



วิทยานิพนธ์

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ PCR-Based Typing

Morphological and PCR-Based Typing Identification of
Nucleopolyhedrovirus

นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๑



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร)

ปริญญา

พัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร

พัฒนาผลิตภัณฑ์

สาขา

ภาควิชา

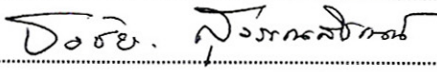
เรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพทางเคมี กายภาพ ลักษณะทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนา และความชอบของข้าวพันธุ์ต่างๆที่หุงต้มด้วยวิธีการต่างกัน


Relationship among Chemical, Physical, Descriptive Sensory Qualities and Preference of different Rice Varieties with different Cooking Methods

นามผู้วิจัย นางสาวสิริกัญจน์ เกียรติชนะไพบูลย์

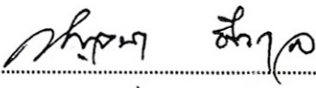
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก 
(รองศาสตราจารย์จันทนา อุปดิศกุล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม 
(รองศาสตราจารย์ธงชัย สุวรรณสีชนัน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา 
(รองศาสตราจารย์อนันต์ แฉ่งชัด, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว


(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 5 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ PCR-Based Typing

Morphological and PCR-Based Typing Identification of
Nucleopolyhedrovirus

โดย

นางสาวสุชลวัญ ว่องไวลิขิต

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยาของเซลล์และโมเลกุล)

พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. มิ่งขวัญ มิ่งเมือง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อมรา ทองปาน กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และ อาจารย์ วัชรีย์ สมสุข กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.นิത്യศรี แสงเดือน ผู้แทนบัณฑิต ที่ให้ความกรุณาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2547 จาก บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ปฏิบัติการ วัสดุ อุปกรณ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัด ปทุมธานี ตลอดจนให้คำแนะนำด้านเทคนิคการทดลองวิจัยการสกัดดีเอ็นเอ ไวรัส NPV และ การใช้เทคนิค AFLP ขอขอบคุณ คุณกัลยารัตน์ ภูสุตแสง ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำเทคนิคการปฏิบัติการพื้นฐานต่างๆ ขอขอบคุณ คุณวิชัย ลิ่นทอง ศูนย์สังเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ ที่ช่วยเหลือในการทดลองวิจัยด้านกล้องอิเล็กตรอน และ ขอขอบคุณ พี่น้อง ทุกคน ในภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำเทคนิคปฏิบัติการพื้นฐานต่างๆ ตลอดจนให้กำลังใจจนกระทั่งการทดลองสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว และ พี่ชาย ผู้เป็นที่เคารพรักยิ่ง และคอยช่วยเหลือสนับสนุนให้กำลังใจอย่างอบอุ่น ทำให้เกิดแรงบันดาลใจจนประสบผลสำเร็จ

สุชลวัฒน์ ว่องไวลิขิต

พฤษภาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	30
สรุปและข้อเสนอแนะ	51
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	54
ภาคผนวก	62

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบ PCR master mix (4x) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP	27
2	โปรแกรม PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP	28
3	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกไวรัส เมื่อวัดด้วยเครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ sysmex SD-2000	30
4	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกไวรัสโรคแมลง ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
1 การจัดทำแผนกไวรัสโรคของสัตว์จำพวก arthropods	63
2 ลำดับเบสของยีน chitinase, polyhedrin และ cathepsin ที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank ใน http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	65
3 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank ใน http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	66
4 ค่า melting temperature (Tm) และปริมาณเบส G และ C ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR- Based typing	73
5 ค่า melting temperature (Tm) และปริมาณเบส G และ C ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค AFLP	74
6 สรุปลักษณะของซันดิเอ็นเอไวรัสที่จะได้จากไพรเมอร์ <i>EcoRI</i> แบบต่างๆ ที่มีการเพิ่มเบสโดยวิเคราะห์จาก โปรแกรมคอมพิวเตอร์ http://www.bioinformatics.vg/sms/ และใช้จีโนมของไวรัสใน www.ncbi.co.th เพื่อประเมินก่อนปฏิบัติงานจริง	75
7 สรุปลักษณะของซันดิเอ็นเอไวรัสที่จะได้จากไพรเมอร์ <i>MseI</i> แบบต่างๆ ที่มีการเพิ่มเบสโดยวิเคราะห์จาก โปรแกรมคอมพิวเตอร์ http://www.bioinformatics.vg/sms/ และใช้จีโนมของไวรัสใน www.ncbi.co.th เพื่อประเมินก่อนปฏิบัติงานจริง	76

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เปรียบเทียบลักษณะผลึกไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light compound microscope) โดยใช้ระบบ phase contrast (a) และ ลักษณะผลึกไวรัสติดสีฟ้าของสี Giemsa (b) กำลังขยาย 1,000 x	31
2	ปริมาณผลึกแต่ละขนาดของผลึกไวรัสโรคแมลง ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV จากจำนวนผลึก 40 ผลึก/ชนิด	34
3	ลักษณะผลึกไวรัสชนิด HaSNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายขนาดอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8000x (c)	36
4	ลักษณะผลึกไวรัสชนิด SeMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายขนาดอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8000x (c)	37
5	ลักษณะผลึกไวรัส ชนิด SIMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายส่วนอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8000x (c)	38
6	ลักษณะผลึกไวรัส ชนิด TnMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบลำแสงส่องผ่าน (a) ภาพขยายส่วนอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบ ลำแสงส่องกราด 8000x (c)	39
7	ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแบบไม่ละลายผลึกไวรัสด้วย 1 M Na ₂ CO ₃ ก่อนเติม 0.5 M EDTA และ 1 M NaCl (a) และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแบบละลายผลึกไวรัสด้วย 1 M Na ₂ CO ₃ ก่อนเติม 0.5 M EDTA และ 1 M NaCl (b) (M1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 µg, M2 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV)	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	<p>ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV SeMNPV SIMNPV TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% ออกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค PCR – base typing เปรียบเทียบไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุด ที่ออกแบบจากยีน 3 ยีน คือ ไพรเมอร์ ชุดที่ 1. chitinase forward primer & chitinase reverse primer ไพรเมอร์ ชุดที่ 2. polyhedrin forward primer I & polyhedrin reverse primer I ไพรเมอร์ ชุดที่ 3. cathepsin forward primer & cathepsin reverse primer และ ไพรเมอร์ ชุดที่ 4. polyhedrin forward primer II & polyhedrin reverse primer II (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV)</p>	42
9	<p>ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% ออกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรเมอร์แต่ละคู่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. <i>EcoRI</i>-A และ <i>MseI</i>-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. <i>EcoRI</i>-AA และ <i>MseI</i>-C ไพรเมอร์ชุดที่ 3. <i>EcoRI</i>-AA และ <i>MseI</i>-CG ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 1 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)</p>	44
10	<p>ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% ออกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรเมอร์แต่ละคู่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. <i>EcoRI</i>-A และ <i>MseI</i>-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. <i>EcoRI</i>-AA และ <i>MseI</i>-C ไพรเมอร์ชุดที่ 3. <i>EcoRI</i>-AA และ <i>MseI</i>-CG ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 2 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)</p>	46
11	<p>ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% ออกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรเมอร์แต่ละคู่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. <i>EcoRI</i>-A และ <i>MseI</i>-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. <i>EcoRI</i>-AA และ <i>MseI</i>-C และ ไพรเมอร์ชุดที่ 3. <i>EcoRI</i>-AA และ primer <i>MseI</i>-CG ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 3 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)</p>	48

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
1 ลักษณะหนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และ หนอนคืบกะหล่ำ ตายด้วยไวรัส NPV	78
2 วัฏจักรชีวิตของหนอนเจาะสมอฝ้าย ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย	79
3 วัฏจักรชีวิตของหนอนกระทู้หอม ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย	80
4 วัฏจักรชีวิตของหนอนกระทู้ผัก ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย	81
5 วัฏจักรชีวิตของหนอนคืบกะหล่ำ ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย	82
6 ลักษณะโครงสร้างไวรัสแบบ single - nucleocapsid NPV (SNPV) และ multiple- nucleocapsid NPV (MNPV)	83

การตรวจวิเคราะห์ชนิดของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ด้วย
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ PCR-Based Typing

