การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1)

Studies on the Optimal Time Period for Harvesting *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) Produced in *Spodoptera exigua* Cell Line (UCR-SE-1)

อุ่นเรือน เพชรวัลย์ และสุวัฒน์ มงคลวราภรณ์
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

การศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตของไวรัส โดยใช้นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) และเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเกรซ ที่เสริมด้วย 10% ซีรัมลูกวัว (FBS) โดยทำการปลูกเซลล์ลงในขวดเพาะเลี้ยงขนาดพื้นที่ 25 ซม ^{2} จำนวนเซลล์ตั้งต้นที่ใช้ปลูกเท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อขวด และปลูกเชื้อ *Se*MNPV รุ่น (passage)ที่ 3 ค่า MOI เท่ากับ 1 plaque-forming unit (PFU) ต่อ เซลล์ ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่พบผลึกโปรตีน (OBs) จำนวนผลึกโปรตีน (OBs) ต่อ มิลลิลิตรและต่อเซลล์ และค่าไวรัสไตเตอร์ของไวรัสอิสระ (ECV) ซึ่งพบในเซลล์ UCR-SE-1 หลังจากปลูกเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อสูงสุด (49.63%) หลังจากปลูกเชื้อนาน 5 วัน ส่วนเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อที่เก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อนาน 3 วัน และ 7 วัน คือ 14.51% และ 34.99% ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน ต่อมิลลิลิตร (และต่อเซลล์) ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวภายหลังการปลูกเชื้อ 3 5 และ 7 วัน ได้แก่ 1.78 x 10^5 ผลึกต่อมิลลิลิตร (2.22 ผลึกต่อเซลล์) 7.95 x 10^6 ผลึกต่อมิลลิลิตร (30.90 ผลึกต่อเซลล์) และ 7.667 x 10^6 ผลึกต่อมิลลิลิตร (35.85 ผลึกต่อเซลล์) ตามลำดับ และผลผลิต OBs ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อ 5 วันและ 7 วัน ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สำหรับผลผลิตที่เป็นไวรัสอิสระ ค่าไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการเก็บเกี่ยวหลังจากปลูกเชื้อ 5 วัน (1.95 x 10^7 PFU ต่อ มิลลิลิตร) และ 7 วัน (1.92 x 10^7 PFU ต่อ มิลลิลิตร) ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยว *Se*MNPV ควรจะเป็นช่วงหลังจากการปลูกเชื้อนาน 5 วัน และ 7 วัน

คำสำคัญ : เซลล์ไลน์แมลง หนอนกระทู้หอม นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส บาคูโลไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The optimal time period for harvesting the production of virus was conducted by using *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (*Se*MNPV) and *Spodoptera exigua* cell line (UCR-SE-1) cultivated in Grace' s medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The TC- 25 cm^2 flask was planted with 5 milliliters of cell suspension at 2 x 10^5 cells per milliliter and infected with *Se*MNPV at a multiplicity of infection (MOI) of 1 plaque-forming unit (PFU) per cell from the third passage in tissue culture. Cell cultures were examined for the percentage of cells possessing occlusion bodies (OBs), the number of occlusion bodies per milliliter and per cell and the titer of extracellular virus (ECV) in UCR-SE-1 cells at 3, 5, and 7 days postinfection, respectively.

The results showed that the highest percentage of infected cells (49.63 %) was found in culture harvested at 5 days postinfection. The percentage of infected cells in cultures harvested at 3 and 7 days postinfection were 14.51 % and 34.99 %, respectively. The average number of occlusion bodies per milliliter (and per cell) were harvested at 3, 5, and 7 days postinfection and the results were 1.78 x 10^5 OBs per milliliter (2.22 OBs per cell), 7.95x 10^6 OBs per milliliter (30.90 OBs per cell), and 7.667 x 10^6 OBs per milliliter (35.85 OBs per cell), respectively. There were no significantly different between the yields of OBs in harvesting at 5 days and 7 days postinfection. For the titer of extracellular virus production, the results showed that it was not significantly different between the production in harvesting at 5 days (1.95x 10^7 PFU per milliliter) and 7 days (1.92 x 10^7 PFU per milliliter) postinfection. These studies indicated that the optimal time period for harvesting *Se*MNPV should be harvested at 5 days and 7 days postinfection.

