รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวินทรีย์สู่เชิงพาณิชย์

2. โครงการ สำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร

3. ชื่อการทดลอง การคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก
Efficacy test of viral particles for the occlusion bodies Nucleopolyhedrovirus (NPV) in Plutella xylostella cell line

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	พัชรีวรรณ จงจิตเมตต์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	สาทิพย์ มาลี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การทดลองวิจัยการคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง เดือนตุลาคม 2560 ถึง เดือนกันยายน 2563 พบว่า ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบประสิทธิภาพไวรัสกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 และมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ กับ Virions of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by larvae, Virions of HaSNPV, Virions of HaSNPV infected Sf cells culture, Occlusion bodies of SlNPV by larvae, Occlusion bodies of TnNPV by larvae และ เปรียบเทียบกับ Control(distilled water) พบว่า มีหนอนตายในไวรัสทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ แต่จะมีขนาดของหนอนที่แตกต่างกันซึ่งข้อมูลการตายของหนอนแต่ละตัวจากไวรัสแต่ละชนิดนำไปใช้ทดสอบกับหนอนใยผักต่อไป และต้องมีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยจึงจะสรุปได้แน่นอนยิ่งขึ้น

คำหลัก : ไวรัส เอ็น พี วี หนอนใยผัก เซลล์เพาะเลี้ยง Nucleopolyhedrovirus, NPV, *Plutella xylostella*, cell culture

กรมวิชาการเกษตร

6. คำนำ

หนอนใยผัก *Plutella xylostella* Linnaeus เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ มักพบระบาดทั่วไปตามแหล่งปลูกผักทั่วโลก มูลค่าการควบคุมกว่าพันล้านเหรียญสหรัฐต่อปี (Sarfraz *et al*., 2005) โดยเฉพาะในกลุ่มพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น คะน้า กวางตุ้ง กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี บร็อคโคลี่ ผักกาดเขียว ผักกาดหัว เป็นต้น หนอนแมลงชนิดนี้มีวงจรชีวิตสั้น ประมาณ 14 - 18 วัน (ฤดูร้อน) 28-29 วัน (ฤดูหนาว) หรือ โดยเฉลี่ยมี 17-25 ชั่วอายุขัยต่อปี มีการแพร่พันธุ์และขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว หลังออกจากดักแด้ภายใน 1 วัน สามารถวางไข่ได้ทันทีและวางไข่ได้ตลอดชีวิต ตัวเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ระหว่าง 50-400 ฟอง/ตัว ตามสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมและมีพืชอาหารตลอดปี ปัจจุบันมีรายงานหนอนใยผักสามารถพัฒนาสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้รวดเร็วและหลายชนิด จึงเป็นการยากต่อการป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารฆ่าแมลงฉีดพ่นเป็นประจำเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงควรใช้หลายๆ วิธีผสมผสานกันจึงจะสามารถลดการระบาดของหนอนใยผักได้ เช่น การใช้วิธีเขตกรรม การใช้กับดัก การใช้โรงเรือนตาข่ายไนล่อน การใช้ระดับเศรษฐกิจและการสุ่มตัวอย่างก่อนพ่นสารฆ่าแมลง และ การใช้ศัตรูธรรมชาติ แตนเบียนไข่ และ แบคทีเรีย ซึ่งผลการควบคุมหนอนใยผักทั่วปของเกษตรกรยังไม่ประสบผลสำเร็จ นอกจากนี้ยังพบสารพิษตกค้างเป็นปัญหาในการส่งออกพืชไปยังต่างประเทศ ดังนั้น จึงจำเป็นที่จะต้องหาศัตรูธรรมชาติชนิดอื่นมาช่วยในการป้องกันกำจัดแบบยั่งยืนเพื่อให้เป็นทางเลือกให้กับเกษตรกร นั่นคือ ไวรัสโรคของแมลง ชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่มีคุณสมบัติทำให้หนอนแมลงเป็นโรคตาย แบบเฉพาะเจาะจงต่อชนิดหนอน และหนอนแมลงไม่สามารถสร้างความต้านทานได้ เนื่องจากไวรัส NPV จะเข้าไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์หนอนทำให้ระบบการทำงานของเซลล์ถูกทำลายอย่างสิ้นเชิง ในลักษณะที่ทำให้หนอนป่วยเป็นโรคตายในที่สุด ซึ่งเหตุผลนี้จะทำให้การวิจัยนำไวรัส NPV โรคของหนอนใยผักนำมาใช้ประโยชน์ในการแก้ไขปัญหาให้กับเกษตรกรได้ ซึ่งไวรัส NPV ของหนอนใยผัก ในประเทศไทยยังไม่ยังไม่มีรายงานมาก่อน วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้เพื่อคัดเลือกอนุภาคไวรัส เอ็น พี วี ที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก จากเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง

จากการตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องและผลงานวิจัยที่ผ่านมา หนอนใยผัก diamondback moth (DBM), *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae) เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ เช่น พืชตระกูลกะหล่ำ การระบาดเข้าทำลายได้มาก เนื่องจากมีวงจรชีวิตที่สั้น ขยายพันธุ์ได้จำนวนมากและรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า หนอนใยผักสามารถต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลง และ สารชีวินทรีย์ (bio-pesticide) ชนิด *Bacillus thuringiensis* (Bt) ได้ด้วย (Shelton and Talekar, 1993; Tabashnik *et al*., 1992) สารเคมีเกือบทั้งหมดจะมีผลต่อแมลงเบียนที่มีประโยชน์ (DBM parasitoids) ทั้งระยะหนอน และตัวเต็มวัย (Idris and Grafius, 1993)

การใช้ไวรัสเป็นสารชีวินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สาธารณรัฐสหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น ซึ่งบางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า (Entwistle, 1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510 มีรายงานการศึกษาวิจัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus หรือชื่อเดิม Nuclear polohedrosis viruses

กรมวิชาการเกษตร

หรือ NPV จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนเจาะสมอฝ้าย (HaNPV) ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนกระทู้หอม (SeNPV) ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนกระทู้ผัก (SlNPV) และ ไวรัส NPV สาเหตุโรคของหนอนคืบกะหล่ำ (TnNPV) ซึ่งหนอนเหล่านี้เป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญมักทำลายผลผลิตของเกษตรกรอยู่เสมอ เนื่องจากมีพืชอาหารที่สมบูรณ์ตลอดปี (อุทัย, 2544 ; สุชลวัจน์ และ พิมลพร, 2544) สำหรับ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยผลิตขยายไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด HaNPV SeNPV และ SlNPV เป็นปริมาณมากจากตัวแมลง(การผลิตแบบ *in vivo*) ก็มักประสบปัญหาการผลิตไม่เพียงพอ คุณภาพไม่สม่ำเสมอเช่นกัน จึงได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชแบบ *in vitro* จาก United Stated Department of Agriculture USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุชลวัจน์และคณะ, 2543) มาประยุกต์ใช้และสามารถทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทย (Sl cell line : *Spodoptera litura* cell line) จากเอ็มบริโอได้เป็นผลสำเร็จ เซลล์เพาะเลี้ยงมีอัตราการเจริญ 91.49% (สุชลวัจน์และคณะ, 2545) ต่อมาใช้เทคนิคเดียวกันเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมสายพันธุ์ไทย ผลิตขยายไวรัสต่อเนื่องกัน 3 รุ่น (passage 1-3) จำนวน 2 ซ้ำ ใช้อัตราความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น 1 x 10^6 เซลล์/มล. ใน T-flask ปริมาตร 5 มล./ขวด และ ใน E-flask ปริมาตร 25 มล./ขวด เก็บผลึกไวรัสหลัง infected 7 วัน ได้ผลึกไวรัสเฉลี่ย 3.12 x 10^7 , 3.84 x 10^7 และ 4.95 x 10^7 ผลึก/มล. ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพไวรัส SeMNPV ทั้ง 3 รุ่น เปรียบเทียบกับไวรัส SeMNPV ที่เก็บเกี่ยวจากหนอนใกล้ตาย กับหนอนกระทู้หอม วัยที่ 3 โดยวิธีการทดลองแบบ surface layer method ใช้ระดับความเข้มข้นผลึกไวรัส เท่ากับ 2 x 10^6 ผลึก/มล. ปริมาตร 40 ไมโครลิตร/ถ้วย วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 4 ซ้ำ 4 กรรมวิธี พบว่า ไวรัส SeMNPV ทั้ง 3 รุ่น และไวรัส SeMNPV ที่เก็บเกี่ยวจากหนอนใกล้ตาย ทำให้หนอนตาย 85.00, 80.00, 77.50 และ 75.00 % ตามลำดับ ภายใน 6 วันหลังจากการติดเชื้อ (infection)โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % วิเคราะห์โดยวิธี DMRT และมีแนวโน้มที่จะตายได้เร็วกว่าในช่วง 2-4 วันหลังจากการติดเชื้อ (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) นอกจากนี้ยังได้มีการตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-Based Typing โดยใช้ไพรเมอร์ แบบ degenerate primer จากยีน cathepsin สามารถจำแนกความแตกต่างของไวรัส เอ็น พี วี ทั้ง 4 ชนิดได้ (สุชลวัจน์ และ วัชรี, 2552; Wongwilikhit *et. al*., 2008)

