านั้นที่สามารถจำลองตัวสร้างผลึกไวรัสได้ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 โดยผลึกไวรัสจะเริ่มปรากฏให้เห็นในวันที่ 3 หลังจากที่เซลล์เกิดการติดเชื้อ

สำหรับการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจาก *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ผลิตเป็นสูตรทางการค้า พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 สามารถตอบสนองต่อสารพิษ Thuricide® (var. *kurstaki*) ได้ดีที่สุด ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือสารพิษ Tekner-HPD®, Blank และ Trident® ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 13.060, 15.258 และ 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aranda *et al.* (1996) และ Chilcott and Wigley (1993) ที่กล่าวไว้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bt.* (var. *kurstaki*) มีโปรตีน CryI ซึ่งมีความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับเลพิดอพเทอรา เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* ชนิดต่าง ๆ ระหว่างเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 กับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ไลน์ Sf9 พบว่า เซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความทนทานต่อสารพิษ Thuricide® และ Tekner-HPD® มากกว่าเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนสารพิษ Trident® และ Blank นั้น พบว่าเซลล์ไลน์ทั้งสามชนิดสามารถตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวได้ในระดับที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความทนทานต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* สูงกว่าเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ คือที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.287 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เซลล์ไลน์ที่นำมาใช้ทดลองเปรียบเทียบด้วยสองชนิดดังกล่าวจะมีการตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0046 และ 0.0049 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

การทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ต่อการตอบสนองต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดี โดยเปรียบเทียบกับเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H พบว่าเซลล์ไลน์ Sf9 และเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H สามารถตอบสนองต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดีได้โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0033 และ 0.0035 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 จะมีความทนทานต่อสารแอคติโนมัยซิน-ดีมากกว่าเซลล์ไลน์ทั้งสองชนิดข้างต้นอย่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งมีระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.0131 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หากพิจารณาการตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารพิษจากแบคทีเรีย *Bt.* สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ทำเป็นสูตรทางการค้าที่นำมาใช้ทดสอบ สารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* และสารแอคติโนมัยซิน-ดี พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 สามารถตอบสนองต่อสารพิษจากเชื้อราและสารแอคติโนมัยซิน-ดีได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 0.287 และ 0.013 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือสารพิษ Thuricide®, Tekner-HPD®, Blank และ Trident® ที่ระดับ $TCTD_{50}$ เท่ากับ 2.987, 13.060, 15.258 และ 26.753 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยจะมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบการตอบสนองต่อสารพิษชนิดต่าง ๆ ระหว่างเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 กับเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 พบว่าเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 มีความทนทานต่อสารพิษ Thuricide®, Tekner-HPD®, สารพิษจากเชื้อรา และสารแอคติโนมัยซิน-ดี ได้มากกว่าเซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ แต่เซลล์ไลน์ทั้งสามชนิดจะมีการตอบสนองต่อสาร Trident® และ Blank ได้ใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารแอคติโนมัยซิน-ดีที่ระดับความเข้มข้น 250 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารแอคติโนมัยซิน-ดีมีผลทำให้เกิดการแตก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หักของดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ได้ แต่จากการตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเซลล์ไลน์ KMITL-HA-E1 ที่ได้รับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ระดับความเจือจาง 1/10 เซลล์ไลน์ AFKM-ON-H และเซลล์ไลน์ Sf9 ที่ได้รับสารพิษจากเชื้อรา *M. anisopliae* ที่ระดับความเจือจาง 1/1000 พบว่าสารพิษจากเชื้อราไม่มีผลทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์ไลน์ทุกชนิดที่นำมาทดสอบเกิดการแตกหัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2534. "เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี." กรุงเทพฯ : กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา. เอกสารอัดสำเนา.

เกศรา จีระจรรยา. 2530. "พืชอาหารที่พบใหม่ของหนอนเจาะสมอฝ้าย." **วารสารกีฏและสัตววิทยา.** 9(4) : 226-228.

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543. "การปรับปรุงพันธุ์เห็ดฟางโดยการผสมพันธุ์." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุ์ศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2539. **โรควิทยาของแมลง.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539. "การศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเห็ดนางฟ้าภูฐานและเห็ดนางรมสีเทา." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มลิวัลย์ ปันยารชุน. 2534. "การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา." หน้า 167-177. ใน **เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536. **คู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ.** นนทบุรี : สาธารณสุขอาเซี่ยน.

วิวัฒน์ เสือสะอาด. 2539. **แมลงศัตรูธัญพืชและพืชไร่และศัตรูธรรมชาติ.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน.

สว่าง วังบุญคง. 2536. **เอกสารวิชาการเรื่องฝ้าย.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2542. "รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดหนอนเจาะสมอฝ้ายด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์." กรุงเทพฯ : สำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. เอกสารอัดสำเนา.