Keyword : insect cell line, *Spodoptera exigua*, nucleopolyhedrovirus, baculovirus

1. บทนำ

หนอนกระทู้หอม (beet armyworm) ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Spodoptera exigua* (Hübner) เป็นผีเสื้อกลางคืนจัดอยู่ในวงศ์นอคทูอิดี (Family Noctuidae) อันดับเลพิดอปเทอรา (Order Lepidoptera) คลาสอินเซคตา (Class Insecta) และไฟลัมอาร์โทรโปดา (Phylum Arthropoda) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ มีการระบาดกว้างขว้างทั่วโลก [1,2] การใช้สารเคมีกำจัดแมลงเพื่อควบคุมประชากรของหนอนกระทู้หอมมักจะไม่ได้ผล ทั้งนี้เพราะหนอนมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงอย่างรวดเร็ว ต่อมาได้มีการสำรวจพบว่านิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus, *Se*MNPV) ทำให้หนอนกระทู้หอมซึ่งระบาดในธรรมชาติเกิดโรคและตาย ทั้งยังมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนกระทู้หอมที่ระบาดในแปลงปลูกพืช สำหรับการผลิต *Se*MNPV ในปัจจุบันทำการเพิ่มปริมาณในตัวหนอนโดยตรง (*in vivo*) และเก็บเกี่ยวไวรัสจากหนอนที่ตายแล้ว [1,3] ซึ่งต้องทำการเพาะเลี้ยงแมลงจำนวนมากตลอดจนพื้นที่สำหรับเพาะเลี้ยงและเจ้าหน้าที่จำนวนมากเพื่อเลี้ยงแมลงและผลิตอาหารเทียม นอกจากนี้ไวรัสที่ได้มีการปนเปื้อน จุลินทรีย์หลายชนิด จึงมีความจำเป็นต้องทำให้ไวรัสบริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อที่จะได้ผลึกโปรตีนของไวรัสที่บริสุทธิ์ต่อไป [4] สำหรับการผลิตไวรัสอีกทางเลือกหนึ่งคือการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงของแมลง (*in vitro*) ซึ่งสามารถกระทำได้ในห้องปฏิบัติการที่มีพื้นที่จำกัด และผลผลิตที่ได้มีความบริสุทธิ์ไม่ปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่นๆ สะดวกต่อการแยกผลึกโปรตีนของไวรัสไปใช้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการเพิ่มปริมาณ *Se*MNPV โดยใช้เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมชนิด UCR-SE-1 ซึ่งตั้งต้นเพาะเลี้ยงมาจากเนื้อเยื่อของหนอนกระทู้หอมวัยแรกเกิด (neonate larva) โดย Gelernter และ Federici [3] โดยทำการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) และเปรียบเทียบผลผลิตของ *Se*MNPV ทั้ง 2 รูปแบบคือไวรัสในรูปแบบอิสระ (extracellular virus, ECV) และไวรัสที่อยู่ในรูปผลึกโปรตีน (occluded virus, OV) ซึ่งเก็บเกี่ยวภายหลังการปลูกเชื้อนาน 3 5 และ 7 วันตามลำดับ