ไวรัสโรคของหนอนใยผัก มีรายงานผลงานวิจัยเกี่ยวกับไวรัส ชนิด Granulosis (GV) ของ ประเทศจีน ญี่ปุ่น ไต้หวัน อินเดีย และ เคนยา (Sarfraz *et al*., 2005)

ส่วนไวรัส NPV ในประเทศจีน มีรายงานการทดลองเชื้อไวรัส AcMNPV and AfMNPV เปรียบเทียบไวรัส PxMNPV กับหนอนใยผัก พบว่ามีค่า LC_{50} มากกว่า 3-4 รอบการทดลอง (Kariuki และ McIntosh 1999) และ ไวรัส *Anagrapha falcifera* (Kirby) (AfMNPV), *Autographa californica* (Speyer) (AcMNPV), และ *Galleria melonella* L. (GmMNPV) มีการทดสอบในหนอนใยผัก DBM (Kadir *et al*. 1999) แต่มีศักยภาพลดลงเมื่อผ่านมาหลายรุ่นในตัวแมลง (serial passage) (Farrar & Ridway 1999) และมีรายงานหนอนแมลงชนิด *G. mellonella* และ *A. californica* ผลการทดลองพบว่า ไวรัสที่ได้จากหนอนแมลง *A. californica* (AcNPV) สามารถทำให้หนอนใยผักอ่อนแอต่อการเกิดโรคไวรัส NPV ได้ (Crook *et. al.,*1999)

ศูนย์วิทยทรัพยากร

รายงานการทดสอบความอ่อนแอของเซลล์เพาะเลี้ยงต่อไวรัส NPV ชนิด HaSNPV, AcMNPV, GmMNPV, SeMNPV และไวรัสกลุ่ม Cytoplasmic polyhedrosis viruses ชนิด BmCPV, CfCPV, EsCPV, HaCPV พบว่า เซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยงอ่อนแอต่อไวรัส AcMNPV และ EsCPV ซึ่งไวรัส AcMNPV มักทำให้เกิดโรคกับตัวหนอนชนิดอื่นได้ ตามที่มีผลงานวิจัยรายงาน (Petcharawan *et al*., 2006)

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น

2. วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง ชุดเครื่องผ่าตัด หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, , Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น

3. เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซีส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต๊อคเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น

4. วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอดปั่นแยกสารละลาย หลอดดูดสารละลาย หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

5. วัสดุ-อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระดาษกรอง ชุดกรองสารละลาย อาหารเพาะเลี้ยงแมลง หลอดปั่นแยกสารละลาย หลอดดูดสารละลาย เป็นต้น

6. วัสดุ-อุปกรณ์การตรวจสอบสายพันธุ์ เช่น สารเคมีใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ไพรเมอร์เพื่อการวิเคราะห์เจลแยกชิ้นดีเอ็นเอ สีย้อมแผ่นเจล เป็นต้น

7. โรงเรือนปลูกพืชอาหารเลี้ยงหนอนใยผัก ขนาด 4 x 8 เมตร จำนวน 1 โรงเรือน

วิธีการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) คัดเลือกไวรัส NPV ที่มีศักยภาพในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง 2) ตรวจสอบสายพันธุ์ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง และ 3) ทดสอบประสิทธิภาพผลึกไวรัส NPV กับหนอนใยผัก

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกไวรัส NPV ที่มีศักยภาพในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง

- **แบบและวิธีการทดลอง**

  แผนการทดลอง –

  วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด ตามลักษณะเฉพาะเพื่อทดลองกับไวรัส ให้ได้อัตรามาตรฐานความเข้มข้นเซลล์เพาะเลี้ยง 2 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงไวรัสแบบชนิดอนุภาคไวรัส และผลึกไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ อนุภาคไวรัสหนอนคืบกะหล่ำปลี อนุภาคไวรัสหนอนกระทู้หอม อนุภาคไวรัสหนอนกระทู้ผัก และอนุภาคไวรัสหนอนเจาะสมอฝ้าย

2. เพาะเลี้ยงขยายเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง จาก embryonic stem cell หรือจากหนอนวัย 1 ตามเทคนิควิธีการของสุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 องศาเซลเซียส เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วย Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ นำเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง มาเลี้ยงขยายในภาชนะ แบบ T-flask ใช้เซลล์ตั้งต้น 2 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัสในเซลล์หนอนใยผัก ด้วย อนุภาคไวรัส ของหนอนชนิดอื่นที่พบในประเทศไทย ในจานทดลอง แบบ 24 well plates เปรียบเทียบกับเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยงปกติ ตามกรรมวิธี โดยใช้อนุภาคไวรัสที่ใช้มีค่า Multiplicity of infection (MOI) เท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น 2 x 10^5 เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากนั้นตรวจดูการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบบ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกผลการทดลอง ด้วยภาพถ่ายและวิเคราะห์ผล

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจสอบสายพันธุ์ไวรัสที่ได้จากเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง เหมือนขั้นตอนที่ 1

- **แบบและวิธีการทดลอง**

  แผนการทดลอง –

  วิธีการทดลอง

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอของไวรัสที่ได้จากการขั้นตอนที่ 1. เปรียบเทียบกับไวรัสที่ได้จากตัวหนอนแมลง ด้วยเทคนิค PCR – Based Typing โดยใช้ไพรเมอร์ แบบ degenerate primer จากยีน cathepsin มีลำดับเบส ดังนี้ cathepsin forward primer 5′-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3′ และ cathepsin reverse primer 5′-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3′ หรือ ออกแบบจากยีนชนิดอื่น เพื่อใช้ตรวจจับที่สายดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ไวรัส จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณ

กรมวิชาการเกษตร

ชิ้นดีเอ็นเอ (amplification) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle โปรแกรม PCR ดังนี้ เริ่มต้น initial denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอน denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และทำให้เกิดปฏิกิริยา dsDNA อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 6 นาที และตั้งอุณหภูมิที่ 4 °C เพื่อรอการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเครื่อง แบ่งส่วนสารละลายชิ้นดีเอ็นเอ (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C) มาตรวจสอบ ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 % ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่ำเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย 1X Fluorostain dye (อัตราส่วน 1:10) นาน 15-20 นาที ตรวจดูขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง B-Box Light LED epi-illuminator เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานพร้อมถ่ายรูปและบันทึกผล เปรียบเทียบผลของขนาดชิ้นและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างไวรัสที่ได้ โดยพิจารณาจากความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอว่ามีความเหมือนกันหรือแตกต่างกัน

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลการทดลองด้วยภาพถ่าย

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบประสิทธิภาพผลึกไวรัส NPV กับหนอนใยผัก

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง เหมือนขั้นตอนที่ 1

- **แบบและวิธีการทดลอง**

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี จำนวน 3 ซ้ำ (หนอนใยผัก 10 ตัว/ซ้ำ) ทดสอบไวรัสเอ็น พี วีที่อัตราความเข้มข้นต่างๆ ความเข้มข้น จำนวน 5 อัตรา และปรับอัตราความเข้มข้น ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 5-10 เท่า กับหนอนใยผักวัย 2 และ 3

- **วิธีปฏิบัติการทดลอง**

1. ปลูกพืชทดลอง ในการทดลองนี้ใช้พืชคะน้า เตรียมผลึกไวรัสเอ็น พี วี และ หนอนใยผัก เพื่อใช้ทดสอบในห้องปฏิบัติการ
2. ทดสอบไวรัสตามกรรมวิธี โดยใช้วิธีการเคลือบใบคะน้า ด้วยสารละลาย ไวรัสเอ็น พี วี แขวนลอย แล้วปล่อยให้หนอนใยผักกินภายใน 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนใบคะน้าใหม่ที่ไม่เคลือบไวรัส เปรียบเทียบกับน้ำกลั่น บันทึกข้อมูลจำนวนหนอนตายทุก 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลทางสถิติเพื่อหาค่า LC_{50} ทุกกรรมวิธี