สุดาวรรณ เชยชมศรี และคณะ. 2542. "เซลล์ไลน์ชนิดใหม่ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน." หน้า 51-60. ใน **การประชุมวิชาการ เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ครั้งที่ 15.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2543. "การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง." หน้า 1-30. ใน **เอกสารประกอบการฝึกอบรมการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงและการประยุกต์ใช้.** นครปฐม : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สุธรรม อารีกุล และคณะ. 2509. **แมลงศัตรูข้าวโพดของประเทศไทย.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัจฉรา ตันติโชดก. 2534. "แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับแมลง." หน้า 151-164. ใน **เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2534. **เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** กรุงเทพฯ : ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

อุทัย เกตุนุติ. 2538. "การผลิตและการนำไวรัสนิวเคลียร์โพลีฮีโดรซีสไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช." หน้า 203-208. ใน **เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2539. "การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส." หน้า 128-162. ใน **เอกสารวิชาการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน.** กรุงเทพฯ : กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Adams, J.R. and McClintock, J.T. 1991. "Baculoviridae. Nuclear Polyhedrosis Viruses. Part 1. Nuclear Polyhedrosis Viruses of Insects." 87-204. In Adams, J.R. and Bonami, J.R. **Atlas of Invertebrate Viruses.** London : CRC Press. Inc.

Amstrong, J.L. *et al.* 1985. "Delta Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." **J. Bacteriol.** 161 : 39-46.

Anagnou-Veroniki, M. *et al.* 1997. "A Nonoccluded Reovirus of the Olive Fly, *Dacus oleae*." **J. Gen. Virol.** 78 : 259-263.

Anderson, J.W. 1968. "Extraction of Enzymes and Subcellular Organelles from Plant Tissue." **Phytochem.** 7 : 1793.

Aranda, E. *et al.* 1996. "Interactions of *Bacillus thuringiensis* Crystal Proteins with the Mid Gut Epitherial Cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae)." **J. Invertebr. Pathol.** 68 : 203-212.

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.

Arnold, J.W. and Sohi, S.S. 1974. "Hemocytes of *Malacosoma disstria* Hubner (Lepidoptera : Lasiocampidae) : Morphology of the Cells in Fresh Blood and after Cultivation *In vitro*." **Can. J. Zool.** 52 : 481-486.

Aronson, A.I. *et al.* 1986. "*Bacillus thuringiensis* and related Insect Pathogens." **Microbiol. Rev.** 50 : 1-24.

Baines, D. *et al.* 1994. "Establishment of Primary and Continuous Culture of Epithelial Cells from Larval Lepidopteran Midguts." **J. Insect Physiol.** 40(4) : 347-357.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bal, A.K. and Ste-Marie, M. 1969. "Mitosis, Macromolecule Synthesis and Ultrastructure of *Allium cepa* L. Root Meristem Cells Treated with Actinomycin-D." **J. Cell. Biol.** 43 : 10A.

Baxter, C.S. and Byyoel, P. 1975. "Intercalating Agens as Probes of the Spatial Relationship between Chromatin Components." **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 63 : 286-291.

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. *et al.* 1997. "Development of four cell lines from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)." 3-10. In Maramorosch, K. and Mitsuhashi, J. **Invertebrate Cell Culture : Novel Directions and Biotechnology Application.** Enfield : Science Publishers.

Belloncik, S. and Mori, H. 1998. "Cypovirus." 337-369. In Miller, L.K. and Andrew Ball,L. **The Insect Viruses.** New York. : Plenum Press.

Blankemeyer, J.T. 1981. "Active Transport of Potassium by Insect Midgut." **Fed. Proc.** 40 : 2412-2416.

Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1998. **Principles of Insect Pathology.** New York : Kluwer Academic Publishers.

Bradford, M.M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dry Binding." **Anal. Biochem.** 72 : 248-254.

Brock, T.D. and Madigan, M.T. 1988. **Biology of Microorganisms.** 5th ed. New Jersey : Englewood Cliffs.

Burgess, S. 1977. "Molecular Weights of Lepidopteran Baculovirus DNAs : Derivation by Electron Microscopy." **J. Gen Virol.** 37 : 501-510.

Cameron, R. *et al.* 1989. "Insect Cell Culture Technology in Baculovirus Expression System." **TIBTECH.** 7 : 66-70.

Cerenius, L. *et al.* 1990. "The Effect of the Fungal Toxin Destruxin E on Isolated Crayfish Haemocytes." **J. Insect. Physiol.** 36 : 785-789.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chao, J. and Ball, G.H. 1971. "A Cell Line Isolated from Hemocytes of *Samia 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.

Charpentier, G. *et al.* 2002. "Characterization of Cell Lines Developed from the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera : Charysomelidae)." ***In vitro* Cell. Dev. Biol.-Animal.** 38 : 73-78.

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 Transcrips and Splicing of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus IE-1 Gene." **J. Virol.** 62 : 3193-3200.

Clem, R.J. and Miller, L.K. 1994. "Control of Programmed Cell Death by the Baculovirus Genes p35 and IAP." **Mol. Cell. Biol.** 14 : 5212-5222.

Cochran, M.A. *et al.* 1986. "Organization and expression of the Baculovirus genome." 108-216. In Granados, R.R. and Federici, B.A. **The Biology of Baculovirus.** Florida : Boca Raton, CRD Press.