2.วิธีการวิจัย

2.1 การเพิ่มปริมาณเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) โดยใช้ขวดเพาะเลี้ยงชนิดพลาสติคขนาดพื้นที่ 25 ซม^2 ปลูกเซลล์ UCR-SE-1 จำนวน 2 x 10^5 เซลล์/มล. ปริมาตรทั้งหมด 5 มล./ขวด ในอาหารเกรซ (Grace's medium) เสริมด้วย 10% ซีรัม (fetal bovine serum, FBS) และเติม 0.1% พลูโรนิค เอฟ-68 (Pluronic F-68) นำขวดเพาะเลี้ยงเก็บไว้ในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 28° ซ เป็นเวลา 6 วัน สังเกตเซลล์เจริญเต็มพื้นผิวของขวดเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการถ่ายเซลล์ (subculture) ต่อไป

2.2 การเตรียมนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus)

2.2.1 เตรียมเซลล์ไลน์ UCR-SE-1 โดยการปลูกเซลล์จำนวน 2 x 10^5 เซลล์/มล. ปริมาตร 5 มล./ขวด จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 1 คืน

2.2.2 ดูดอาหารเดิมออก และเติมไวรัสในรูปของ ECV 1 มล.ซึ่งทราบค่าปริมาณไวรัส (virus titer) จากการคำนวณหาปริมาณของไวรัสที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อ 50% (50% tissue-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

culture infective dose, $TCID_{50}$) ตามวิธีการของ O'Reilly และคณะ [5] ซึ่งทดลองโดยใช้ไมโครไตเตอร์เพลท (microtiter plate) ก่อนที่จะนำ ECV ไปเพาะเชื้อ (inoculate) ลงในเซลล์สำหรับการทดลองต่อไป จะต้องปรับค่าของ MOI (multiplicity of infection) ให้เท่ากับ 1 หมายความว่าเติมไวรัส 1 อนุภาค (particle) ต่อเซลล์ 1 เซลล์ (PFU/cell) โดยคำนวณจากสูตรต่อไปนี้ [6]

ปริมาตรของ inoculum (มล.) =
ปริมาณไวรัสที่ใช้ต่อเซลล์ (MOI) x จำนวนเซลล์ / ไวรัสไตเตอร์ (PFU/ml)

2.2.3 วางขวดเพาะเลี้ยงที่ปลูกเชื้อแล้วบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำสุด นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดไวรัสออกทั้งหมด จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มล.ต่อ 1 ขวด และเก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตไวรัสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.4 การเก็บเกี่ยวไวรัส กระทำโดยการขูดเซลล์ที่เพาะเชื้อ *Se*MNPV (ข้อ 2.2.3) จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จำนวนเซลล์ตาย จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายที่ติดเชื้อ ดูดเซลล์แขวนลอยพร้อมอาหารเดิมใส่ลงในหลอดทดลองที่มีฝาเกลียวขนาด 10 มล. นำไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 rpm นาน 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ซึ่งส่วนนี้มีไวรัสในรูปของ ECV เป็น infectious medium ทำการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บในอุณหภูมิ –20° ซ เพื่อนำไปทดสอบค่า $TCID_{50}$ ต่อไป สำหรับตะกอนเซลล์ (pellet) นำมาทำให้เซลล์แตก โดยวิธีการของ O'Reilly และคณะ [5] ดังนี้

นำตะกอนเซลล์ (pellet) ที่ได้จากการทำให้ติดเชื้อ

↓

ทำให้แขวนลอยโดยใช้ 0.5% SDS 1 มล.ต่อตะกอนเซลล์ที่ได้จาก 1 ขวดเพาะเลี้ยง ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน

↓

ทำการปั่นแยกที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓

ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งและเติม 0.5 M NaCl 1 มล.ทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอย

↓

ทำการปั่นแยกที่ 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓

ดูดส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งและเติมน้ำกลั่นที่ทำการปลอดเชื้อแล้ว 1 มล. ทำให้ตะกอนเซลล์แขวนลอยและนับจำนวนผลึกโปรตีนโดยใช้ฮีโมไซโตมิเตอร์

↓

บันทึกผลจำนวนผลึกโปรตีนเพื่อคำนวณหา จำนวนผลึกโปรตีน/มล. และจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์