Morphological and PCR-Based Typing Identification of
Nucleopolyhedrovirus

คำนำ

ไวรัสในสกุล Nucleopolyhedrovirus (NPV) จัดเป็นสารชีวอินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช (biopesticide) ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงชนิดหนึ่งที่ได้รับการยอมรับ เนื่องจาก มีประสิทธิภาพที่ทำให้แมลงศัตรูพืชตายอย่างเฉพาะเจาะจงต่อชนิดแมลง เกษตรกรสามารถผลิตพีชที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และ ไม่มีสารพิษตกค้าง ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ในประเทศไทยมีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับไวรัสในสกุล Nucleopolyhedrovirus เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส NPV โรคของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* single - nucleocapsid NPV : HaSNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* multiple - nucleocapsid NPV : SeMNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก (*S. litura* multiple - nucleocapsid NPV : SIMNPV) และไวรัส NPV ของหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* multiple - nucleocapsid NPV : TnMNPV) และมีการนำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่องานวิจัยและใช้เป็นผลิตภัณฑ์สารชีวอินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งจะต้องมีการตรวจวิเคราะห์จำแนกไวรัสแต่ละชนิดเพื่อกำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของสารชีวอินทรีย์

การตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดไวรัสด้วยเทคนิคการศึกษาด้านสัณฐานวิทยา ลักษณะอาการของโรคในแมลง ชนิดของแมลงอาศัย (host) ต้องใช้เวลานานในการตรวจวิเคราะห์ มากกว่า 15 วัน และผลการตรวจวิเคราะห์แบบนี้ไม่สามารถบ่งชี้ระดับชนิด จำเป็นต้องมีการตรวจวิเคราะห์ระดับดีเอ็นเอ ซึ่งดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่สำคัญแสดงถึงลักษณะจำเพาะของสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์นั้นๆ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อม และเป็นข้อมูลน่าเชื่อถือในการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิด เพื่อใช้กำหนดมาตรฐานความปลอดภัยของสารชีวอินทรีย์

ดังนั้น การตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus โรคของแมลง

ศัตรูพืชด้วยเทคนิค PCR – based typing โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอจาก ยีน (gene) ซึ่งออกแบบไพรเมอร์จากยีนหลายยีน แล้วนำมาเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) แล้ววิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และการวิเคราะห์ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอจากจีโนม (genome) ด้วยวิธี amplified fragment length polymorphism (AFLP) ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด แล้วเชื่อมต่อกับ adapter และใช้ไพรเมอร์คัดเลือก เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่นกัน ซึ่งจะสามารถบ่งบอกความแตกต่างชนิดของไวรัส ทำให้จำแนกชนิดของไวรัสได้อย่าง ถูกต้องและรวดเร็วยิ่งขึ้น นั่นคือการได้เครื่องหมายข้อมูลทางพันธุกรรมที่จะเป็นประโยชน์ในการ ใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานวิธีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของไวรัสโรคของ แมลงศัตรูพืช และจุลินทรีย์โรคแมลงอื่นๆ เพื่อให้สอดคล้องกับขอบเขตและสาระมาตรฐานสารชีว ภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืช ของสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ(มกอช.) ที่จะ เป็น มาตรการควบคุมคุณภาพสินค้าเกษตรและความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมไปถึงการ เพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรให้ได้มาตรฐานความปลอดภัยสากลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะ โครงสร้างทางพันธุกรรมของ ไวรัสโรคแมลง สกุด Nucleopolyhedrovirus ที่พบในประเทศไทย 4 ชนิด ได้แก่ HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV
2. เพื่อศึกษาลักษณะพันธุกรรมของไวรัสสกุด Nucleopolyhedrovirus ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR-based typing และ เทคนิค AFLP
3. เพื่อหาชุดไพรเมอร์ที่จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดของไวรัสสกุด Nucleopolyhedrovirus ทั้ง 4 ชนิด

การตรวจเอกสาร

ไวรัสโรคของแมลง สกกุล Nucleopolyhedrovirus (NPV)

ไวรัสโรคของแมลงสกกุล Nucleopolyhedrovirus หรือชื่อเดิม nuclear polyhedrosis virus (NPV) จัดอยู่ใน Family Baculoviridae (ตารางผนวกที่ 1) ผลึกไวรัสถูกค้นพบเป็นชนิดแรก คือ ไวรัสที่ทำให้เกิดโรค jaundice หรือ grasserie ในหนอนไหม ปัจจุบันมีรายงานการสำรวจพบมากกว่า 300 ชนิด จากแมลงใน Order Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Neuroptera, Coleoptera และ Trichoptera (ทิพย์วดี, 2535; Miller, 1996) มีการวิจัยนำไวรัสสกกุล NPV มาใช้เป็นสารชีววินทรีย์ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีได้ดี และมีรายงานการใช้มากที่สุดในวงศ์ไวรัสทั้งหมด (Lynn, 2003) ซึ่งในประเทศไทยมีการศึกษาวิจัยไวรัสโรคของแมลงเพื่อนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารชีววินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชเช่นกัน

ลักษณะอาการของโรคทั่วไปของไวรัส NPV โรคของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid NPV : HaSNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* multiple-nucleocapsid NPV : SeMNPV) ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก (*S. litura* multiple-nucleocapsid NPV : SIMNPV) และไวรัส NPV ของหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* multiple-nucleocapsid NPV : TnMNPV) คือ เมื่อหนอนแมลงอาศัยของไวรัสกินอาหารที่มีไวรัสปนเปื้อนเข้าไป จากนั้นจะหยุดกินอาหารภายใน 2-4 วัน มีลักษณะลำตัววม มีสีซีดกว่าปกติ ไม่ค่อยเคลื่อนไหว หรือ เชื่องช้า ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้าภายนอก ก่อนตายเพียงเล็กน้อยจะไต่ขึ้นที่สูง เช่น ส่วนยอดของต้นพืช ฝักภาชนะเลี้ยงแล้วตายในลักษณะที่เกาะด้วยขาเทียมห้อยส่วนหัวลงมากลายรูปตัววีหัวกลับ สีของลำตัวจะเปลี่ยนเป็นเข้มขึ้นจนดำในที่สุด ผงงลำตัวจะแตกและง่ายเมื่อสัมผัส (ภาพผนวกที่ 1) ผลึกไวรัสที่ออกมาจากตัวหนอนตาย จะมีศักยภาพในการแพร่กระจายระบาดทำลายแมลงได้เองในธรรมชาติ ทั้งแบบแมลงตัวหนึ่งไปยังอีกตัวหนึ่ง และ แมลงรุ่นหนึ่งไปยังรุ่นต่อไปได้ โดยเฉพาะในกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ มีความเฉพาะเจาะจงในการเกิดโรคต่อกลุ่มแมลงทำให้ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม และยังไม่พบการสร้างความต้านทานต่อสารชีววินทรีย์ของแมลงเหมือนเช่นสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช (สุชลวัจน์ และ พิมลพร, 2544; พิมลพร, 2545; Miller, 1986; Wongwilikhit and Nanta, 2002)

การผลิตไวรัส Nucleopolyhedrovirus มี 2 รูปแบบ คือ แบบ *in vivo* เป็นการผลิตจากตัวหนอนผีเสื้อโดยตรง (host larvae) และ การผลิตแบบ *in vitro* ที่เป็นเทคนิคการผลิตไวรัสจากเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง (cell culture) (สุชลวัจน์ และ พิมลพร, 2542; สุชลวัจน์ และคณะ, 2543; อุทัย, 2544) ผลึกโปรตีนของไวรัสมีคุณสมบัติไม่ละลายใน alcohol, benzol, hydrogen peroxide, glycerol, benzene, carbon bisulfide หรือ น้ำร้อน น้ำเย็น แต่ละลายในสารละลายต่าง และถูกตกตะกอนได้ในกรด คุณสมบัติการคงทนของผลึกไวรัส ของหนอนกระทู้หอมในสภาพธรรมชาติ มีรายงานว่าแสงแดดทำให้ไวรัสเสื่อมประสิทธิภาพได้ (ศิริพันธ์, 2528) การนำไปใช้ในสภาพไร้อากาศจึงต้องฉีดพ่นในช่วงเวลาเย็นหลัง 15.00 น. หลีกเลี้ยงไม่ให้ผลึกไวรัสสัมผัสกับแสงแดดโดยตรง

แมลงอาศัยของไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus

หนอนแมลงอาศัยของไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และ หนอนคืบกะหล่ำ สามารถขยายพันธุ์เป็นปริมาณมากได้อย่างรวดเร็วในพื้นที่ที่มีพืชเป็นอาหารอุดมสมบูรณ์ การเจริญของแมลงมี 4 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ หนอนดักแด้ และตัวเต็มวัย หนอนแมลงทั้ง 4 ชนิด สามารถเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ด้วยอาหารเทียมและใบผักเพื่อใช้ผลิตขยายเชื้อไวรัสในปริมาณมาก แบบ *in vivo* ได้ในห้องปฏิบัติการ ลักษณะของหนอนแมลงอาศัยมีดังนี้