Conklin, M.E. and Smith, H.H. 1971. "Peroxidase Isozymes : A Measure of Molecular Variation in Ten Herbaceous Species of *Datura*." **Amer. J. Bot.** 58 : 688-696.

Croft, B.A. 1990. **Arthropod Biological Control Agents and Pesticides.** New York : John Wiley and Sons.

Crook, N.E. *et al.* 1993. "An Apoptosis Inhibiting Baculovirus Gene with a Zinc Finger Like Motif." **J. Virol.** 67 : 2168-2174.

Cunningham, J.C. and Longworth, J.F. 1968. "The Identification of Some Cytoplasmic Polyhedrosis Viruses." **J. Invertebr. Pathol.** 11 : 196-202.

DeBach, P. and Rosen, D. 1991. **Biological Control by Natural Enemies.** 2nd ed. London : Cambridge University Press.

Doida, Y. and Okada, S. 1972. "Effects of Actinomycin-D and Puromycin on the Cell Progress from M to G_1 and S Stages in Cultured Mouse Leukemia L517 by Cells." **Cell Tissue Kinet.** 5 : 15-26.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dumas, C. *et al.* 1996. "Effect of Destruxins, Cyclic Depsipeptide Mycotoxins, on Calcium Balance and Phosphorylation on Intracellular Proteins in Lepidopteran Cell Lines." **Comp. Biochem. Physiol.** 114C : 213-219.

Dwyer, K.G. *et al.* 1988. "Establishment of Cell Lines from *Pieris rapae* Embryos : Characterization and Susceptibility to Baculoviruses." **J. Invertebr. Pathol.** 52 : 268.

Eastman, A. *et al.* 1994. "The involvement of the cell cycle in apoptosis." 369-378. In Valerie, W. **The Cell Cycle Regulators, Targets and Clinical Applications.** New York : Hu Plenum Press.

Epstein, S.S. *et al.* 1972. "Deletion of Chemical Mutagens by the Dominant Lethal Assay in the Mouse." **Toxical. Appl. Pharmacol.** 23 : 288-325.

Faust, R.M. 1974. "Bacterial disease." 87-183. In Cantwell, G.E. **Insect Disease.** New York : Marcel Dekker, Inc.

Fossiez, F. *et al.* 1989. "Nucleotide Sequence of the Polyhedrin Gene of *Euxoa scandens* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (*Es*CPV)." **Virology.** 169 : 462-467.

Foley, G.E. 1956. "Preliminary Observation on Mechanism of Action of Actinomycin-D on Microbiologic Systems." **Antibiotics Annual.** 432-436.

Fraser, M.J. 1986. "Ultrastructure Observations of Virion Maturation in *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Infected *Spodoptera frugiperda* Cell Culture." **J. Ultrastruc. Mol. Struct. Res.** 95 : 189-195.

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.

Gardiner, G.R. and Stockdale, H. 1975. "Two Tissue Culture Media for Production of Lepidopteran Cells and Nuclear Polyhedrosis Viruses." **J. Invertebr. Pathol.** 25 : 263-270.

Gelernter, W.D. and Federici, B.A. 1986. "Continuous Cell Line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) That Supports Replication of Nuclear Polyhedrosis Viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*." **J. Invertebr. Pathol.** 48 : 199-207.

Gibson, D.M. *et al.* 1995. "Increased Efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in Combination with Tannic Acid." **J. Econ. Entomol.** 88(2) : 270-277.

Gill, S.S. and Hornung, J.M. 1987. "Cytolytic Activity of *Bacillus thuringiensis* Proteins to Insect and Mammalian Cell Lines." **J. Invert. Pathol.** 50 : 16-25.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Goldberg, I.H. 1965. "Mode of Action of Antibiotics. II. Drugs Affecting Nucleic Acid and Protein Synthesis. **Am. J. Med.** 39 : 722-752.

Goldberg, L.J. and Margalit, J. 1977. "A Bacterial Spore Demonstrating Rapid Larvicidial Activity against *Anpheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*." **Mosq. News.** 37 : 355-358.

Goodman, C.L. and McIntosh, A.H. 1994. "Production of Baculoviruses for Insect Control using Cell Culture." 33-56. In Maramorosch, K. and McIntosh, A.H. **Insect Cell Biotechnology.** Florida : Boca Raton.

Goodwin, R.H. 1975. "Insect Cell Culture : Improve Media and Methods for Initiating Attached Cell Lines from the Lepidoptera." ***In vitro.*** 11 : 396.

Grace, T.D.C. 1962. "Establishment of Four Strains of Cells from Insect Tissues Grown *In vitro*." **Nature.** 195 : 788-789.

Granados, R. and William, K. 1986. "*In vitro* Infection and Replication of Baculoviruses." 89-108. In Granados, R.R. and Federici, B.A. **The Biology of Baculovirus.** Florida : Boca Raton, CRD Press.

Granados, R.R. and McKenna, K.A. 1995. "Insect Cell Culture Methods and Their Use in Virus Research." 13-40. In Shuler, M.L., Wood, H.A., Granados, R.R. and Hammer, D.A. **Baculovirus Exprssion Systems and Biopesticides.** New York : Wiley-Liss, Inc.