2.2.5 คำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์ (virus titer) และจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัส *Se*MNPV ผลผลิตที่ได้จากการเก็บเกี่ยวไวรัสดังกล่าวข้างต้นได้แก่ ส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) คือส่วนของไวรัสในรูปแบบที่เรียกว่า extracellular virus (ECV) และส่วนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นตะกอนเซลล์ (pellet) ประกอบด้วยเซลล์ที่ติดเชื้อและมีผลึกโปรตีน (occlussion bodies, OBs) อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลง

การคำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์ในที่นี้ใช้วิธีการหาค่า end-point dilution ตามวิธีการของ O'Reilly และคณะ [5] โดยการใช้ ECV ในระดับความเจือจางต่างๆกัน และปลูกเชื้อลงในแต่ละหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท โดยปลูกไวรัส 1 ค่าความเจือจางต่อ 1 คอลัมน์ บ่มเชื้อนาน 7 วัน ที่อุณหภูมิ 28° ซ ทำการตรวจผลการติดเชื้อในแต่ละหลุมทุกค่าความเจือจาง ถ้าพบว่าหลุมใดมีเซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทราบได้จากการมีผลึกโปรตีนภายในนิวเคลียสของเซลล์แมลง จะบันทึกเป็นบวก (+) สำหรับหลุมนั้น แต่ถ้าหลุมใดไม่ติดเชื้อจะบันทึกเป็นลบ (-) นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณของไวรัสที่ทำให้เซลล์ติดเชื้อ 50% (50% tissue-culture infective dose) และค่าไวรัสไตเตอร์มีค่าเท่ากับ 10^{x} $TCID_{50}$ /มล. หรือมีค่าเท่ากับ 0.69 x 10^{x} PFU/มล. (PFU= Plaque-forming unit) ตามวิธีการของ O'Reilly และคณะ [5]

2.3 การทดสอบช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus) เตรียมปลูกเซลล์ UCR-SE-1 ในขวดเพาะเลี้ยง ขนาดพื้นที่ 25 $ซม^2$ โดยใช้ความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 2 x 10^5 เซลล์ต่อ มล. ปริมาตร 5 มล. ต่อ 1 ขวด นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 28° ซ เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นดูดอาหารเดิมออกจากขวดเพาะเลี้ยงทั้งหมด แล้วเติม *Se*MNPV ในรูปของไวรัสอิสระ (ECV) ซึ่งปรับค่า MOI = 1 โดยเติมปริมาตร 1 มล. ต่อ 1 ขวด และนำไปวางบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบต่ำสุด เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูด ECV ออกไป และเติมอาหารใหม่ 5 มล. ต่อ 1 ขวด ส่วนขวดควบคุมนั้นหลังจากดูดอาหารเดิมออกไปแล้ว จะต้องเติมอาหารใหม่ลงไป 5 มล. ต่อ 1 ขวด เพาะเลี้ยง นำสิ่งทดลองทั้งหมดเก็บในตู้บ่มอุณหภูมิ 28° ซ เมื่อครบกำหนดระยะเวลาการบ่มนาน 3 5 และ 7 วัน ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ และไวรัส เพื่อคำนวณหาค่า จำนวนเซลล์มีชีวิต เซลล์ตาย เซลล์มีชีวิตที่ติดเชื้อ และเซลล์ตายที่ติดเชื้อ ส่วนไวรัสเมื่อทำการเก็บเกี่ยวแล้ว จะทำการคำนวณหาค่าไวรัสไตเตอร์และจำนวนผลึกโปรตีนของไวรัสต่อไป

2.4 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple-range test [7]