หนอนเจาะสมอฝ้ายมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Helicoverpa armigera* Hübner ชื่อเดิม *Heliothis armigera* และมีชื่อทั่วไป ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm), หนอนเจาะสมออเมริกัน (American bollworm) หนอนเจาะข้าวโพด (corn earworm) และ หนอนเจาะผลมะเขือเทศ จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ ตามส่วนอ่อนของพืช ระยะไข่ 2-3 วัน ระยะหนอนมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ขนาดหนอนโตเต็มที่มีลำตัวยาว ประมาณ 3.5 เซนติเมตร ระยะหนอนประมาณ 16-22 วัน ดักแด้มีสีน้ำตาลไหม้อยู่ใต้ดิน ขนาดประมาณ 1.8 เซนติเมตร ระยะดักแด้ประมาณ 10-12 วัน และตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืน วัดเมื่อกางปีกยาว 3-4 เซนติเมตร ลึงเกตเพศ ตัวเมียมีปีกคู่หน้าสีน้ำตาลปนแดง ส่วนตัวผู้มีสีน้ำตาลปนเขียว ระยะตัวเต็มวัยประมาณ 7-10 วัน รวมวัฏจักรชีวิตประมาณ 29-38 วัน ระยะหนอนเป็นระยะทำลายพืชและสามารถกินพืชเป็นอาหารได้หลายชนิด เช่น มะเขือเทศ ถั่วฝักยาว ถั่วลันเตา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ข้าวโพด พริก กระเจี๊ยบเขียว หน่อไม้ฝรั่ง สตรอเบอร์รี่ องุ่น ส้มเขียวหวาน ยาสูบ ฝ้าย ปอกระเจา ข้าวฟ่าง กุหลาบ เบนจามาส และเชอบีร่า เป็นต้น พบการระบาดได้ตลอดปี (ภาพผนวกที่ 2)

หนอนกระทู้หอมมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spodoptera exigua* Hübner และมีชื่อทั่วไป ได้แก่ หนอนหอม หนอนหลอดหอม หนอนหนังเหนียว beet armyworm และ lesser armyworm จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 20 ฟอง ในช่วงเวลา 18.00-20.00 น. ตามใบพืช ระยะไข่ 2-3 วัน ระยะหนอนมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ขนาดหนอนโตเต็มที่มีลำตัวยาว ประมาณ 2.5 เซนติเมตร ระยะหนอนประมาณ 14-17 วัน ดักด้มีสีน้ำตาลไหม้ อยู่ใต้ดิน ระยะดักด้ประมาณ 5-7 วัน และ ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืน วัดเมื่อกางปีกยาว 2.0-2.5 เซนติเมตร มีสีน้ำตาลแก่ปนเทา มีจุดสีน้ำตาลอ่อน 2 จุด ระยะตัวเต็มวัยประมาณ 4-10 วัน รวมวัฏจักรชีวิตประมาณ 30-35 วัน ระยะหนอนเป็นระยะทำลายพืชและสามารถกินพืชเป็นอาหารได้หลายชนิด เช่น พืชผักตระกูลกะหล่ำ หอมแดง หอมหัวใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง มันเทศ ถั่วลันเตา ถั่วฝักยาว กระเจี๊ยบเขียว ผือก มะเขือเทศ มะระ พริก แดงโม องุ่น ถั่วเหลือง ถั่วลิสง ถั่วเขียว ฝ้าย ข้าวโพด เบญจมาศ กุหลาบ มะลิ ดาวเรือง และกล้วยไม้ เป็นต้น พบการระบาดได้ตลอดปี รุนแรงในช่วงฤดูร้อน (ภาพผนวกที่ 3)

หนอนกระทู้ผักมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spodoptera litura* Fabricius และมีชื่อทั่วไป ได้แก่ หนอนกระทู้ยาสูบ (tobacco cutworm), หนอนกระทู้ฝ้าย (cotton worm), หนอนรัง common cutworm, cotton leaf worm และ fall armyworm จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่เป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 100 ฟอง ไข่ปกคลุมด้วยขนสีฟางข้าว ระยะไข่ 3-4 วัน ระยะหนอนมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ขนาดโตเต็มที่ประมาณ 4 เซนติเมตร ระยะหนอนประมาณ 10-14 วัน ดักด้มีสีน้ำตาลเข้มอยู่ใต้ดิน ขนาดหนอนโตเต็มที่มีลำตัวยาว ประมาณ 1.5 เซนติเมตร ระยะดักด้ประมาณ 7-10 วัน และ ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืน วัดเมื่อกางปีกยาว 3-3.5 เซนติเมตร มีสีน้ำตาล ปีกคู่หน้ามีเส้นสีเหลืองพาดหลายเส้น ระยะตัวเต็มวัยประมาณ 4-10 วัน รวมวัฏจักรชีวิตประมาณ 30-35 วัน ระยะหนอนเป็นระยะทำลายพืชและสามารถกินพืชเป็นอาหารได้หลายชนิด เหมือนเช่นหนอนกระทู้หอม พบการระบาดได้ตลอดปี (ภาพผนวกที่ 4)

หนอนคืบกะหล่ำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Trichoplusia ni* Hübner และมีชื่อทั่วไป ได้แก่ หนอนเขียว หนอนเขียวคืบ หนอนคืบ หนอนคืบกะหล่ำปลี (cabbage looper) และ cabbage semi-looper จัดอยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่ตามใต้ใบพืชเป็นฟองเดี่ยวๆ สีขาวนวล หรือ เหลืองอ่อน ขนาดไข่ประมาณ 0.5-0.6 มิลลิเมตร ระยะไข่ 3-4 วัน ระยะหนอนมีการลอกคราบ 4 ครั้ง ขนาดหนอนโตเต็มที่มีลำตัวยาว ประมาณ 2.5-3.5 เซนติเมตร หนอนชนิดนี้มี

ไวรัส ขนาดอนุภาคไวรัสขึ้นกับจำนวน nucleocapsid ที่บรรจุอยู่ในอนุภาคไวรัส (ภาพผนวกที่ 6)

การจำแนกชนิดไวรัส

การจำแนกชนิดไวรัสใช้สมบัติหลายอย่างประกอบกัน เช่น สมบัติความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงอาศัย กลไกการทำให้เกิดโรค ความรุนแรงของโรค ลักษณะผลึกไวรัสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง การวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การวิเคราะห์โปรตีนที่ไวรัสสร้างขึ้น และการวิเคราะห์สารพันธุกรรมของไวรัส

องค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถนำมาใช้ประโยชน์มากในการจำแนกสายพันธุ์ของไวรัสโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของการเรียงลำดับเบสของจีโนมไวรัส การใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะแล้วแยกขนาดด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจลทำให้สามารถบอกความแตกต่างของสารพันธุกรรม และแสดงถึงความสัมพันธ์ของไวรัสแต่ละสายพันธุ์ได้ (Smith and Summer, 1978; Miller, 1986; Possee and Rohrmann, 1997) นอกจากนี้ การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอของไวรัสสามารถจำแนกสายพันธุ์ไวรัสที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ (Jewell and Miller, 1980; Rohrmann *et al.* 1982)

ไวรัส NPV สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) หรือสายพันธุ์ที่ดัดแปลงพันธุกรรม (genetically modified viruses) ที่ใช้ในการผลิตไวรัส NPV เพื่อจำหน่ายเป็นการค้า นั้น จะต้องมี การตรวจสอบจำแนกชนิดและการขึ้นทะเบียนตามมาตรฐานสารชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืช ของสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ที่ให้ความสำคัญในการควบคุมคุณภาพสินค้าเกษตรและด้านความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมไปถึงการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรให้ได้มาตรฐานความปลอดภัยสากล (Groner, 1986; van Lenteren, 2003)

การตรวจวิเคราะห์สายพันธุ์ไวรัสให้มีสายพันธุ์ตรงตามพันธุ์จึงมีความสำคัญมาก ต่อกระบวนการผลิต และมีผลต่อการทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไวรัส การทดสอบความปลอดภัยด้านความเป็นพิษและการเกิดโรคต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ การวิเคราะห์ชนิดของไวรัสอาจเป็นการวิเคราะห์ทางชีวเคมี (biochemical identification) หรือทางวิทยาเซรุ่ม (serological identification) เช่น ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลาย

เหมาะสำหรับงานตรวจจำแนกแบบเคลื่อนที่ (Volkman, 1985; Crook and Payne, 1980) หรือการใช้เทคนิค PCR-based typing ที่มีการพัฒนานำเอาเทคนิค PCR มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิต โดยมีขั้นตอนวิธีการที่คำนึงถึง ความรวดเร็ว ถูกต้องแม่นยำ และใช้ตัวอย่างน้อย นอกจากนี้มีการประยุกต์ใช้ได้หลายวิธีการ โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ หรือใช้ร่วมกับเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น เทคนิค RFLP (restriction fragment length polymorphism) เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) และ เทคนิค AFLP (Vos *et al.*, 1995) เป็นต้น (Ausubel *et al.*, 1991; White, 1993)

เทคนิคการตรวจสอบจำแนกชนิดโดยใช้ยีนใดยีนหนึ่ง มักจะมีข้อได้เปรียบในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ เนื่องจากยีนมีวิวัฒนาการมาในอัตราที่ต่างกัน มีรายงานการตรวจสอบทั้งจีโนมของไวรัสด้วยยีนหลัก (core genes) จำนวน 30 ยีน ของไวรัสในวงศ์ Baculoviridae ทำให้แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ Granulosis, Nucleopolyhedrovirus Group I, Group II ของแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Nucleopolyhedrovirus ของแมลงในอันดับ Diptera สามารถสร้าง phylogenetic tree และ ศึกษาวิวัฒนาการของไวรัส ซึ่งระบุไวรัส HaSNPV, SpliNPV, SeMNPV อยู่ในกลุ่ม Group II Lepidoptera NPVs (Herniou *et al.*, 2004)

การจัดจำแนกกลุ่มไวรัสโรคแมลงนี้ มีรายงานการใช้เทคนิค RFLP ซึ่งจะแตกต่างกันไปในชนิดไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต่างๆ การกำหนดค่าต่างๆในการทำปฏิกิริยา PCR และการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ที่จะทำให้ได้ผลการจำแนกได้ดี ดังเช่น

de Moraes and Marunniak (1997) ศึกษาการจำแนกไวรัส จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *Autographa californica* NPV (AcMNPV), *Anticarsia gemmatalis* MNPV (AgMNPV), *Bombyx mori* NPV (BmMNPV), *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV), *S. frugiperda* MNPV (SfMNPV), SeMNPV, *Anagrapha falcifera* MNPV (AfMNPV) และ HzSNPV โดยการออกแบบ degenerate primer จำนวน 1 คู่ จากยีน polyhedrin และปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 575 bps ทั้ง 8 ชนิด

Munoz *et al.* (1999) ศึกษาการจำแนกไวรัส SeNPV ประเทศสเปน (Se-SP2) ที่เพิ่มปริมาณจากหนอนกระทุ้งหอม ที่มีการโคลนนิ่ง genotypic variants เป็น SP2A, SP2B, SP2C และ SP2D จำนวนรุ่น (passages) ที่ทำให้แต่ละ isolate มี DNA profile ในทุกๆ แถบดีเอ็นเอ (band) เท่ากันและ

คงที่ต่อไปอย่างน้อย 6 รุ่น มีการสร้างแผนที่ยีน ด้วยการใส่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I และ *Xba*I พบว่า บริเวณ 8 - 10 m.u. เป็น highly variable ดังนั้น จึงใช้เป็น RFLP markers ในการตรวจจำแนกความแตกต่างทั้ง 4 genotype นี้ได้

Kao *et al.* (2000) ศึกษาการจัดจำแนกไวรัส NPV ประเทศไต้หวัน จำนวน 5 ชนิด ได้แก่ SpeiNPV (SeNPV), SpltNPV (SINPV), *Perina nuda* NPV (PnNPV), *L. xyli*na NPV (LyxyNPV) และ AcMNPV - TWN4 โดยการตัดจีโนมด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI สามารถใช้จำแนกชนิดได้ และ ใช้เทคนิค RFLP โดยออกแบบไพรเมอร์ 35/36 จากยีน polyhedrin แล้วนำไปเพิ่มปริมาณได้ซันดิเอ็นเอ ขนาด 680 คู่เบส แล้วนำมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI, *Bsp*HI, *Hap*II, *Mse*I และ *Taq*I ซึ่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bsu*RI แสดงแถบดีเอ็นเอบ่งชี้จำแนกความแตกต่างของชนิดไวรัสนี้ได้สมบูรณ์กว่าเอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่น

Christian *et al.* (2001) ศึกษาการจำแนกไวรัส ด้วยเทคนิค RFLP โดยการใช้ไพรเมอร์ rPol-f ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากยีน polyhedrin ของไวรัส HaNPV เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ใช้เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR initial denature 95°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature 95°C นาน 30 วินาที annealing 45°C นาน 30 วินาที extension 72°C นาน 40 วินาที จำนวน 5 รอบ และ denature 95°C นาน 30 วินาที annealing 50°C นาน 30 วินาที extension 72°C นาน 40 วินาที จำนวน 30 รอบ แล้วเลือกใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Eco*RI, *Eco*RV หรือ *Hind*III เพื่อบ่งชี้ความแตกต่างของไวรัส NPV ของแมลง *Helicoverpa* spp. ที่คัดแยกมาจากธรรมชาติ

Huang *et al.* (2002) ใช้ตำแหน่งของยีน cathepsin และ chitinase บนจีโนมเพื่อตรวจหาความแตกต่างไวรัสชนิด *Antheraea pernyi* NPV (AnpeNPV) และ *Orgyia pseudotsugata* MNPV (OpMNPV) โดยการสร้างแผนที่จีโนมของ *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus (AnpeNPV) และระบุยีนเป้าหมายเพื่อพัฒนาการแสดงออก จากการใส่เอ็นไซม์ *Pst*I ตัดจีโนมออกเป็น 54 ชิ้น และเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR พบว่า AnpeNPV มีขนาดจีโนม 130.2 กิโลเบส ซึ่งมีความคล้ายคลึงมากกับ *Orgyia pseudotsugata* multicapsid NPV (OpMNPV) การที่จีโนมมีความคล้ายคลึงกันสูงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการทำแผนที่ยีนเป้าหมาย เช่น ยีน cathepsin และ chitinase เนื่องจากยีนนี้มีหน้าที่ทำให้เกิดการเสียดสภาพของโปรตีน และการเข้าทำลายเซลล์ย่อยสลายเซลล์แมลงของไวรัส การวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบการทำงานของ open reading frame (ORF) ที่แสดงออกระหว่าง ไวรัสทั้ง 2 ชนิด

Khan *et al.* (2004) ใช้ยีน 3 ชนิด late expression factor (lef) 8, chitinase และ helicase ใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*-H และ *EcoRI*-J clones แล้วนำผลไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโมเลกุลไวรัส 14 ชนิด พบว่า ยีน late expression factor (lef) 8, และยีน helicase ให้ผลการจัดกลุ่มได้ดีและถูกต้อง โดยแสดงผลการวิจัยให้เห็นว่า Baculovirus phylogeny อาศัยยีนเดียวอาจจะไม่แสดงกลุ่ม baculovirus อย่างถูกต้อง ผล Phylogenetic tree อาจจะแตกต่างกัน การใช้ *EcoRI* ทำแผนที่จีโนมของ ของ HaSNPV ร่วมกับวิธี shotgun - cloned เข้าไปในพลาสมิด pBluescript SK ขนาดตั้งแต่ 14 กิโลเบส ถึง 0.5 กิโลเบส สร้างจากยีน 3 ยีน ได้แก่ late expression factor (lef) 8, chitinase และ helicase โดยยีน chitinase และ helicase สุ่มจากการ clones (*EcoRI*- H และ *EcoRI*- J) จากส่วนของ *EcoRI* plasmid library ของจีโนมไวรัส ซึ่งยีน lef- 8 และ helicase พบในไวรัสที่ทดลอง ในการวิเคราะห์กรดแอมิโนจากยีน 3 ชนิดหาความสัมพันธ์ ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และ Treeview พบว่ายีน helicase และ lef-8 สันนิษฐานผลการจำแนกไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus และ Granulovirus (GV) และแยกย่อยได้เป็น NPVs กลุ่ม I และ II โดยผลใน 3 ยีนชั้นผลว่า HaSNPV เป็นกลุ่ม II และ ข้อมูลจากยีน chitinase จัด HaSNPV อยู่ในกลุ่ม 1 นั้นไม่ถูกต้อง และ *Plutella xylostella granulovirus* (PxGV) ไม่พบยีน chitinase