Guidice, G. and Novelli, G.D. 1963. "Effect of Actinomycin-D on Synthesis of DNA Polymerase in Hepatectomized Rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 12 : 383-387.

Hanel, H. 1982. "The Life Cycle of the Insect Pathogenic Fungus *Metarrhizium anisopliae* in the Termite, *Nesutitermes exitiosus*." **Mycopathologia.** 80 : 137-145.

Hara, K. *et al.* 1995. "A Cloned Cell Line of *Spodoptera exigua* has a Hightly Increased Susceptibility to the *Spodoptera exigua* Nuclear Polyhedrosis Virus." **Can. J. Microbiol.** 41 : 1111-1116.

Harrap, K. 1972a. "The Structure of Nuclear Polyhedrosis Virus II the Virus Particle." **Virology.** 50 : 124-135.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Harris, H.D. and Hopkinson, A. 1977. **Handbook of Enzyme Electrophoresis in Human Genetics.** Amsterdam : North Holland Publishing.

Helmsing, P.J. 1970. "Protein Synthesis of Polytene Nuclei *In vitro*." **Biochem. Biophys. Acta.** 244 : 579-587.

Hink, W.F. 1970. "Established Cell Line from the Cabbage Looper, *Trichoplusia ni*." **Nature.** 226 : 466-467.

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.

Hofte, H. and Whiteley, H.R. 1989. "Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*." **Microbiol. Rev.** 53 : 242-255.

Hsu, T.C. *et al.* 1975. "Induction of Chromosome Cross Binding by Treating Cells with Chemical Agents before Fixation." **Exptl. Cell Res.** 79 : 484-487.

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 Adams, J.R. and Bonami, J.R. **Atlas of Invertebrate Viruses.** Florida : Boca Raton, CRD Press.

Hunter-Fujita, F.R. *et al.* 1998. **Isect Viruses and Pest Management.** New York : John Wiley and Sons.

Inlow, D. *et al.* 1989. "Insect Cell Culture and Baculovirus Propagation in Protein-Free Medium." **J. Tissue-culture Meth.** 12 : 13-16.

Inoue, H. and Mitsuhashi, J. 1985. "Further 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.* 1989. "The Pathway of Infection of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus Importance for the 64K Envelope Glycoprotein." **J. Gen. Virol.** 66 : 1195-2000.

Kelly, D. 1981. "Baculovirus Replication : Electron Microscope of the Sequence of Infection of *Trichoplusia ni* Nuclear Polyhedrosis Virus in *Spodoptera frugiperda* Cells." **J. Gen. Virol.** 52 : 209-219.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kerr, J.F.R. *et al.* 1972. "Apoptosis : A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." **Br. J. Cancer.** 26 : 239.

Kirk, J.M. 1960. "Moce of Action of Actinomycin-D." **Biophys, Acta.** 42 : 167-169.

Knowles, B.H. *et al.* 1992. "A Broad-Spectrum Cytolytic Toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kyushuensis*." **Proc. R. Soc. Lond. B.** 248 : 1-7.

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 Events 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.

Lacey, C.M. *et al.* 1988. "Route of Invasion and Histopathology of *Metarrhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*." **J. Invertebr. Pathol.** 52 : 108-118.

Lee, S.H. and Hou, R.F. 1992. "Establishment of Cell Line Derived from Embryos of the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.)." **J. Invertebr. Pathol.** 59 :174-177.

Lereclus, D. *et al.* 1993. "Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes." 37-69. In Entwistle, P.F. *et al.* ***Bacillus thuringiensis*, An Environmental Biopesticide.** Chichester : John Wiley and Son, Ltd.

Levinson, B.L. *et al.* 1990. "Identification of β-exotoxin, and a New Exotoxin in *Bacillus thuringiensis spo0A* Mutant." **Bio. Tech.** 13 : 67-70.

Lewandoski, L.J. and Traynor, B.L. 1972. "Comparison of the Structure and Polypeptide Composition of Three Double-Stranded Ribonucleic Acid Containing Viruses (Diplona Viruses) : Cytoplasmic Polyhedrosis Virus , Wound Tumor Virus and Reovirus." **J. Virol.** 10 : 1053-1057.

Lucassen, E. 1993. "Characterisation of cell lines." 75. In Open university and University of Greenwich. ***In Vitro* Cultivation of Animal Cells.** London : Butterworth-Heinemann Ltd.

Lynn, D.E. *et al.* 1982. "Establishment of Cell Line from Lepidopteran Wing Discs : Induction of Newly Synthesized Protein by Hydroxyecdysone." **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 79 : 2589-2592.

Lynn, D.E. and Oberlander, H. 1983. "The Establishment of Cell Lines from Imaginal Wing Discs of *Spodoptera frugiperda* and *Plodia interpunctella*. **J. Insect Physiol.** 29 : 591-596.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lynn, D.E. and Shapiro, M. 1998. "New Cell Lines from *Heliothis virescens* : Characterization and Susceptibility to Baculoviruses." **J. Invertebr. Pathol.** 72 : 276-280.