3. ผลการวิจัย

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) เพื่อปลูกเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (SeMNPV) โดยปลูกเซลล์จำนวน 2x10^5 เซลล์/มล. ปริมาตร 5 มล. เพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (monolayer culture) สำหรับไวรัสที่ใช้อยู่ในรูปของไวรัสอิสระ (extracellular virus, ECV) รุ่น (passage) ที่ 3 และค่า MOI=1 ทำการบ่มเชื้อในตู้บ่มอุณหภูมิ 28°ซ ต่อมาทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 และ 7 วัน ตามลำดับ และลักษณะของเซลล์ในสิ่งทดลองทั้งหมดแสดงในรูปที่ 1-3

ผลการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมที่ติดเชื้อนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลที่ได้คือมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ที่ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อของสิ่งทดลองทั้งหมด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน เท่ากับ 15.01% จากนั้นทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ/มล. โดยวิธี Duncan's new multiple range test ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ ระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (14.51%) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อในกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (49.63%) และ 7 วัน (34.99%)

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อระหว่างกลุ่มสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (49.63%) กับค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อของสิ่งทดลองที่ทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (34.99%) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (ที่ระดับความเป็นไปได้ .05) โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน มีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 7 วัน เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะเมื่อทำการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (เซลล์มีอายุ 8 วัน) เป็นช่วงที่มีความหนาแน่นของเซลล์มาก สารอาหารถูกใช้ไปในการเจริญและการแบ่งเซลล์จำนวนมากตามไปด้วย จึงทำให้เหลือสารอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ของเสียที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมมีปริมาณมาก ทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์จึงอ่อนแอต่อการติดเชื้อไวรัส และเซลล์แตกง่ายกว่าเซลล์ในสิ่งทดลองซึ่งทำการเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (เซลล์มีอายุ 6 วัน) ดังนั้นเมื่อทำการเก็บเกี่ยวจึงทำให้พบค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อน้อยกว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อซึ่งเก็บเกี่ยวผลผลิตภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน

การเปรียบเทียบผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อ มล. ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 ซึ่งค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ต่อ มล. มีค่าเท่ากับ 1.78×10^5 ผลึก/มล. 79.50×10^5 ผลึก/มล. และ 76.67×10^5 ผลึก/มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ของสิ่งทดลองทั้งหมด จากนั้นทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/มล. โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (1.78×10^5 ผลึก/มล.) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับ ผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (79.50×10^5 ผลึก/มล.) และ 7 วัน (76.67×10^5 ผลึก/มล.) โดยจำนวนผลึกโปรตีนที่ได้มีจำนวนน้อยที่สุด ทั้งนี้เพราะช่วงการบ่มเชื้อ 3 วัน จำนวนเซลล์และจำนวนไวรัสน้อยกว่าสิ่งทดลองที่ทำการบ่มเชื้อนาน 5 และ 7 วัน โอกาสติดเชื้อจึงมีน้อยกว่า ดังนั้นเมื่อทำการเก็บเกี่ยวผลผลิตจึงได้จำนวนผลึกโปรตีนน้อย

ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (79.50×10^5 ผลึก/มล.) ผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/มล. ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (76.67×10^5 ผลึก/มล.) ดังนั้นถ้าต้องการเก็บเกี่ยวผลผลิตผลึกโปรตีนของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม สามารถเก็บผลผลิตได้ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน และ 7 วัน

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์ ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 5 และ 7 วัน (ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีนต่อเซลล์เท่ากับ 2.22 30.90 และ 35.85 ผลึก/เซลล์ ตามลำดับ) พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างสิ่งทดลองทั้งหมด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวนเท่ากับ 18.18% เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

จำนวนผลึกโปรตีนนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 3 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.22 ผลึก/เซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (30.90 ผลึก/เซลล์) และ 7 วัน (35.85 ผลึก/เซลล์) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

สำหรับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ ระหว่างผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (30.90 ผลึก/เซลล์) และ 7 วัน (35.85 ผลึก/เซลล์) ผลที่ได้คือไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการเก็บเกี่ยวผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีน สามารถกระทำได้ภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน และ 7 วัน