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากการศึกษาวิเคราะห์จากจีโนมทั้งหมดของไวรัส จะแตกต่างจากลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่ใช้ยีนใดยีนหนึ่ง ที่มักจะมีข้อโต้แย้งกันในการจัดความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์ เนื่องจากยีนมีวิวัฒนาการมาในอัตราที่ต่างกัน Hermiou *et al.* (2004) ศึกษาวิวัฒนาการไวรัสในวงศ์ Baculoviridae จำนวน 39 ชนิดจากแมลงอาศัยอันดับ Lepidoptera, Diptera และ Hymenoptera ตรวจสอบทั้งจีโนมของไวรัสด้วยยีนหลัก (core genes) จำนวน 30 ยีน ใช้ degenerate primer ที่ออกแบบจากยีน *lef*-8 และ *ac*22 ทำให้แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม คือ Granulosis, Nucleopolyhedrovirus Group I, Group II ของแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Dipteran Baculovirus ของแมลงในอันดับ Diptera และ Hymenopteran Baculovirus โดยวิเคราะห์ด้วย phylogenetic tree

Toprak and Gürkan (2004) จำแนกไวรัส *S. littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) NPV ที่พบในตุรกี โดยออกแบบไพรเมอร์ degenerate primers ใช้ส่วนของยีน lef - 8 และ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็น *S. littoralis* NPV-3 variant

van Oers *et al.* (2004) ศึกษาการใช้เทคนิค PCR เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน polyhedrin, lef - 8 และ pif - 2 โดยใช้ degenerate primer เพื่อใช้วิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโมเลกุลของไวรัสชนิด *Chrysodeixis chalcites* SNPV ได้

Wu and Wang (2005) ศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโมเลกุลจากตำแหน่งยีน polyhedrin ของจีโนมแมลง *Lymantria xyliana* Swinehoe (Lepidoptera: Lymantriidae) ประเทศไต้หวัน โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Eco*RI และ *Eco*RV พบว่า สามารถใช้วิเคราะห์ LyxyMNPV ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *L. dispar* MNPV

Murillo *et al.* (2006) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิค PCR - RFLP ในการจำแนกไวรัส wild - type, SeMNPV strains ที่แยกมาจาก สหรัฐอเมริกา (US2 isolate) และ ประเทศสเปน (SP1, SP2 และ SP3 isolates) และไวรัสที่ cloned (US1A isolate) โดยการใช้ไพรเมอร์ 36 คู่ ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Bgl*III พร้อมกับวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ VO1 ซึ่งประกอบด้วย homologous region พบ SeMNPV ใหม่ 6 isolated จากดินทางตอนใต้ของสเปน

Seufi (2008) ทำการตรวจจำแนกลักษณะไวรัส *S. littoralis* nucleopolyhedrovirus (SpliNPV) จากแหล่งพันธุ์อียิปต์ โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน polyhedrin (Polh-cr) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่นๆ พบว่า มีความคล้ายคลึงกับไวรัสชนิดอื่นอยู่ในช่วง 78 - 99 % สำหรับ *Plusia avichalcea* NPV และ SpliNPV ตามลำดับ ช่วง conserve region นี้จึงมีความเหมาะสมในการตรวจสอบไวรัส

เทคนิค PCR - Based Typing

เทคนิค PCR - based typing เป็นการจำแนกสายพันธุ์ในระดับดีเอ็นเอ แบบเปรียบเทียบลำดับเบสโดยตรง โดยใช้วิธีการออกแบบไพรเมอร์จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนไวรัส ที่มีลักษณะอนุรักษ์มากที่สุด และมีลำดับเบสที่เหมือนกันต่อเนืองมากที่สุด แล้วนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และนำผลผลิต PCR ที่ได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางอะกาโรสเจล (agarose gel) ย้อมสีด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ที่เห็นในเจล ใช้เป็นลักษณะเปรียบเทียบในการจำแนกชนิดของไวรัสได้อย่างชัดเจน ซึ่งชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบดี จะทำให้สามารถจำแนกชนิดได้ถูกต้อง

ชัดเจน ลดขั้นตอนและเวลาในการตรวจจำแนกชนิดได้รวดเร็วขึ้น และไม่ต้องออกแบบ ความจำเพาะของไพรเมอร์เป็นรายชนิด หรือใช้ไพรเมอร์จำนวนหลายชุด ทำให้ต้นทุนค่าใช้จ่าย น้อยลง ซึ่งจะเหมาะสมต่องานบริการ การตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดไวรัสที่ต้องการความรวดเร็ว ในราคาที่เหมาะสม

จากการสืบค้นข้อมูลยีนของไวรัส NPV จาก National Center for Biotechnology Information พบว่า มียีนที่ศึกษาลำดับเบสแล้วจำนวนหลายยีน เช่น polyhedrin, chitinase, cathepsin, alkaline exonuclease (AE), DNA binding protein (DBP), DNA polymerase, glycoprotein37 (GP37), helicase และ protein kinase เป็นต้น ส่วนมากพบว่ามีำนำยีน polyhedrin มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการจำแนกชนิดมากที่สุด ซึ่งยีนนี้เป็น hyper-expressed protein มีหน้าที่ในการสร้าง crystalline matrix ของส่วน occlusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของไวรัส สกุลนี้ โดยไวรัสสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันอนุภาคไวรัสให้คงประสิทธิภาพอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน แต่ยังไม่มียีนงานวิจัยการออกแบบเพื่อใช้จำแนกด้วยเทคนิค PCR - based typing

เทคนิค AFLP

เทคนิค AFLP เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่งที่มีข้อดีที่ได้เปรียบกว่าเทคนิคอื่น คือ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับเทคนิค RAPD โดยหนึ่ง ปฏิกริยาจะให้แถบดีเอ็นเอมากกว่าเทคนิค RAPD ประมาณ 4 เท่า ทำให้เกิดภาวะพหุสัณฐาน (polymorphism) ได้จำนวนมาก จึงสามารถบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวอย่างได้ดี ในกรณีใช้ในการศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ใช้กับสิ่งมีชีวิตที่มีจีโนมขนาดใดก็ได้ โดยการปรับเพิ่มจำนวนเบสที่ใช้คัดเลือกที่ส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์หรือใช้กับโคลนดีเอ็นเอ (clone DNA) ก็ได้ และไม่ต้องออกแบบความจำเพาะของไพรเมอร์เป็นรายชนิด หรือใช้ไพรเมอร์หลายชุด ทำให้ลด ค่าใช้จ่ายลง เนื่องจากไวรัส HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV TnSNPV และ TnMNPV สายพันธุ์ ดั้งเดิมในประเทศไทยยังไม่มีการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสทั้งจีโนม และรายงานไวรัสต่างประเทศ ยังพบว่า ไวรัสชนิดเดียวกันมีขนาดจีโนมไม่เท่ากันได้ เช่น HaSNPV (G4) มีจีโนมขนาด 131,403 bp, HaSNPV (C1) มีจีโนมขนาด 130,759 คู่เบส SeMNPV มีจีโนมขนาด 135,611 คู่เบส SINPV มี จีโนมขนาด 139,342 คู่เบส (Lange *et al.*, 2004) ไวรัสชนิด HaSNPV มีจีโนมขนาด 130,759 คู่เบส (Zhang *et al.*, 2005) ไวรัสชนิด SeMNPV มีจีโนมขนาด 135,611 คู่เบส (Jakubowska *et al.*, 2006)

SIMPV มีจีโนมขนาด 139,342 คู่เบส (Pang *et al.*, 2001) และ TnSNPV มีจีโนมขนาด 134,394 คู่เบส (Willis *et al.*, 2005)

การเลือกใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะในการใช้เทคนิค AFLP ทั่วไปมีหลายชนิด เช่น เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แบบ 6 - cutter *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *BglII*, *XbaI* และแบบ 8 - cutter *Sse 8387I* ร่วมกับเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แบบ 4 - cutter *MseI* หรือ *TaqI* ถ้าเลือกใช้ 6 - cutter คู่กันจะทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอจำนวนน้อย ทำให้ได้จำนวนผลิตภัณฑ์ PCR น้อยไปด้วย และถ้าเลือกใช้ 4 - cutter คู่กันจะทำให้เกิดเป็นลักษณะเบสซ้ำเมื่อเชื่อมต่อกับ adapter เมื่อถูกทำให้เสียสภาพเบสคู่สมจะมาจับกันเอง ทำให้เกิดโครงสร้างแบบ stem - loop ซึ่งโพรเมอร์ไม่สามารถเข้าจับและสังเคราะห์เพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ นั้นได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะเลือกใช้ 6 - cutter *EcoRI* คู่กับ 4 - cutter *MseI* เนื่องจาก *EcoRI* มีราคาถูก และการตัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพดี มีโอกาสพบการตัดไม่สมบูรณ์ได้น้อย และ *MseI* จะตัดดีเอ็นเอได้ขนาดเล็กพอเหมาะกับการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR ได้ดีกว่า *TaqI* แต่มีบางชนิดเลือกใช้เอ็นไซม์อื่นแล้วได้ผลดีกว่า เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะใช้ 6 - cutter *EcoRI* ร่วมกับ 4 - cutter *TaqI* ข้าวสาลีจะใช้ 6 - cutter *PstI* ร่วมกับ 4 - cutter *MseI* เป็นต้น (Vos and Kuiper, 1997)