Mabbett, T.H. 1983. "The Economic Insect Pests of Cotton in Thailand IV. The American bollworm *Heliothis armigera* (Hubner) Thai." **J. Agri. Sci.** 16(3) : 233-252.

McCoy, C.W. *et al.* 1988. "Entomogenous fungi." 156-236. In Ignoffo C. **CRC Microbial Insecticide.** Florida : CRC press.

McKenna, K.A. *et al.* 1998. "Establishment of New *Trichoplusia ni* Cell Line in Serum-Free Medium For Baculovirus and Recombinant Protein Production." **J. Invertebr. Pathol.** 71 : 82-90.

Melander, A.L. 1914. "Can Insects Become Resistant to Sprays?" **J. Econ. Entomol.** 7 : 167-173.

Miles, C.P. 1970. "Labeling and Other Effects of Actinomycin-D on Human Ccromosomes." **Proc. Nat. Acad. Set. (US).** 65 : 585-592.

Miltenburger, H.G. *et al.* 1984. "The Cellular Substrate : A Very Important Requirement For Baculovirus *In vitro* Replication." **Z. Naturforsch.** 39 : 993-998.

Mitsuhashi, J. 1966. "Tissue Culture of the Rice Stem Borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera : Pyralidae) II. Morphology and *In vitro* Cultivation of Hemocytes." **Appl. Entomol. Zool.** 1 : 5-10.

Mitsuhashi, J. 1981. "Establishment and Some Characteristics of a Continuous Cell Line Derived from Fat Bodies of the Cabbage armyworm (Lepidoptera : Noctuidae)." **Dev. Growth Differ.** 23 : 63-67.

Mitsuhashi, J. 1982. "Continuous Cultures of Insect Cell Lines in Media Free of Sera." **App. Entomol. Zool.** 17 : 575-581.

Mitsuhashi, J. 1983. "A Continuous Cell Line Derived from Fat Bodies of the Common armyworm, *Leucania separata* (Lepidoptera : Noctuidae)." **App. Entomol. Zool.** 18 : 533-539.

Mitsuhashi, J. 1994. "Insect Cell Culture Media." 2-7. In Maramorosch, K. and McIntosh, A.H. **Anthropod Cell Culture Systems.** Florida : CRC Press, Inc., Boca Raton.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mori, H. *et al.* 1989. "Nucleotide Sequence of the Polyhedrin Gene of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus A Strain with Nuclear Localization of Polyhedra." **J. Gen. Virol.** 70 : 1885-1890.

Mori, H. *et al.* 1993. "Expression of *Bombyx mori* Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Polyhedrin in Insect Cell by Using a Baculovirus Expression Vector, and Its Assembly into Polyhedra." **J. Gen. Virol.** 74 : 99-103.

Murphy, F.A. *et al.* 1995. "Virus Taxonomy : Six Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses." **Arch. Virol. Suppl.** 10.

Neilson, M.M. 1964. "A Cytoplasmic Polyhedrosis Virus Pathogenic 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. Invertebr. Pathol.** 7 :306-309.

O'Reilly, D.R. *et al.* 1992. **Baculovirus Expression Vector, A Laburatory Manual.** New York : W.H.Freeman and Company.

Ostertag, W. and Kersten, W. 1965. "The Mechanism of Proflavin and Actinomycin-D in Causing Chromatid Breakage in Human Cells." **Expt I. Cell Res.** 39 : 296-301.

Pasteur, N. *et al.* 1988. **Practical Isozyme Genetics.** London : English Edition Ellis Horwood Limited Publishers Chichester.

Patrick, M.S. *et al.* 1995. "Swainsonine Production in Fed-Batch Fermentation of *Metarrhizium anisopliae*." **Biotechnol. Letters.** 17 : 433-438.

Payne, C.C. and Kalmakoff, J. 1974. "Biochemical Properties of Polyhedra and Virus Particles of the Cytoplasmic Polyhedrosis Virus of *Bombyx mori*." **Intervirology.** 4 : 354-358.

Raghow, R. and Grace, T. 1974. "Studies on a Nuclear Polyhedrosis Virus in *Bombyx mori* Cells *in vitro*." **J. Ultrastruc. Res.** 47 : 384-399.

Rickenson, A.B. 1970. "The Effect of Low Concentrations of Actinomycin-D on the Progress of Cells through the Cell Cycle." **Cell Tissue Kinet.** 3 : 335-347.

Robert, D.W. 1970. Infection process of fungi, 14th Intern. Congr. Entomol. Abstract (Pathology) Kyoto, Japan 3-9 August 1970.

Samuels, L.D. 1964. "Actinomycin and its effects." **New Engl. J. Med.** 271 : 1252-1258 and 1301-1308.

Sato, T. 1989. "Establishment of Eight Cell Lines From Neonate Larvae of Tortricids (Lepidoptera) and Their Several Characteristics including Susceptibility to Insect Viruses."

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

187-198. In Mitsuhashi, J. **Invertebrate Cell System Applications.** Vol.2. Florida : CRC Press, Boca Raton.

Schabel, H.G. 1976. "Oral Infection of Hylobius Pales by *Metarrhizium anisopliae*." **J. Invertebr. Pathol.** 27 : 377-383.