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลด้วยภาพถ่าย และ บันทึกจำนวนหนอนตายเพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ

แต่ด้วยมีข้อจำกัดในการทดลองวิจัย พบหนอนใยผักเป็นโรคโปรโตซัวจำนวนมาก จึงปรับการดำเนินงานในส่วนนี้มาทดสอบในห้องปฏิบัติการแทน โดยทดสอบประสิทธิภาพไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม ไวรัสNPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับไวรัส NPV ที่ได้จากหนอน

กรมวิชาการเกษตร

กระทู้หอม ไวรัส NPV จากหนอนกระทู้ผัก กับหนอนกระทู้หอมวัย 2 ทดแทนโดยมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า หนอนกระทู้หอมตายในการทดสอบกับ HaNPV/cell, SeNPV/cell, SeNPV/WTและ HaNPV/Sfcell ส่วนหนอนกระทู้ผักตายในการทดสอบกับ HaNPV/cell, HaNPV/WT, SeNPV/cell, SeNPV/WTและ HaNPV/Sfcell

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการวิจัย เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2561 สิ้นสุด กันยายน 2563

สถานที่ดำเนินการ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักงานวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ และ โรงเรือนปลูกพืชทดลอง/แปลงปลูกพืชอาหารหนอนใยผักของเกษตรกร เพื่อเก็บตัวอย่างหนอนใยผักและโรคของแมลง

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการดำเนินการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้าย เพาะเลี้ยง (Ha-cell line) เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง (Se-cell line) เซลล์หนอนกระทู้ผักเพาะเลี้ยง (Sl-cell line) เซลล์หนอนคืบกะหล่ำปลี (Tn-cell line) เซลล์หนอนใยผัก (Px-cell line) และ เซลล์เพาะเลี้ยงต่างประเทศเปรียบเทียบ Sf9-cell line (เซลล์หนอนกระทู้ Fall armyworm *S. frugiperda*) เพื่อใช้ในการทดลอง พบว่า เพาะเลี้ยงเซลล์ได้ต่อเนื่อง (cell line) จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง และ เซลล์เพาะเลี้ยงต่างประเทศเปรียบเทียบ อัตราการเจริญมาตรฐานตั้งต้นที่ 2 x 10^5 เซลล์/มล. มีค่า cells viability มากกว่า 80 % (Table 1) ส่วนเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง เซลล์ยังเจริญไม่เพียงพอต่อรอบการตรวจนับจำนวน รอบการเลี้ยง 5 - 7 วัน และ ยังต้องมีเซลล์ที่ต้องเพาะเลี้ยงอีก 2 ชนิด คือ เซลล์หนอนคืบกะหล่ำปลี (Tn-cell line) จำนวน 1 แหล่งปลูก (จ.นครปฐม) และ เซลล์หนอนใยผัก (Px-cell line) จำนวน 2 แหล่งปลูก (จ.นครปฐม และ จ.นครราชสีมา) ต้องทำการเพาะเลี้ยงใหม่ เนื่องจาก พบโปรโตซัวในตัวหนอนที่มาจากแปลงปลูกพืช ต้องหาแหล่งใหม่ เนื่องจาก การเพาะเลี้ยงเซลล์แต่ละชนิด ต้องใช้เวลารอบของการการเลี้ยงเริ่มต้น 3 - 6 เดือน (Fig 1) เมื่อได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง จึงจะใช้รอบการเลี้ยง 5 - 7 วัน ในช่วงเวลาเดียวกัน ได้ทำการคัดเลือกอนุภาคไวรัสโรคแมลง โดยการคัดเลือดหนอน (bleeding) ได้จำนวน 3 ชนิด คือ อนุภาคไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้หอม และ อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้ผัก (Fig 2) ส่วนอีก 1 ชนิด อนุภาคไวรัสของหนอนคืบกะหล่ำปลี พบการระบาดน้อย ทำให้ยังไม่ได้หนอนแมลงต้นแบบที่นำมาใช้ในการเตรียมอนุภาคไวรัส และ ต้องนำมาคัดแยกเลี้ยงขยายเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการ แล้วจึงจะทำการคัดเลือดหนอน ให้ได้อนุภาคไวรัสได้ ซึ่งในปีต่อมาจะได้โรงเรือนที่เหมาะสมในการเลี้ยงหนอนใยผัก ซึ่งจะทำให้ได้ตัวอย่างแมลงที่ต่อเนื่องกว่าการไปเก็บมาจากแปลงปลูก ซึ่งจะทำให้ได้ทั้งเซลล์เพาะเลี้ยงและอนุภาคไวรัสได้ครบจำนวนตามแผนการทดลองต่อไป