เทคนิค AFLP มีการใช้อย่างกว้างในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงที่มีจีโนมขนาดใหญ่ เช่น พืช และสัตว์ ในการทำแผนที่พันธุกรรม ตรวจสอบความต้านทาน และการจำแนกชนิด นอกจากนี้ ยังมีการใช้เทคนิคนี้ในแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น Najimi *et al.* (2002) ศึกษาขึ้นต้นทานของข้าวสาลีที่มีต่อแมลง Hessian fly, *Mayetiola destructor* Say ในประเทศโมร็อกโค ในด้านจุลินทรีย์โรคแมลง เช่น Boucias *et al.* (2000) ศึกษาโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์จุลินทรีย์ราโรคแมลง ชนิด *Nomuraea rileyi* จากแหล่งพันธุ์ Florida, Brazil และ Argentina ระหว่างเทคนิค AFLP ที่ประยุกต์ขั้นตอน กับ เทคนิค RAPD ผลพบว่ามีความแตกต่างภาวะพหุสัณฐาน 65% (141 bands จาก 216 scorable bands) โดยการตรวจจับด้วย ethidium bromide ในช่วง 400–3000 คู่เบส

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บเกี่ยวผลึกไวรัสจาก หนอนที่เป็นโรคระยะสุดท้าย (moribund larvae)

นำไวรัสสต็อก จาก สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV มาตรวจนับความเข้มข้นของแต่ละชนิด ด้วย สไลด์นับเซลล์ ปรับความเข้มข้นด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้ หยดไวรัส HaSNPV บนชิ้นอาหารเทียม อัตราความเข้มข้น 3×10^6 ผลึกต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อชิ้นอาหารเทียม ใส่หนอนเจาะสมอฝ้าย วัยที่ 3 อายุ 10 วัน เมื่อหนอนกินไวรัส HaSNPV เข้าไปพร้อมอาหารเทียม หลังจาก 24 – 48 ชั่วโมง ย้ายหนอนไปใส่ถ้วยอาหารเทียมที่ไม่ใส่ไวรัส ขนาด 2 ออนซ์ หน้า 0.5 เซนติเมตร เพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง จำนวนครั้งละ 200 - 300 ตัว จากนั้นเก็บเกี่ยวไวรัส HaSNPV โดยเก็บหนอนเจาะสมอฝ้ายหลังจากที่กินไวรัสเข้าไป 5 - 6 วัน ใส่บีกเกอร์ที่มี 70% เอธิลแอลกอฮอล์ แช่นาน 10 นาที จากนั้นนำหนอนใส่ขวดละ 1 ตัว และเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อขวด ปิดฝาตั้งทิ้งไว้ ในที่มีคนาน 1 - 2 เดือน เทน้ำส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร บดหนอนด้วยที่บดทำด้วยแก้ว กรองเศษซากหนอนออกด้วยผ้าลึปอดเชื้อ ทำให้ลดการปนเปื้อนแบคทีเรีย ตรวจเช็คผลึกไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงนำไวรัส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่หลอดปั่นแยกสาร ขนาด 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องปั่นแยกสาร ที่ 3,500 g นาน 15 วินาที นำน้ำส่วนบนมาปั่นแยกที่ 10,000 g นาน 20 - 30 วินาที ทำซ้ำ 2 - 3 ครั้ง หรือ จนกระทั่งได้ตะกอนมีสีขาวสะอาด ถ้าตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วยังพบว่ายังมีแบคทีเรียปนเปื้อนเล็กน้อยให้เติม 1% gentamicin sulfate หรือ antibiotic ชนิดอื่นๆ ตั้งทิ้งไว้ นาน 10 - 15 นาที แล้วทำการปั่นแยกอีกครั้ง แบ่งไวรัสใส่ขวดขนาด 2 มิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อขวด ตัดฉลาก เก็บในตู้เย็นที่เย็นจัด - 20 หรือ - 80 °C

ส่วนการเก็บเกี่ยวไวรัส SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV จากหนอนที่เป็นโรคระยะสุดท้าย ใช้วิธีการทำนองเดียวกันกับการเก็บไวรัส HaSNPV ต่างกันที่การเตรียมชนิดหนอน ความเข้มข้นของไวรัส และระยะเวลาที่ให้หนอนกินไวรัส โดยไวรัส SeMNPV ให้เก็บเกี่ยวจากหนอนกระทู้หอมในวันที่ 5 - 6 วันหลังจากกินไวรัสเข้าไป ที่เตรียมจากหนอนกระทู้หอม วัยที่ 3 อายุ 10 วัน กินไวรัส SeMNPV ที่หยดบนอาหารเทียม อัตราความเข้มข้น 2×10^6 ผลึกต่อมิลลิลิตร ปริมาตร

5 ไมโครลิตรต่อชิ้นอาหารเทียม ไวรัส SIMNPV ให้เก็บเกี่ยวจากหนอนกระทู้ผักในวันที่ 7 - 8 วัน หลังจากกินไวรัสเข้าไป ที่เตรียมจากหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 2 อายุ 7 วัน กินไวรัส SeMNPV ที่หยดบนอาหารเทียม อัตราความเข้มข้น 3×10^7 ผลึกต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อชิ้นอาหารเทียม และ เก็บเกี่ยวไวรัส TnMNPV จากหนอนคืบกะหล่ำ ในวันที่ 4 - 5 หลังจากกินไวรัสเข้าไป ที่เตรียมจากหนอนคืบกะหล่ำ วัยที่ 4 อายุ 13 วัน กินไวรัส TnMNPV ที่หยดบนอาหารเทียม อัตราความเข้มข้น 2×10^5 ผลึกต่อมิลลิเมตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อชิ้นอาหารเทียม

การศึกษาลักษณะผลึกไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบใช้แสง

การศึกษาลักษณะรูปร่างผลึกไวรัสที่เก็บเกี่ยวได้มาย้อมสีด้วย Giemsa ตามขั้นตอนการย้อมของ ทิพย์ดีและสุดาวรรณ (2530) โดยเตรียมผลึกไวรัสบนแผ่นสไลด์ให้เป็นฟิล์มบาง ๆ ปล่อยให้แห้ง หยด 0.1 M HCl ให้ท่วมทิ้งไว้ 2 - 5 นาที ย้อมสี Giemsa ที่ทำให้เจือจางแล้ว 5 - 10 นาที จากนั้นผ่านน้ำไหล 5 - 10 นาที ปล่อยให้แห้ง ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 1000x เพื่อดูการติดสีของผลึกไวรัสทั้ง 4 ชนิด และบันทึกผลด้วยภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เปรียบเทียบลักษณะผลึกไวรัส ด้วยระบบแสง phase contrast และเปรียบเทียบลักษณะผลึกจากการย้อมสี และ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผลึกไวรัสด้วยเครื่องนับเซลล์ sheath flow particle size distribution analyzer เปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผลึกไวรัส ทั้ง 4 ชนิด และบันทึกผลและวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ sysmex SD-2000

การศึกษารูปร่างและขนาดผลึกไวรัสจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ศึกษารูปร่างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผลึกไวรัสจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และ ศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนของอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน

ศึกษารูปร่างและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผลึกไวรัสจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Hitachi SEM S-2500) โดยวิธีการเตรียมผลึกไวรัส ดัดแปลงจากเทคนิควิธีการเตรียมตัวอย่างของ อุไรวรรณ (ม.ป.ป.); Adams and Wilcox (1982); Bozzola and Russell (1992) ดังนี้ นำผลึกไวรัสทั้ง 4 ชนิด แยกใส่หลอดปั่นแยกสารแต่ละชนิด มาปั่นตกตะกอนที่ 4,600 g นาน 10 นาที ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น prefixation ด้วย 2.5% glutaraldehyde ที่ละลายใน 0.1 M

sodium phosphate buffer pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน ปั่นตกตะกอนล้าง fixative ด้วย buffer ส่วนเกินออก 3 ครั้งๆ ละ 5-10 นาที post-fixation ด้วย 2% osmium tetroxide ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนล้าง fixative ด้วย buffer ส่วนเกินออก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที และ เอทานอล 35, 50, 70, 95% ครั้งละ 15 นาที และ absolute ethanol alcohol จำนวน 4 ครั้ง นานครั้งละ 10 นาที ครั้งสุดท้ายเติมแล้วผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องผสมสาร (vortex) นำไปหยดบนสไลด์ร้อให้แห้งภายในจานแก้ว นาน 14 วัน นำมา coat ด้วย Pd/Pt นาน 7 นาที (ความหนาประมาณ 21 นาโนเมตร) แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด และวัดขนาดผลึกไวรัสจากภาพถ่ายเพื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย จากผลึกไวรัส จำนวน 40 ผลึก/ชนิด บันทึกผลเปรียบเทียบกับภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ศึกษาลักษณะรูปร่างและจำนวนของอนุภาคไวรัสที่อยู่ภายในผลึกไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TECNAI 20) โดยการเตรียมผลึกไวรัส คัดแปลงจากเทคนิควิธีการเตรียม ตัวอย่างของ อุไรวรรณ (ม.ป.ป.); Adams and Wilcox (1982); Bozzola and Russell (1992) ดังนี้ นำ ผลึกไวรัสทั้ง 4 ชนิด แยกใส่หลอดปั่นแยกสารแต่ละชนิด มาปั่นตกตะกอนที่ 4,600 g นาน 10 นาที ด้วยน้ำกลั่น จากนั้น prefixation ด้วย 3% glutaraldehyde ที่ละลายใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C ล้าง fixative ด้วย buffer ส่วนเกินออก 3 ครั้งๆ ละ 5-10 นาที postfixation ด้วย 2% osmium tetroxide ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.2 ทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิ 4 °C นาน 2 ชั่วโมง ล้าง fixative ด้วย buffer ส่วนเกินออก 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ขั้นตอนจากนี้ เตรียมที่อุณหภูมิ 25 °C หรือ อุณหภูมิห้อง จากนั้น dehydration โดยแช่ผลึกไวรัสที่ฝังในวุ้น (agar) ลงในสารละลายเอทานอล 30, 50, 70, 90, 100 และ 100% ในแต่ละความเข้มข้นใช้เวลานาน 10-15 นาที จากนั้นแช่ใน ethanol : resin (2 : 1) และ (1 : 2) แต่ละครั้งใช้เวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง ในครั้ง สุดท้ายทิ้งไว้ข้ามคืน ทำการ embedding โดยแช่ผลึกไวรัสที่ฝังใน agar ใน spurr : acetone (1 : 2) นาน 1 ชั่วโมง และ spurr : acetone (2 : 1) นานข้ามคืน เปิดฝาทิ้งไว้ 6 ชั่วโมง จากนั้น polymerization ลงในภาชนะเดิม pure resin ที่เตรียมใหม่ พร้อมใส่รหัสชื่อไวรัสไว้ด้วย ทำให้ พลาสติกแข็งตัว ที่ 70 °C นาน 8 ชั่วโมง หั่นบาง (section) ด้วยเครื่องตัด แบบ ultramicrotome ให้ได้ ชั้นบางขนาดในช่วง 60-90 นาโนเมตร วางบน grid แล้วย้อมด้วยสีย้อม 2% uranyl acetate ที่ละลาย ในน้ำกลั่น นาน 15 นาที ในที่มืด ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง และย้อมสีตามด้วย lead citrate นาน 3-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้ง ฝังในที่แห้งและไม่มีฝุ่น จากนั้นศึกษารูปร่างลักษณะผลึกไวรัส และ

บันทึกจำนวนอนุภาคไวรัสที่ฝังอยู่ภายในผลึกไวรัส บันทึกผลเปรียบเทียบกับภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

การสกัดดีเอ็นเอจากผลึกไวรัส NPV

สกัดดีเอ็นเอจากผลึกไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus ที่เก็บจากหนอนเป็นโรค ตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Hunter-Fujita *et al.* (1998) และ Christian *et al.* (2001) โดยละลายผลึกไวรัสความเข้มข้น $10^8 - 10^9$ ผลึกต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 250 μ l ด้วย polyhedral dissolution buffer (1 M Na_2CO_3 85 μ l, 0.5 M EDTA 150 μ l, 1 M NaCl 15 μ l) 250 μ l บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที แล้วปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 g นาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบน 500 μ l ใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสาร release DNA (2% SDS 500 μ l, 20 mg/ml proteinase K 10 μ l, 10 mg/ml RNase A 8 μ l) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 g นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบน 500 μ l ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 500 μ l ในตู้ดูดควันผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมสาร นาน 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ผสมสารละลายด้วยเครื่องผสมสารอีก นาน 30 วินาที นำไปปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 g นาน 5 นาที ได้สารละลายแยกชั้น ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ อย่างระมัดระวังในตู้ดูดควัน บันทึกปริมาณไว้ แล้วเติม 3 M NaAc pH 5.2 อัตรา 1 : 10 (v/v) ของปริมาณสารละลาย และเติมเอธานอลบริสุทธิ์ที่แช่เย็น 2 เท่าของปริมาณ ผสมกันโดยพลิกหลอดไปมา จะเห็นเส้นสายดีเอ็นเอ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอน ที่ 10,000 g นาน 15 นาที หรือ ใช้วิธีเกี่ยวสายดีเอ็นเอเทสารละลายส่วนบนทิ้งไป ล้างตะกอนด้วย 70% เอธานอล 200 μ l นำไปปั่นตกตะกอน ที่ 7,200 g นาน 10 นาที แล้วเท 70% เอธานอลทิ้งไป ผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer 20 μ l (สามารถเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ใช้ได้นานที่อุณหภูมิ -20 °C)

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงคลื่น 260 และ 280 nm (ดีเอ็นเอที่ดีควรมีค่าอัตราส่วน A260/A280 อยู่ระหว่าง 1.8-2.0) และตรวจสอบความเข้มข้นและขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 0.8 % ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่่าเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 μ g /ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูป บันทึกผล

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR – Based Typing

ตรวจวิเคราะห์โดยการสืบค้นข้อมูลยีน จาก National Center for Biotechnology Information ([http : www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อนำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ ที่มีลักษณะอนุรักษ์มากที่สุด และมีลำดับเบสที่เหมือนกันต่อเนื่องมากที่สุด นำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp 2400) DNA thermal cycler แล้วนำผลผลิต PCR ของไวรัสแต่ละชนิดมาแยกด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านตัวกลางอะกาโรสเจล ย้อมสีด้วย ethidium bromide เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆ ที่สามารถจำแนกชนิดของไวรัสได้ชัดเจน

จากการสืบค้นข้อมูลยีนของไวรัส NPV จาก National Center for Biotechnology Information ในการทดลองนี้คัดเลือกยีนที่มีคุณลักษณะสำคัญ จำนวน 3 ยีน คือ ยีน polyhedrin เป็น hyper-expressed protein มีหน้าที่ในการสร้าง crystalline matrix ของส่วน occlusion bodies ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของไวรัสสกุลนี้ โดยไวรัสสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันอนุภาคไวรัสให้คงประสิทธิภาพอยู่ในสภาพแวดล้อมได้นาน และ ยีน chitinase/cathepsin มีหน้าที่ในการทำลายเยื่อหุ้ม (peritrophic membrane) ในการเริ่มเข้าสู่เซลล์ (initial infection) ช่วยให้เกิดการย่อยสลายเซลล์เป็นของเหลว (liquefaction) นับว่าเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้ไวรัสมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายเซลล์ของหนอนแมลงแต่ละชนิด และช่วยในการแพร่กระจาย (hence dissemination) ของ progeny virus (Miller, 1996) และ Thomas *et al.* (1998) ศึกษาไวรัส *Autographa californica* MNPV (AcMNPV) พบว่า มีการสร้าง chitinase ใน endoplasmic reticulum (ER) ของเซลล์ที่ถูกไวรัสเข้าสู่เซลล์ (infection) และจะถูกปล่อยออกจากเซลล์ก่อนเกิดการย่อยสลายเซลล์เป็นของเหลว และยังพบในไวรัสชนิด TnMNPV ทำนองเดียวกัน

การออกแบบไพรเมอร์จากยีนของไวรัสทั้ง 4 ชนิด

1. สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของ ยีนที่พบในไวรัสทั้ง 4 ชนิด จาก Genbank ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (ตารางผนวกที่ 2)
2. เปรียบเทียบลำดับเบสของไวรัส (alignment) ทั้ง 4 ชนิด แต่ละยีน ด้วยโปรแกรม Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) (ตารางผนวกที่ 3)

3. คัดเลือกยีนที่มีลักษณะอนุรักษ์มากที่สุด และมีลำดับเบสที่เหมือนกันทั้ง 4 สายพันธุ์ ต่อเนื่องมากที่สุด มาใช้ออกแบบไพรเมอร์ แบบ degenerate primer
4. ออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม primer3 (frodo.wi.mit.edu/primer3_www.cgi/)
5. คำนวณค่าจำเพาะของไพรเมอร์แต่ละคู่ (ตารางผนวกที่ 4)