Shafer, D.A. and Worton, R.G. 1973. "Actinomycin-D Bonding of Chromosome in Culture." **Can. J. Genet. Cytol.** 15 : 663.

Shih, C.J. *et al.* 1997. "Establishment of a Cell Line from *Spodoptera litura* (Lepidoptera : Noctuidae) and Replication of *S. litura* Nuclear Polyhedrosis Virus *In vitro*." **J. Invertebr. Pathol.** 69 : 1-6.

Sim, K.L. and Perry, D. 1997. "Analysis of Swainsonine and Its Early Metabolic Precursors in Culture of *Metarrhizium anisopliae*." **Glycoconj J.** 14 : 661-668.

Simpson, M.J.A. and Withers, L.A. 1986. Characterization of Plant Genetic Resources using Isozyme Electrophoresis : A Guide to The Literature. Rome : IBPGR.

Smith, K.M. and Rivers, C.F. 1956. "Some Viruses Affecting Insects of Economic Importance." **Parasitology.** 46 : 235-242.

Somers, C.E. and Hsu, T.C. 1962. Chromosome Damage Induced by Hydroxylamine in Mammalian Cell." **Proc. Natl. Acad. Sci.** 48 : 937-943.

Sosa-Gomez, D.R. *et al.* 1997. "Attachment of *Metarrhizium anisopliae* to the Southern Green Stink Bug *Nezara viridula* Cuticle and Fungistatic Effect of Cuticular Lipids And Aldehydes." **J. Invertebr. Pathol.** 69 : 31-39.

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.

St.Leger, R.J. *et al.* 1987. "Distribution of Chymoelastases and Trypsin-like Enzymes in Five Species of Entomopathogenic Deuteromycetes." **Arch. Biochem. Biophy.** 258 : 123-131.

St.Leger, R.J. *et al.* 1989. "Synthesis of Proteins Including a Cuticle-Degrading Protease During Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Metarrhizium anisopliae*." **Exp. Mycol.** 13 : 253-262.

St.Leger, R.J. *et al.* 1992. "Analysis of Aminopeptidase and Dipeptidylpeptidase IV from the Entomopathogenic Fungus *Metarrhizium anisopliae*." **J. Gen. Microbiol.** 139 : 237-243.

St.Leger, R.J. 1995. "The Role of Cuticle-Degrading Protease in Fungal Pathogenesis of Insect." **Can. J. Bot.** 73 : 1119-1125.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

St.Leger, R.J. 1998. "Ambient pH is a Major Determinant in the Expression of Cuticle-Degrading Enzymes and Hydrophobin by *Metarrhizium anisopliae*." **Appl. Environ. Microbial.** 64 : 709-713.

Stoltz, D. *et al.* 1973. "Nuclear Polyhedrosis Virus : A Possible Example of *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. Dev. Biol.-Animal.** 38 : 262-264.

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.

Tanada, Y. and Kaya, H.K. 1993. **Insect Pathology.** San Diego : Academic Press.

Thomas, W.E. and Ellar, D.J. 1983. "*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Crystal δ-Endotoxin : Effects on Insect and Mammalian Cells *In vitro* And *In vivo*. **J. Cell Sci.** 60 : 181-197.

Tojo, A. and Aizawa, K. 1983. "Dissolution And Degradation of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxin but Gut Juice Protease of the Silkworm, *Bombyx mori*." **Appl. Envir. Microbiol.** 45 : 576-580.

Tweeten, K.A. *et al.* 1980. "Characterization of an Extreamly Basic Protein Derived from Granulosis Virus Nucleocapsids." **J. Virol.** 33 : 866-876.

Undeen, A.H. and Berl, D. 1979. "Laboratory Studies on the Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac Against *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) Larvae." **Mosq. News.** 39 : 743-745.

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 Systems.** 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. and Goldsmith, P.A. 1985. "Mechanism of Neutralization of Budded *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus by A Monoclonal Antibody : Inhibition of Entry by Adsorptive Endocytosis." **Virology.** 143 : 185-195.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Waksman, S. and Woodruff, H.B. 1940. "Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces." **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.** 45 : 609-614.

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.

Weiss, S.A. *et al.* 1981. "Improved Method for the Production of Insect Cell Culture in Large Volume." ***In vitro.*** 17 : 495-502.

Wilson, M.E. and Consigli, P.A. 1986. "Function of a Protein Kinease Activity Associated with Purified Capsids of the Granulosis Virus Infecting *Pludia 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.

Wyatt, S.S. 1956. "Culture *In vitro* of Tissue from the Silkworm, *Bombyx mori*." **J. Gen. Physiol.** 39 : 841-852.