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (virus titer, pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) (ตารางที่ 3) จากการทดสอบค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไวรัสหนอนกระทู้หอม ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (0.73×10^6 pfu/ml) 5 วัน (19.50×10^6 pfu/ml) และ 7 วัน (19.20×10^6 pfu/ml) ผลที่ได้คือมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (ที่ระดับความเป็นไปได้ .01) ระหว่างค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของสิ่งทดลองทั้งหมด จากนั้นทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม โดยวิธี Duncan's new multiple range test ได้ผลการเปรียบเทียบดังนี้

ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน มีค่าไวรัสไตเตอร์น้อยที่สุด (0.73×10^6 pfu/ml) และมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (19.50×10^6 pfu/ml) และ ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (19.20×10^6 pfu/ml)

ผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (19.50×10^6 pfu/ml) กับผลผลิตที่เป็นค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ซึ่งได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (19.20×10^6 pfu/ml) ผลที่ได้ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างผลผลิตทั้ง 2 สิ่งทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงว่าถ้าต้องการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมในรูปไวรัสอิสระ (extracellular virus, ECV) สามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่อทำการบ่มเชื้อนาน 5 วัน หรือ 7 วัน ซึ่งจะได้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกัน

3. สรุปผลการวิจัย/ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) แบบ monolayer culture ด้วยขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยทำการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลาต่างกัน 3 ช่วง คือ 3 5 และ 7 วัน ตามลำดับ จากนั้นจึงทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังนี้

1. เปอร์เซ็นต์เซลล์ไลน์ UCR-SE-1 ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV ซึ่งเก็บเกี่ยวภายหลังการบ่มเชื้อนาน 5 วัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เซลล์ติดเชื้อมากที่สุด รองลงมาคือผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน และ 3 วัน ตามลำดับ

2. ผลผลิตผลึกโปรตีนของ *Se*MNPV เมื่อทำการเปรียบเทียบ จำนวนผลึกโปรตีน/มล. และจำนวนผลึกโปรตีน/เซลล์ พบว่าผลผลิตที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (7.95×10^6 ผลึก/มล.และ 30.90 ผลึก/เซลล์) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (7.667×10^6 ผลึก/มล. และ 35.85 ผลึก/เซลล์)

3. ผลผลิตไวรัสอิสระ (extracellular virus) ซึ่งเป็นค่าของไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml) ค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 3 วัน (7.3×10^5 pfu/ml) มีค่าน้อยที่สุด ส่วนค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 5 วัน (1.95×10^7 pfu/ml) กับค่าเฉลี่ยของไวรัสไตเตอร์ที่ได้จากการบ่มเชื้อนาน 7 วัน (1.92×10^7 pfu/ml) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิต *Se*MNPV ทั้งผลผลิตที่เป็นผลึกโปรตีน (occlusion bodies) และไวรัสอิสระ (extracellular virus) ซึ่งปัจจัยที่ควรนำมาศึกษา เช่น ชนิดของอาหาร pH ของอาหาร เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอมต่าง passage *Se*MNPV ต่าง passage และค่า MOI ของไวรัสที่ใช้ในการเพาะเชื้อ เป็นต้น ทั้งนี้จากการรายงานของอุทัย [4] กล่าวว่าหนอนกระทู้หอมวัยที่ 5 มีขนาดโตเต็มที่ เมื่อตายด้วยไวรัส จะพบปริมาณผลึกโปรตีนของไวรัสจำนวน $5x10^8$-$1x10^9$ ผลึก/ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนผลึกโปรตีนที่ได้จากการทดลองนี้คือ 7.667×10^6 ผลึก/มล. ดังนั้นต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อเพิ่มปริมาณไวรัสประมาณ 80-100 มล. จึงจะได้ปริมาณผลึกโปรตีนเท่ากับการเพิ่มปริมาณไวรัสในหนอนวัยที่ 5 จำนวน 1 ตัว