ผลจากการเพาะเลี้ยงรักษาสายพันธุ์เซลล์ต้นแบบ โดยการ sub-culture ทุกๆ 5-7 วัน จำนวน 3 ชนิด (เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง เซลล์เปรียบเทียบ และ รักษาสภาพอนุภาคไวรัส 3 ชนิด (อนุภาคไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้หอม และ

กรมวิชาการเกษตร

อนุภาคไวรัสของหนอนกระทู้ผัก) รวมทั้งเตรียมเพาะเลี้ยงเซลล์เพิ่มเติม และเพาะเลี้ยงรักษาสายพันธุ์เซลล์ต้นแบบ โดยการ sub-culture ทุกๆ 5-7 วัน จำนวน 2 ชนิด (เซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายเพาะเลี้ยง เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง) ขยายเซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายใช้เพาะเลี้ยงขยายไวรัส NPV ให้ได้รูปผลึกและอนุภาคไวรัสในขวดเพาะเลี้ยง(cells spin) ขนาด 50 มล. และ 250 มล. เพื่อใช้ทดสอบประสิทธิภาพการเกิดโรคหนอนใยผัก

ผลการทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยการทดสอบประสิทธิภาพไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับไวรัส NPV ที่ได้จากหนอนกระทู้หอม และ ไวรัส NPV จากหนอนกระทู้ผัก กับหนอนกระทู้หอมวัย 2 โดยมีหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบกั บ Virions of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture, Occlusion bodies of SeMNPV by larvae, Virions of HaSNPV, Virions of HaSNPV infected Sf cells culture, Occlusion bodies of SlNPV by larvae, Occlusion bodies of TnNPV by larvae และ เปรียบเทียบกับ Control(distilled water) พบว่า มีหนอนตายในไวรัสทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ แต่จะมีขนาดของหนอนที่แตกต่างกัน (Table 2) ซึ่งข้อมูลการตายของหนอนจากไวรัสแต่ละชนิดนำไปใช้ทดสอบกับหนอนใยผักต่อไป และต้องมีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมด้วยจึงจะสรุปได้แน่นอนยิ่งขึ้น

Table 1. Average cells viability of *Heilicoverpa armigera* cell line on 1-4 passage at 1:5 sub-culture

Type of cell line	cells viability (%)				
	Passage 1	Passage 2	Passage 3	Passage 4	average
TH-Ha-cell line	86.50	89.27	91.44	94.27	90.37
Sf9 cell line	87.63	88.27	89.01	90.76	88.92

กรมวิชาการเกษตร

Table 2. Mortality in second instar *Spodoptera exigua* infected with polyhedral occlusion bodies and virions of NPV treatments which were compared with the control (distilled water)

	Treatments	Dosage	Total larvae	Total dead larvae after post infection (3 rep.)				
				1	3	7	10	percentage of
			per treatment	day	days	days	days	dead larvae
T1	Virions of SeMNPV by cells culture	1:10	30	-	2	3	4	13.33
T2	Occlusion bodies of SeMNPV by cells culture	$1x10^5$ OBs/ml	30	-	2	14	16	53.33
T3	Occlusion bodies of SeMNPV by larvae	$1x10^5$ OBs/ml	30	-	2	10	14	46.67
T4	Virions of HaSNPV	1:10	30	-	2	10	13	43.33
T5	Virions of HaSNPV infected Sf cells culture	1:10	30	-	2	2	5	16.67
T6	Occlusion bodies of SlNPV by larvae	$1x10^5$ OBs/ml	30	-	1	2	3	10.00
T7	Occlusion bodies of TnNPV by larvae	$1x10^5$ OBs/ml	30	-	2	8	10	33.33
T8	Control(distilled water)	30 µl/larvae	30	-	-	-	-	-

