

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

สุชลวัจน ว่องไวลิขิต สาทิพย์ มาลี อัมพร วิโนทัย
 กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

พัฒนาการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นปริมาณมาก ณ ห้องปฏิบัติการ
 กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรม
 วิชาการเกษตร ระหว่าง เดือนตุลาคม 2551 ถึง เดือนกันยายน 2553 ประสิทธิภาพการเจริญของ
 เซลล์หนอนกระทู้หอม โดยใช้เซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ไทยต้นแบบ ที่มีค่าร้อยละ
 การเจริญของเซลล์ 90.91 % ทำการทดลองผลิตขยายเซลล์เป็นปริมาณมาก ความเข้มข้น
 ของเซลล์ตั้งต้น 5×10^5 เซลล์/มล. ในเครื่อง cell spin ปริมาตร 250 มล. และ 500 มล.
 อัตราการ sub-culture 1:5 พบว่า ตรวจนับจำนวนเซลล์เฉลี่ยได้ อัตราการเจริญของเซลล์
 เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.07 และ 5.03 เท่า ภายใน 4 วัน และเมื่อใส่อนุภาคไวรัส 7 วัน ตรวจนับจำนวน
 ผลิตไวรัสได้เฉลี่ย 3.60×10^7 ผลิต/มล. และ 3.52×10^7 ผลิต/มล. ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ
 ไวรัสต่อจากรุ่น 3 (เก็บที่ -20°C) ยังสามารถสร้างผลิตไวรัสเฉลี่ยได้ 4.89×10^7 ผลิต/มล.
 หลัง infection 7 วัน

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

คำนำ

การใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลงเป็นสารชีววินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น บางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า เนื่องจากควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีและมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้ไวรัสมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง (Entwistle, 1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510 มีรายงานการศึกษาวินิจฉัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus (NPV) หรือชื่อเดิม Nuclear polyhedrosis viruses (อุทัย, 2544) โดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตขยายและการใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) เป็นปริมาณมากในรูปแบบการผลิตแบบ *in vivo* คือ ผลิตจากหนอนแมลง เนื่องจากไวรัสจะสามารถเจริญขยายเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น การผลิตไวรัสจึงสามารถผลิตขยายได้ 2 รูปแบบ คือ การผลิตจากหนอนแมลง เรียกว่าแบบ *in vivo* และ ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง เรียกว่า แบบ *in vitro* (สุชลวัจน, 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 และผลิตภัณฑ์ไวรัสไม่สามารถจำหน่ายได้ด้วยลักษณะทางสรีระวิทยา 3.) ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่มีจำหน่ายทุกวันนี้ ยังไม่สามารถกำหนดมาตรฐานในการขึ้นทะเบียนสารชีววินทรีย์ตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ เพียงแต่ให้ใช้แบบไม่มีการขึ้นทะเบียนเท่านั้น 5.) การใช้สถานที่และแรงงานในการปฏิบัติงานมาก ซึ่งทำให้มีต้นทุนสูง และทำให้มีข้อจำกัดในกระบวนการผลิตขยายในปริมาณมาก (อุทัยและคณะ, 2537)

ดังนั้น เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นของการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* จึงทำการทดลองวิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง หรือที่เรียกว่า การผลิตแบบ *in vitro* โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช จาก United States Department of Agriculture (USDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุชลวัจน, 2539; สุชลวัจนและคณะ, 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 บรอกเคอรี่ หอมแดง ถั่วฝักยาว กระเจี๊ยบเขียว มะเขือเทศ องุ่น ดาวเรือง เป็นต้น ซึ่งผลการทดลองวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้ผลิตขยายไวรัส SeMNPV ที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายเป็นปริมาณมาก สามารถแก้ปัญหที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* ได้อย่างสิ้นเชิง

และทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีคุณภาพมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ ในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี สอดคล้องกับแนวทางการผลิตพืชให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการพัฒนาที่ยั่งยืนตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554)