Wyllie, A.H. 1980. "Cell Death : The Significance of Apoptosis." **Int. Rev. Cytol.** 68 : 251-306.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford (1976)

วิธีการเตรียม Bradford dye (5X)

ละลายสี comassien Blue G-250 100 มิลลิกรัมในเอทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วเติมด้วย phosphoric acid (85%) 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 200 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บน้ำสีที่ได้ใส่ในขวดแก้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำการเจือจางสี Bradford dye ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน สี : น้ำ เท่ากับ 1 : 4 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

2. นำสีที่ได้จากข้อ 1 ใส่ลงในหลอดทดลองที่สะอาด หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร

3. เติมสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้อที่ 2 ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที

4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

5. ทำกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย bovine serum albumin ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 2-4 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ bovine serum albumin

2. การทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบโพลีอะคลิลาไมด์เจล (Polyacrylamide - gel electrophoresis)

2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เป็นส่วนของ supernatent ที่ได้จากการบดเซลล์ไลน์ชนิดต่าง ๆ และตัวหนอนระยะที่ 3 ของหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกันใน lysis buffer โดยผสมสารละลายตัวอย่างกับสารละลาย sample buffer (0.06M Tris-HCl ที่ pH6.8, กลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์, Bromphenol blue 0.025 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วนสารละลายตัวอย่างต่อสารละลาย sample buffer เท่ากับ 2 ต่อ 1 ก่อนใส่ในช่องใส่ตัวอย่างบนเจล (วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุดมวรภัณฑ์. 2536)

2.2 การเตรียมโพลีอะคลิลาไมด์เจลแบบ vertical slab gel

ขนิษฐา พรเจริญโรจน์. 2543 กล่าวถึงการเตรียมโพลีอะคลิลาไมด์เจลแบบ vertical slab gel ดังนี้

2.2.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับทำแผ่นเจล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ประกอบชุดแผ่นแก้วเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่น ๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาของเจลในช่วง 0.75-1.0 มิลลิเมตร จากนั้นคำนวณปริมาตรของเจลที่จะใช้โดยใส่ stacking gel ให้มีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร หรือเหนือ separating gel

2.2.3 เตรียมสารละลาย separating gel ดังนี้คือ เติมสารละลาย 30% T, 2.7% C acrylamide 2.5 มิลลิลิตร (อะคริลาไมด์ 2.92 กรัม และบีสอะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านแผ่นกรองสารขนาด 0.45 ไมโครเมตร) น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 4.85 มิลลิลิตร และ separating gel buffer 2.5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2.4 เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 70 ไมโครลิตร และเททระเมทิลีนไดอามีน (tetramethylenediamine ; TEMED) ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศ

2.2.5 เทสารละลายของเจลลงบนช่องว่างระหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ ให้เหลือระยะห่างจากขอบบน 2-3 เซนติเมตร จากนั้นเติมสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลคลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นเป็นรอยต่อระหว่างเจลกับสารละลายที่คลุมผิวหน้า เทสารละลายน้ำที่อิ่มตัวด้วยบิวทานอลทิ้ง

2.2.6 เตรียมสารละลายของ stacking gel โดยเติมสาร 30% T, 2.7% C acrylamide-bis 2.6 มิลลิลิตร (อะคริลาไมด์ 2.92 กรัม และบีสอะคริลาไมด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร) น้ำกลั่นที่ผ่านการกลั่นสองครั้ง 12.2 มิลลิลิตร และ stacking gel buffer 5 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร

2.2.7 เติมแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ที่เตรียมใหม่) 100 ไมโครลิตร และ TEMED 12.2 ไมโครลิตร ผสมให้สารละลายทั้งหมดเข้ากันระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ จากนั้นเทสารละลายของ stacking gel บน separating gel แล้วใส่หวี (template comb) ลงใน stacking gel ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที แล้วจึงถอดหวีออก

2.3 การใส่สารตัวอย่าง

นำชุดทำอิเล็กโทรโฟรีซีสที่เตรียมเสร็จแล้วมาเติมสารละลาย Electrode buffer (0.025M Tris-base ; pH8.3, 0.192M glycine) จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 2.1 มาหยอดลงบนเจลแต่ละช่อง ช่องละหนึ่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ระวังอย่าให้ตัวอย่างฟุ้งกระจาย

2.4 การผ่านกระแสไฟฟ้า

นำไปผ่านกระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ลงมาจนระดับของสีของ sample buffer ที่ผสมในสารละลายตัวอย่างอยู่ในระดับพอดีกับขอบล่างซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงหยุดปล่อยกระแสไฟฟ้า แล้วนำเจลออกจากชุดอิเล็กโทรโฟรีซีสไปทำการย้อมสีด้วยสารละลายสับสเตรทของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ esterase, malate dehydrogrnase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การย้อมสีด้วยสารละลายซับสเตรทของเอนไซม์

3.1 Esterase (EST)

สับสเตรทที่ใช้ในการย้อมเจลประกอบด้วย Fast blue RR salt 0.15 กรัม ละลายใน 0.1M Phosphate buffer pH6.0 แล้วเติมด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ α-napthyl acetate ใน absolute alcohol 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยเตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง จากนั้นนำเจลที่ได้ลงย้อมในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 30 นาที (สังเกตความเข้มของแถบให้ชัดเจนพอดี) นำเจลมาล้างน้ำกลั่นให้สีออกจนหมด แล้วเก็บคงสภาพไว้ในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (ประเสริฐ วุฒิคัมภีร์. 2539)