กรมวิชาการเกษตร

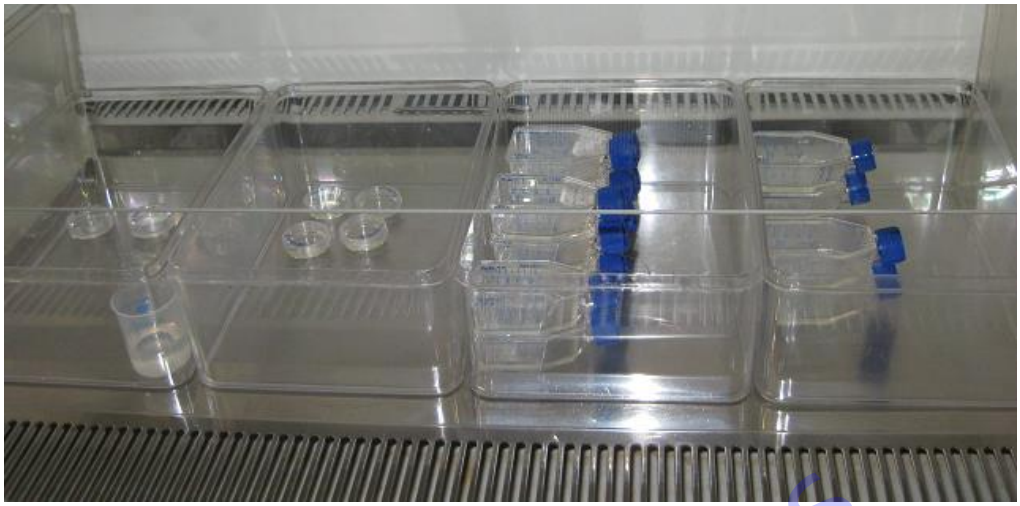

Fig 1. Establishment and maintenance insect cells lines stock at 27°C

Fig 2. NPV virions stock for cells line infection at -20°C

กรมวิชาการเกษตร

9. สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ยังคงใช้ได้ดีสามารถเลี้ยงได้ดี ผลการทดสอบประสิทธิภาพไวรัสในรูปแบบมีโปรตีนหุ้ม (Occlusion bodies) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง กับไม่มีโปรตีนหุ้ม (Virions) ที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง สามารถทำให้หนอนตายได้ ก็จะสามารถนำไปขยายผลได้ อย่างไรก็ตามต้องทำการตรวจวิเคราะห์ไวรัสที่ได้ เพื่อเป็นการยืนยันสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดความเฉพาะต่อชนิดหนอนต่อไป แต่ด้วยการทดลองนี้มีข้อจำกัดในการดำเนินการหลายส่วน เช่น ต้นแบบหนอนตัวอย่างแมลงมีพาหะโรคโปรโตซัว และต้องใช้โรงเรือนปลูกพืชอาหารสดในการเลี้ยงหนอนใยผัก และ หนอนคืบกะหล่ำ ทำให้ยังไม่ได้ไม่ครบทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะหนอนใยผักที่เป็นตัวอย่างหลักทำให้ดำเนินการไม่ทันรอบของในการทดสอบการคัดเลือกอนุภาคไวรัสในเซลล์หนอนใยผักเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่น ซึ่งต้องทั้งเพาะเลี้ยงเซลล์อย่างต่อเนื่อง และเพื่อรักษาสายพันธุ์ต้นแบบเดิมตลอดปี ทำให้ต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอีก ในขณะที่ปัจจัยการดำเนินงานอื่นๆลดลงไม่สอดคล้องกัน ทำให้ต้องมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลการเกิดโรคไวรัส เอ็นพีวี ระดับอนุภาคไวรัส ที่จะสามารถนำไปขยายผลได้ในกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจได้หลากหลายและนำไปใช้ได้อย่างปลอดภัย

11. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นางธนิตา ค่ำอำนวย นางสาวศิริพร สอนท่าโก และ เจ้าหน้าที่ ของ กลุ่มงานวิจัยวัตถุมีพิษการเกษตรจากสารธรรมชาติ กองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตร ที่ช่วยอนุเคราะห์ตัวอย่างหนอนใยผัก และ หนอนคืบกระหล่ำปลี จากแปลงพืชอินทรีย์มาใช้ในการทดลองครั้งนี้