วิธีดำเนินการ

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

การทดลองที่ 1 ทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง

เพาะเลี้ยงขยายเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง จากสต็อก ตามเทคนิควิธีการของ สุขลวัญ (2545) ความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27°C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซิส 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% เพื่อให้ได้ อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5 เท่า ภายใน 4 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) จำนวน 2 ซ้ำ เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในแต่ละภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์ 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. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัสในเซลล์หนอนกระทู้หอมเพาะเลี้ยง 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 ตรวจสอบการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ ตรวจสอบ

จำนวนผลึกไวรัสที่ได้ด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ คัดเลือกอัตราอนุภาคไวรัสที่ดีที่สุดในการทดลองข้างต้นนำมาใช้ผลิตขยายแบบต่อเนื่องจำนวน 3 รอบการผลิต โดยทำการปั่นแยกอนุภาคไวรัสจากผลผลิตไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000g 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 เท่า ภายใน 4 วัน เช่นเดียวกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ใน ภาชนะเลี้ยง T-flask ขนาดพื้นที่การเจริญ 25 ตร.ซม. และ E-flask ขนาดจุ 125 มล. ที่มีอัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นเฉลี่ย 5.54 เท่า (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 ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับการทดลองทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัส 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. ตามลำดับ หลัง infected อนุภาคไวรัส 7 วัน (สุชลวัจน์และคณะ, 2551) ทำการทดลองเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง ใน ภาชนะเลี้ยง cells spin flask ปริมาตร 250 มล. ใช้อัตราความเข้มข้นเซลล์เท่ากัน และใช้อนุภาคไวรัสต่อจากรุ่น 3 (เก็บที่ -20°C) ได้ผลึกไวรัสเฉลี่ย 4.89×10^7 ผลึก/มล. หลัง infection 7 วัน และปั่นกรองแยกอนุภาคไวรัส เก็บรักษาไว้ที่ -20°C เป็นต้นแบบ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตไวรัส SeMNPV ควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นปริมาณมาก จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ข้อมูลผลงานวิจัยวิธีการผลิตขยายไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงในเครื่อง cell spin นี้สามารถนำไปประยุกต์ต่อยอด เพื่อเป็นต้นแบบที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายมาตรฐาน ที่สามารถนำไปจดสิทธิบัตร เพื่อเป็นประโยชน์ของกรมวิชาการเกษตรได้ นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์ไวรัสมีคุณภาพมาตรฐานความปลอดภัย ทางชีวภาพสอดคล้องกับแนวทางการผลิตพืชให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อม เพื่อยกระดับคุณภาพชีวิตและการพัฒนาที่ยั่งยืนตามยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ

- ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2530. เอกสารวิชาการ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- สุขลวีจน์ ว่องไวลิขิต 2545. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช เอกสารประกอบการบรรยายเชิงปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ.
- สุขลวีจน์ ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุญาติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หอนกระทุ้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมอมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี.
- สุขลวีจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหอนคืบกะหล่ำปลี. น. 73-78. ใน เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ. ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จ.กาญจนบุรี.
- สุขลวีจน์ ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และ วัชรี สมสุข.. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หอนกระทุ้ฝักสายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม” ครั้งที่ 13. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . 6-9 สิงหาคม 2545. ณ โรงแรม โกลด์ตันแลนด์ จังหวัดเพชรบุรี.
- สุขลวีจน์ ว่องไวลิขิต วัชรี สมสุข เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และ สาทิพย์ มาลี. 2548. การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV. รายงานผลงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

- สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต วัชรีย์ 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 เขยชมศรี. 2542. เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์. น. 72-82. ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารซีวินทรีย์กำจัดศัตรูพืช ในศตวรรษที่ 21. จัดโดย สมาคม กิฏและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 15-16 กรกฎาคม 2542. ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.
- อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชคก สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิตและทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. น. 457-486. ใน เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนาวิชาการ”แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 9 กองกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกสิกรรมและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. พิมพ์ที่โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.
- Entwistle, 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. Entwistle, H.F. Evans and N. E. Crook.