3.2 Malate dehydrogenase (MDH)

สับสเตรทที่ใช้ในการย้อมเซลล์ประกอบด้วย 2M malic acid pH7.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร, NAD (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 2 มิลลิลิตร เติมลงใน 0.2M Tris-HCl buffer pH8.0 ก่อนย้อมเจลเติมด้วย Phenazine methosulphate (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.5 มิลลิลิตร Nitro blue tetrazolium (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.1 มิลลิลิตร และ Tetrazolium MTT (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำเจลที่ได้ลงย้อมในที่มืดจนปรากฏแถบสีน้ำเงินบนเจล นำเจลมาล้างน้ำกลั่นให้สีออกจนหมด แล้วเก็บคงสภาพไว้ในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Pasteur *et al.* 1988)

3.3 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

สับสเตรทที่ใช้ในการย้อมเจลประกอบด้วย nicotinamide adenine diphosphate (NADP) (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.2 มิลลิลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมล ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, Glucose-6-phosphate 10 มิลลิกรัม เติมลงใน 0.2M Tris-HCl buffer pH8.0 ก่อนย้อมเจลเติมด้วย Phenazine methosulphate (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.3 มิลลิลิตร Nitro blue tetrazolium (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.1 มิลลิลิตร และ Tetrazolium MTT (ละลายในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์) 0.1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำเจลที่ได้ลงย้อมในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จนปรากฏแถบสีน้ำเงินบนเจล นำเจลมาล้างน้ำกลั่นให้สีออกจนหมด แล้วเก็บคงสภาพไว้ในกรดอะซิติกเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (Pasteur *et al.* 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)

สารละลาย PBS ได้จากการเตรียมสารละลายต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- สารละลาย ก. ประกอบด้วย

โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride ; NaCl)	80	กรัม
โพแตสเซียมคลอไรด์ (potassium chloride ; KCl)	2.0	กรัม
โซเดียมฟอสเฟต, ไดเบสิก (sodium phosphate ; Na_2HPO_4)	11.5	กรัม
โพแตสเซียมฟอสเฟต, โมโนเบสิก (potassium phosphate ; KH_2PO_4)	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นำสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร

- สารละลาย ข. ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride ; $CaCl_2$)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ทำการละลายแคลเซียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

- สารละลาย ค. ประกอบด้วย

แมกนีเซียมคลอไรด์ (Megnesium chloride ; $MgCl_2.6H_2O$)	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ทำการละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยทำให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

เมื่อเตรียมสารละลายทั้ง 3 ชนิด เรียบร้อยแล้ว จะนำสารละลายทั้งหมดไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงนำมาเตรียมสารลาย 10× PBS เข้มข้น ได้ดังนี้

สารละลาย ก.	400	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	4,500	มิลลิลิตร
สารละลาย ค.	50	มิลลิลิตร

จากนั้นทำการผสมสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากัน แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ไปผสมกับสารละลาย ข. ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ก็จะได้สารละลาย 10× PBS เข้มข้น ตามต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. วิธีการตรึงเซลล์ (fix cell) เพื่อนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

สำหรับเซลล์ไลน์ตัวอย่างที่จะนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนนั้นมีวิธีการการตรึงเซลล์ดังต่อไปนี้

ทำการขูดเซลล์ไลน์ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย
rubber policeman แล้วนำไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที
↓
นำส่วนตะกอนของเซลล์ไปทำการตรึงเซลล์ในสารละลายกลูทารอลดีไฮด์
ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 1× PBS เป็นเวลา 2 ชั่งโมง
↓
นำไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย
ซูโครส ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 1× PBS โดยทำการล้าง 3 ครั้ง
↓
นำไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที จากนั้นนำส่วนตะกอนของเซลล์มาเติม
ด้วยสารละลายซูโครสความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ใน 1× PBS
แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์ไลน์นี้จะนำตัวอย่างของเซลล์ที่ต้องการจะทำการสกัดดีเอ็นเอไปใช้บริการการสกัดจากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอ เทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

นำตัวอย่างของเซลล์ไลน์มาทำการบดให้ละเอียด จากนั้นนำตัวอย่าง
ที่บดละเอียดประมาณ 100 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
↓
เติม extraction buffer II 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง
↓
เติม 500 ไมโครลิตรของ Trapping buffer ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าหลอดเบา ๆ
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000g นาน 3-5 วินาที
↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เติม Washing buffer I 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000g นาน 3-5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำ 2 ครั้ง)

↓

เติม Washing buffer II 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ
14,000g นาน 3-5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
จนกว่าของเหลวจะระเหยออกจากตะกอนจนหมด

↓

เติม Elution buffer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ
65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (เพื่อให้ดีเอ็นเอละลายออกมา)
นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000g นาน 3-5 วินาที

↓

นำเอาส่วนใสที่เป็นดีเอ็นเอใส่หลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่
นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
แล้วนำไปวิเคราะห์โดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซีสใน 1 เปอร์เซ็นต์ ของ agarose gel นำไปผ่าน
กระแสไฟฟ้า โดยควบคุมค่าความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที
และย้อมสีด้วย ethidium bromide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้