12. เอกสารอ้างอิง

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข สาทิพย์ มาลี และ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsids Nucleopolyhedrosisvirus (SeMNPV) จากเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*) ใน เอกสารการประชุม ผลงานวิจัยดีเด่น ประจำปี 2550 การประชุมวิชาการ ประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. 16-18 มิถุนายน, โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และ นางวัชรี สมสุข. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206 ในเอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ“เทคโนโลยีการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม” ครั้งที่ 13 ประจำปี 2545 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 6-9 สิงหาคม, โรงแรมโกลเด้นแซนด์ อำเภอชะอำ จังหวัดเพชรบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกะหล่ำปลี. หน้า 73-78. ใน เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5. วันที่ 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว, กาญจนบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ วัชรี สมสุข 2552. การตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย PCR-Based Typing. วารสารกรมวิชาการเกษตร ปีที่ 27 ฉบับที่ 3 (กันยายน-ธันวาคม) : 234-243.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ“แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12 ประจำปี 2543 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม, โรงแรม อมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จ.ชลบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต. 2550. การผลิตไวรัสจาก cell culture. น.105-117. ใน เอกสารประกอบการอบรม “แมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด” ครั้งที่ 13. วันที่ 4-8 มิถุนายน 2550. กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ที่ โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร

Crook, N.E.; Kadir, H.B.A.; Payne, C.C.; Winstanley, D. 1999. Characterization and Cross-transmission of Baculoviruses Infectious to the Diamondback Moth, *Plutella xylostella*, and some other Lepidopteran Pests of Brassica Crops. Biocontrol Science and Technology. 9 : 227-238.

Entwisetle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, p.186-201. In Insect viruses and pest management. Frances R. Hunter-Fujita, Philip F. Entewistle, Hugh F. Evans and Norman E. Crook. (eds). John Wiley & Sons Ltd, England. 620 p.

Farrar RR Jr, Ridway RL. 1999. Relative potency of selected nuclear polyhedrosis viruses against five species of Lepidoptera. J. of Agricultural and Urban Entomol. 16 : 187-196.

Idris, A.B. and Grafius, E.J. 1993. Field studies on the effect of pesticides on the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) and parasitism by *Diadegma insulare* (Cresson) (Hymenoptera: Ichneumonidae). J. Econ. Entomol., 86: 1196– 1202.

Idris, A.B., Norazlin, M.A. and Hussan, A.K. 2006. Does host size and virus sources influence the production of polyhedra inclusion body (PIB) by the Nuclear polyhedrosis viruses (NPV) of *Plutella xylostella* (PxNPV) and *Spodoptera exigua* (SeNPV). Malays. Appl. Biol. 35: 63-66.

Kadir H.B.A., Payne C.C., Crook N.E., Fenlon J.S., Winstanley D. 1999b. The comparative susceptibility of the diamondback moth, Plutella xylostella and some other major lepidoptern pests of Brassica crops to a range of baculoviruses. Biocontrol Science and Technology 9 : 421-433.

Kariuki C.W, McIntosh A.H. 1999. Infectivity studies of a new baculovirus isolate for the control of the diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). J. of Economic Entomol. 92 : 1093-1098.

Petcharawan, O., Mongkolpoch, K. and Belloncik, S. 2006. Establishment of cell line derived from embryonic tissue of the Diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). KMITL Sci. Tech. J. Vol. 6 : 56-66.

Sarfraz, M., Keddie, A.B. and Dosdall, L., 2005. Biological control of the diamondback moth, *Plutella xylostella*: A review. Biocontrol Science and Technology, 15 : 763-789.

Shelton, A.M. and Talekar. N.S. 1993. Biology,ecology, and management of the diamondback moth. Ann. Rev. Entomol., 38: 275–301.

Tabashnik, B.E., J.M. Schwartz, N. Finson and M.W. Johnson. 1992. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., 85: 1046–1055.

Wongwilikhit, S., K. Ukoskit, M. Mingmuang, A. Thongpan and V. SomSook. 2008. A rapid detection and identification of Thai Nucleopolyhedrovirus using PCR-based typing. *In* International seminar : Bio Agricultural Input for Sustainable Agriculture Prospects and Challenges. July 1-2, Medan, Indonesia

กรมวิชาการเกษตร