2. ควรศึกษาประสิทธิภาพในการทำให้หนอนกระทู้หอมเกิดโรคโดยการใช้ผลึกโปรตีนที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ เปรียบเทียบกับผลึกโปรตีนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในตัวหนอน ว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคแตกต่างกันหรือไม่

ตารางที่ 1 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิต/มล. จำนวนเซลล์ตาย/มล. และ เปอร์เซ็นเซลล์ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV ระหว่างสิ่งทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.05)

สิ่งทดลอง	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมล.[ㄴ] (x 10^5)	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ตายต่อมล.[ㄴ] (x 10^5)	ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ติดเชื้อ *Se*MNPV[ㄴ]
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 1.	4.63 ^{c}	1.36 ^{d}	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 3 วัน	4.18 ^{c}	1.49 ^{d}	14.51 ^{c}
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 2.	7.38 ^{b}	2.16 ^{c}	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 5 วัน	2.75 ^{d}	2.53 ^{c}	49.63 ^{a}
เซลล์เพาะเลี้ยงปกติ 3.	8.35 ^{a}	3.23 ^{b}	-
ผลผลิตที่ได้ภายหลังผ่านการบ่มเชื้อ 7 วัน	2.06 ^{d}	3.94 ^{a}	34.99 ^{b}

ㄴ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus) ซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.01)

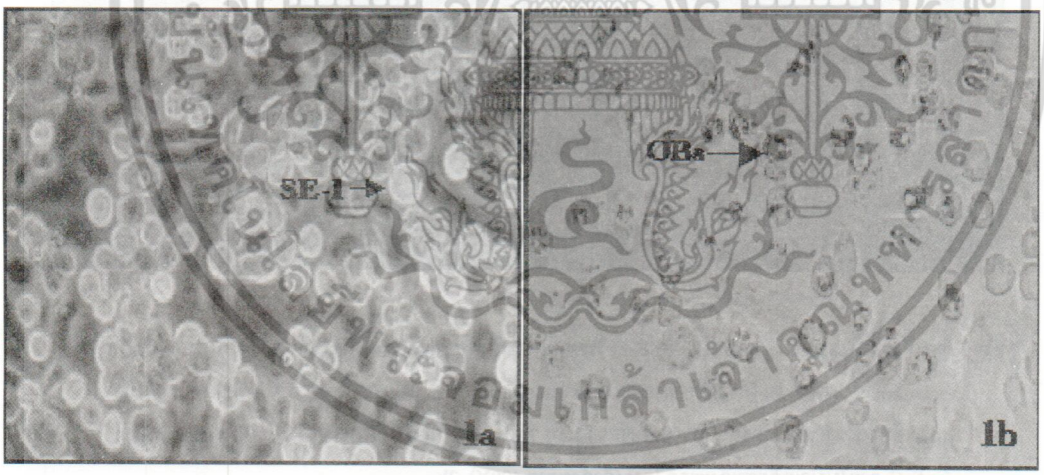
ช่วงเวลาการบ่มเชื้อ *Se*MNPV	ค่าเฉลี่ยจำนวนผลึกโปรตีน (occlusion bodies)[ㄴ]	
	ต่อมล. (x10 ^{5})	ต่อเซลล์
นาน 3 วัน	1.78 ^{b}	2.22 ^{b}
นาน 5 วัน	79.50 ^{a}	30.90 ^{a}
นาน 7 วัน	76.67 ^{a}	35.85 ^{a}

ㄴ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 แสดงผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (virus titer, pfu/ml) ของนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอมซึ่งเพาะเลี้ยงในเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ระหว่างสิ่งทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (LSR=0.01)

