พัฒนาการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นปริมาณมาก

Development of *Spodoptera exigua* Multiple-Nucleocapsids Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) Mass Production from Cell Culture

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต สาทิพย์ มาลี อัมพร วินโนทัย

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

พัฒนาการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นปริมาณมาก ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง เดือนตุลาคม 2551 ถึง เดือนกันยายน 2553 ประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอม โดยใช้เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ไทยต้นแบบ ที่มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ 90.91 % ทำการทดลองผลิตขยายเซลล์เป็นปริมาณมาก ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น 5×10^{5} เซลล์/มล. ในเครื่อง cell spin ปริมาตร 250 มล. และ 500 มล. อัตราการ sub-culture 1:5 พบว่า ตรวจนับจำนวนเซลล์เฉลี่ยได้ อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.07 และ 5.03 เท่า ภายใน 4 วัน และเมื่อใส่อนุภาคไวรัส 7 วัน ตรวจนับจำนวนผลึกไวรัสได้เฉลี่ย 3.60×10^{7} ผลึก/มล. และ 3.52×10^{7} ผลึก/มล. ตามลำดับ

คำหลัก : เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง หนอนกระทู้หอม การผลิต Insect, cell line, cell culture, Nucleopolyhedrovirus, SeMNPV, *Spodoptera exigua*

คำนำ

การใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลงเป็นสารชีวินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น บางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า เนื่องจากควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีและมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้ไวรัสมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง (Entwistle,

---

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-04-02-02-51

1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510 มีรายงานการศึกษาวิจัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus (NPV) หรือชื่อเดิม Nuclear polyhedrosis viruses (อุทัย, 2544) โดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตขยายและการใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด

Spodoptera exigua Multiple-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) เป็นปริมาณมากในรูปแบบการผลิต แบบ *in vivo* คือ ผลิตจากหนอนแมลง เนื่องจาก ไวรัสจะสามารถเจริญขยายเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น การผลิตไวรัสจึงสามารถผลิตขยายได้ 2 รูปแบบ คือ การผลิตจากหนอนแมลง เรียกว่าแบบ *in vivo* และ ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง เรียกว่า แบบ *in vitro* (สุชลวัจน์, 2545; Wongwilikhit and Somsuk, 2006) ปัญหาที่พบในการผลิตไวรัส SeMNPV ที่ใช้รูปแบบการผลิต แบบ *in vivo* คือ 1.) อัตราการผลิตไวรัสแต่ละรุ่น/ชนิดไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเลี้ยงหนอนไม่ได้ตามกำหนดเวลาที่ต้องการใช้แต่ละรุ่น 2.) ประสิทธิภาพไม่แน่นอน มีกลิ่นเหม็น เนื่องจากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว รา ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคแมลงหรือแม้แต่ไวรัสที่ต่างชนิดกัน และผลิตภัณฑ์ไวรัสไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสรีระวิทยา 3.) ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่มีจำหน่ายทุกวันนี้ ยังไม่สามารถกำหนดมาตรฐานในการขึ้นทะเบียนสารชีวินทรีย์ตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ เพียงแต่ให้ใช้แบบไม่มีการขึ้นทะเบียนฯเท่านั้น 5.) การใช้สถานที่และแรงงานในการปฏิบัติงานมาก ซึ่งทำให้มีต้นทุนสูง และทำให้มีข้อจำกัดในกระบวนการผลิตขยายในปริมาณมาก (อุทัยและคณะ, 2537)

ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นของการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* จึงทำการทดลองวิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง หรือที่เรียกว่า การผลิตแบบ *in vitro* โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช จาก United Stated Department of Agriculture (USDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุชลวัจน์, 2539; สุชลวัจน์และคณะ, 2543; Lynn and Shapiro, 1998) มาใช้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมสายพันธุ์ไทย (Se cell line : *Spodoptera exigua* cell line) จาก Embryonic stem cell ซึ่งหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* Hübner) จัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญสามารถพบในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หน่อไม้ฝรั่ง ผักคะน้า ผักตระกูลกะหล่ำ บรอคเคอรี่ หอมแดง ถั่วฝักยาว กระเจี๊ยบเขียว มะเขือเทศ องุ่น ดาวเรือง เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ผลิตขยายไวรัส SeMNPV ที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายเป็นปริมาณมาก สามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* ได้อย่างสิ้นเชิง และทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีคุณภาพมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ ในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี สอดคล้องกับแนวทางการผลิตพืชให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการพัฒนาที่ยั่งยืน

ตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554)

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดลองวิจัย 2 การทดลอง ได้แก่ 1.) ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง 2.) ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส SeMNPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง

การทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงขยายเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง จากสต๊อค ตามเทคนิควิธีการของ สุชล วัจน์ (2545) ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 – 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 $^{\circ}$C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซีส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 อัตราการเลี้ยงขยายเซลล์ (sub-culture) 1:5 ในภาชนะ แบบ cell spin flask ขนาดจุ 500 มล. และ 1,000 มล. ทำการ sub-culture 3-4 วัน/ครั้ง คัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80% เพื่อให้ได้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5 เท่า ภายใน 4 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) จำนวน 2 ซ้ำ เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในแต่ละภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ โดยคำนวณจากค่าร้อยละของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ แล้วคัดเลือก Se-cell line ไปใช้ในการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส SeMNPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง

นำเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ข้างต้น มาเลี้ยงขยายในภาชนะ แบบ T-flask ใช้เซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 – 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัสในเซลล์หนอน กระทู้หอมเพาะเลี้ยง หลังจาก sub-culture 4 วัน และเพาะอนุภาคไวรัส (infection) จากเลือดหนอนกระทู้หอม ในเซลล์เพาะเลี้ยง อนุภาคไวรัสที่ใช้มีค่า Multiplicity of infection (MOI) ที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. จำนวน 2 ซ้ำต่ออัตราอนุภาคไวรัส หลังจากนั้น ตรวจดูการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ ตรวจนับจำนวนผลึกไวรัสที่ได้ด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ คัดเลือกอัตราอนุภาคไวรัสที่ดีที่สุดในการทดลองข้างต้นนำมาใช้ผลิตขยายแบบต่อเนื่องจำนวน 3 รอบการผลิต โดยทำการปั่นแยกอนุภาคไวรัสจากผลผลิตไวรัสจาก

เซลล์เพาะเลี้ยง ปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000*g* นาน 8 นาที มาใช้เพาะเลี้ยงอนุภาคไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงในรอบการผลิตถัดไป รอบที่ 1 และ 2 ในภาชนะ แบบ cell spin flask (ปริมาตร 500 – 1,000 มล./ขวด)

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุด เดือนกันยายน 2553 ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองการพัฒนาการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นปริมาณมาก จำนวน 2 การทดลอง ได้แก่ 1.) ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง 2.) ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส SeMNPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง มีดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอม โดยใช้เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ไทยต้นแบบ ที่มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ 90.91 % ทำการทดลองผลิตขยายเซลล์เป็นปริมาณมาก ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น 5×10^5 เซลล์/มล. ในเครื่อง cell spin ปริมาตร 250 มล. และ 500 มล. อัตราการ sub-culture 1:5 พบว่าตรวจนับจำนวนเซลล์เฉลี่ยได้ อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.07 และ 5.03 เท่าภายใน 4 วัน เช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน ภาชนะเลี้ยง T-flask ขนาดพื้นที่การเจริญ 25 ตร.ซม. และ E-flask ขนาดจุ 125 มล. ที่มีอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.54 (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) จึงนำไปใช้ผลิตขยายอนุภาคไวรัส เพื่อใช้ในการติดเชื้อ ในการทดลองผลิตขยายไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงในเครื่อง cell spin ในการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 2 ทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส SeMNPV ในเซลล์เพาะเลี้ยง

จากการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส SeMNPV ในเครื่อง cell spin โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงต้นแบบชนิด Se-cell line ที่มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ 90.91 % และขนาดปริมาตร 250 มล.และ 500 มล. หลังจากใส่อนุภาคไวรัส 7 วัน ตรวจนับจำนวนผลึกไวรัสได้เฉลี่ย 3.60×10^7 ผลึก/มล. และ 3.52×10^7 ผลึก/มล. ตามลำดับ ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ การทดลองทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส ในภาชนะเลี้ยง T-flask

ขนาดพื้นที่การเจริญ 25 ตร.ซม. และ E-flask ขนาดจุ 125 มล. ทดลองผลิตขยายไวรัสจากเซลล์ที่อัตราความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 1×10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เก็บเกี่ยวผลึกไวรัส รุ่นที่ 1-3 นับผลึกไวรัสเฉลี่ยได้ เท่ากับ 3.12×10^7, 3.84×10^7 และ 4.95×10^7 ผลึก/มล. ตามลำดับหลัง infected อนุภาคไวรัส 7 วัน (สุชลวัจน์และคณะ, 2551)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตไวรัส SeMNPV ควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นปริมาณมาก จากผลการทดลองสามารถสรุป ข้อมูลผลงานวิจัยวิธีการผลิตขยายไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงในเครื่อง cell spin นี้สามารถนำไปประยุกต์ต่อยอด เพื่อเป็นต้นแบบที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายมาตรฐาน ที่สามารถนำไปจดสิทธิบัตร เพื่อเป็นประโยชน์ของกรมวิชาการเกษตรได้ นอกจากนี้

กล่าวคือทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีคุณภาพมาตรฐานความปลอดภัย ทางชีวภาพสอดคล้องกับแนวทางการผลิตพืชให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการพัฒนาที่ยั่งยืนตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2530. เอกสารวิชาการ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต 2545. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช เอกสารประกอบการบรรยายเชิงปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. *ใน* เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมอมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี.

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

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และ วัชรี สมสุข.. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206. *ใน* เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ "เทคโนโลยีการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม" ครั้งที่ 13. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . 6-9 สิงหาคม 2545. ณ โรงแรม โกลเด้นแซนด์ จังหวัดเพชรบุรี.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และ สาทิพย์ มาลี. 2548. การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV. รายงานผลงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข สาทิพย์ มาลี และ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง *(in vitro)*. น. 1-11. *ใน* เอกสารผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2550. การประชุมวิชาการประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 16-18 มิถุนายน 2551. ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

สุดาวรรณ เชยชมศรี. 2542. เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์. น. 72-82. *ใน* เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืชในศตวรรษที่ 21. จัดโดย สมาคม กีฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 15-16 กรกฎาคม 2542. ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชดก สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิตและทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. น. 457-486. *ใน* เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนาวิชาการ"แมลงและสัตว์ศัตรูพืช" ครั้งที่ 9 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

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

Entwisetle, P.F. 1998. A world survey of virus control of insect pests, pp. 186-201. *In* Insect viruses and pest management. Eds. F.R. Hunter-Fujita, P.F. Entewistle, H.F. Evans and N. E. Crook.