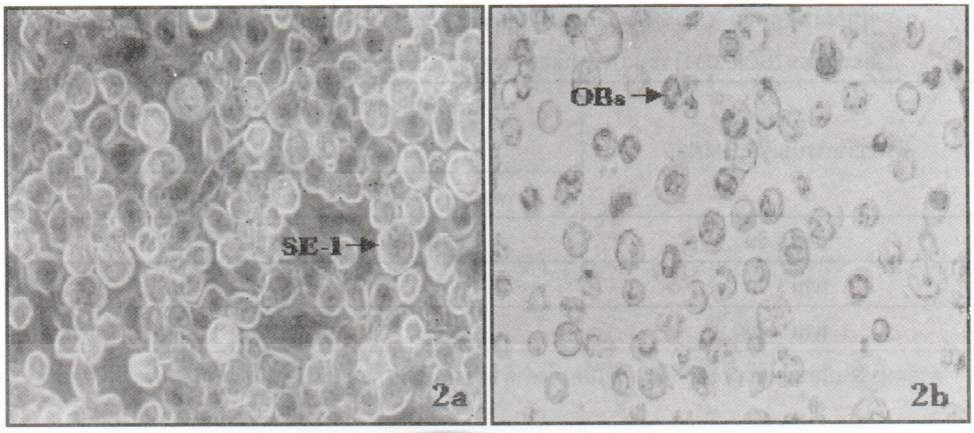
ช่วงเวลาการบ่มเชื้อ *Se*MNPV	ค่าเฉลี่ยไวรัสไตเตอร์ (pfu/ml)[ㄴ] (x 10 ^{6})
นาน 3 วัน	0.73 ^{b}
นาน 5 วัน	19.50 ^{a}
นาน 7 วัน	19.20 ^{a}

ㄴ ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงค่าตัวเลขที่เปรียบเทียบกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ



รูปที่ 1 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 4 วัน (กำลังขยาย 400 X), 1a และเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 3 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (Obs= Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X), 1b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 6 วัน (กำลังขยาย 400 X), 2a และเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 5 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400 X), 2b

รูปที่ 3 เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ในขวดเพาะเลี้ยงควบคุม (control) ภายหลังจากการถ่ายเซลล์ (subculture) นาน 8 วัน (กำลังขยาย 400X), 3a และเซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) ภายหลังปลูกเชื้อไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) นาน 7 วัน แสดงผลึกโปรตีนของไวรัส (OBs=Occlusion bodies) ภายในนิวเคลียสของเซลล์ไลน์ (กำลังขยาย 400X), 3b

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพย์วดี อรรถธรรม และ ดร.สุดาวรรณ เชยชมศรี ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์ไลน์หนอนกระทู้หอม (UCR-SE-1) และนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสหนอนกระทู้หอม (*Se*MNPV) และขอขอบคุณ คุณอุทัย เกตุนุติ ที่ให้ความอนุเคราะห์หนอนกระทู้หอมระยะต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

[1] อุทัย เกตุนุติ. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีด้วยไวรัส เอ็น พี วี. กรุงเทพมหานคร โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2540.

[2] Trumble, J.T., and Baker, T.C. "Flight phenology and pheromone trapping of *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera:Noctuidae) in southern and coastal California." **Environ. Entomol.**, 1984, 13, 1278-1282.

[3] Gelernter, W.D., and Federici, B.A. "Continuous cell line from *Spodoptera exigua* (Lepidoptera:Noctuidae) that supports replication of nuclear polyhedrosis viruses from *Spodoptera exigua* and *Autographa californica*." **J. Invertebr. Pathol.**, 1986, 48, 199-207.

[4] อุทัย เกตุนุติ. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส. *ใน* เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน, น. 128-162, กรุงเทพมหานคร, โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, 2539.

[5] O' Reilly, D.R., Miller, L.K., and Luckow, V.A. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. W.H. Freeman and company, New York, 1992.

[6] Summer, M.D., and Smith, G.E. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. College Station, Texas, 1987.

[7] สุรพล อุปดิสสกุล. สถิติการวางแผนการทดลอง. กรุงเทพมหานคร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2528.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้