ในการทดลองใช้ไพรเมอร์ จำนวน 4 ชุด ที่ออกแบบจากยีน จำนวน 3 ยีน คือ chitinase, polyhedrin และ cathepsin ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีลำดับเบส ดังนี้

chitinase forward primer	5'-GAA CGA ACC A(GC)TA CAA AGG CA-3'
chitinase reverse primer	5'-TAC(T) GAT TTC(T) AAA(G) GGA(C) GCG(T) TG-3'
polyhedrin forward primer I	5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC A-3'
polyhedrin reverse primer I	5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) G-3'
polyhedrin forward primer II	5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC AA-3'
polyhedrin reverse primer II	5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) GT-3'
cathepsin forward primer	5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3'
cathepsin reverse primer	5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3'

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (amplification) ด้วยเครื่อง DNA thermal cycle

นำดีเอ็นเอที่สกัดมาผสมสารละลาย master mix [ddH₂O 63.6 µl, 10x PCR buffer /MgCl₂ (25 mM) 10 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer forward (25 pmole/ µl) 4 µl, primer reverse (25 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.4 µl] (ตารางที่ 1) แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอดๆ ละ 23 µl จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอไวรัส แต่ละชนิด 2 µl (100 ng/µl) ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 25 µl ผสมให้เข้ากันนำไปใส่เครื่องดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (Perkin Elmer Gene Amp 2400) ตั้งโปรแกรม 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 หลังจากนั้น นำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg /ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูปและบันทึกผล เปรียบเทียบผลของการใช้ไพรเมอร์แต่ละคู่ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของขนาดชิ้นและจำนวนชิ้นดีเอ็นเอระหว่างสายพันธุ์ได้ชัดเจนที่สุด

การตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AFLP

ตรวจวิเคราะห์โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Vos *et al.* (1995) และ สืบค้นข้อมูล National Center for Biotechnology Information ([http : www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) ใช้ลำดับจีโนมของไวรัสมาหาตำแหน่งตัดบนดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ <http://www.bioinformatics.vg/sms/> เพื่อเลือกชนิดเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และทราบขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดที่ตำแหน่งเป้าหมาย เพื่อความสะดวกรวดเร็วก่อนที่จะนำมาปฏิบัติการจริง (ตารางผนวกที่ 3-4) ซึ่งในการทดลองนี้เลือกใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* – *MseI*, *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ไพรเมอร์ที่เพิ่มจำนวนเบสที่ปลาย 3' จำนวน 1 และ 2 เบส มีลำดับเบส ดังนี้

adapter

<i>EcoRI</i> adapter	5' - CTCGTAGACTGCGTACC – 3'	forward
	3' – CATCTGACGCATGGTTAA – 5'	reverse
<i>MseI</i> adapter	5' – GACGATGAGTCCTGAG – 3'	
	3' – TACTCAGGACTCAT – 5'	

ไพรเมอร์

<i>EcoRI</i> primer + 0 (E-0)	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
<i>EcoRI</i> primer + 1 (E-A)	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
<i>EcoRI</i> primer + 2 (E-AA)	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA – 3'
<i>MseI</i> primer + 0 (M-0)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'

<i>MseI</i> primer + 1 (M-C)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'
<i>MseI</i> primer + 2 (M-CG)	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACG-3'

การตัดดีเอ็นเอไวรัสด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

นำสารละลายดีเอ็นเอไวรัสมาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *MseI* โดยผสมสารละลาย master mix [ddH₂O 98.2 µl, 10x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate) 12 µl, เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (20 U/µl) 0.6 µl และ เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MseI* (10 U/µl) 1.2 µl] แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอด จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอไวรัสแต่ละชนิด 2 µl (ความเข้มข้น 300 ng/µl) ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 30 µl ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 2 ชั่วโมง หรือนานข้ามคืน

ตรวจสอบความสมบูรณ์ของการตัดเอ็นไซม์ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 % ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่่าเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg/ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูป บันทึกผล

การเชื่อมดีเอ็นเอกับ adapter

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะมาเชื่อมต่อด้วย *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ผสมสารละลาย master mix [ddH₂O 67 µl, 10x T4 ligase buffer (1 mM ATP, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT, 50 ng/µl BAS) 20 µl, *EcoRI* adapter (5 pmole/µl) 4 µl, *MseI* adapter (5 pmole/µl) 8 µl และ T4 DNA ligase (400 U/µl) 1 µl] แบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอดๆ ละ 25 µl จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอไวรัสที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด 25 µl ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 50 µl ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่ อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 °C นาน 2 ชั่วโมง

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง DNA Thermal Cycle

วิธีการที่ 1 ทำการ amplification แบบ preselective amplification โดยนำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้ว มาผสมสารละลาย master mix [ddH₂O 57.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-A (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl] (ตารางที่ 1) แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอดๆ ละ 23 µl จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอไวรัสที่เชื่อมต่อกับ adapter แต่ละชนิด 2 µl ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 25 µl ผสมให้เข้ากันนำไปใส่เครื่องดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Perkin Elmer Gene Amp 2400) ตั้งโปรแกรม PCR (ตารางที่ 2) 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 2 นาที extension ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ ทำให้เกิดปฏิกิริยา dsDNA อย่างสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 6 นาที และตั้งอุณหภูมิที่ 4 °C เพื่อรอการเก็บผลิตภัณฑ์ PCR ออกจากเครื่อง แบ่งส่วนสารละลายชิ้นดีเอ็นเอ (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 °C) มาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5 % .ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่่าเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg /ml) นาน 5-10 นาที ฉ่ำ ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูปและบันทึกผล

selective amplification นำผลผลิต PCR ที่เหลือมาเจือจาง 10 เท่า ด้วยสารละลาย TE buffer แล้วนำมาเพิ่มปริมาณในขั้นตอน selective amplification โดยผสมสารละลาย master mix (ตารางที่ 1) ดังนี้

ชุดที่ 1 [ddH₂O 45.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

ชุดที่ 2 [ddH₂O 45.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-CG (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

สารละลาย master mix แต่ละชุดแบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวนชุดละ 4 หลอดๆ ละ 20 µl จากนั้นเติมผลผลิต PCR จากขั้นตอน preselective amplification แต่ละชนิด 5 µl ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 25 µl ผสมให้เข้ากันนำไปตั้งเครื่องหัดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Perkin Elmer Gene Amp 2400) ตั้งโปรแกรม PCR แบบ touchdown PCR (ตารางที่ 2) เพื่อเพิ่มโอกาสคัดเลือกเป้าหมายได้มากขึ้น และ ลดการจับคู่ของเบสที่ไม่จำเพาะ (mismatch) ดังนี้ เริ่มที่ denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing 65 °C นาน 60 วินาที extension 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น รอบที่ 2-13 ลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 °C ค่ำอื่นๆ คงเดิม แล้วต่อกับ denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 60 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 23 รอบ ตั้งอุณหภูมิที่ 4 °C เพื่อรอการเก็บผลผลิต PCR ออกจากเครื่อง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR นำผลผลิตที่ได้ มาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% .ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่ำเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg /ml) นาน 5-10 นาที ส้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูปและบันทึกผล

วิธีการที่ 2. นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อดำapter เรียบร้อยแล้ว มาผสมสารละลาย master mix (ตารางที่ 1) และ ตั้งโปรแกรม PCR (ตารางที่ 2) ดังนี้

ชุดที่ 1 [ddH₂O 57.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-A (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

ชุดที่ 2 [ddH₂O 57.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

ชุดที่ 3 [ddH₂O 57.2 µl, 10x PCR buffer 10 µl, MgCl₂ (25 mM) 6 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-CG (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

สารละลาย master mix แต่ละชุดแบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอดๆ ละ 23 µl จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอ ไวรัสที่เชื่อมต่อ adapter แต่ละชนิด 2 µl ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 25 µl ผสมให้เข้ากันนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (Perkin Elmer Gene Amp 2400) ตั้งโปรแกรม PCR (ตารางที่ 2) เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR นำผลผลิตที่ได้ มาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% .ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่ำเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg /ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูป บันทึกผล

วิธีการที่ 3. นำดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อ adapter เรียบร้อยแล้ว มาผสมสารละลาย master mix (ตารางที่ 1) และ ตั้งโปรแกรม PCR แบบ touchdown PCR (ตารางที่ 2) ดังนี้

ชุดที่ 1 [ddH₂O 59.2 µl, 10x PCR buffer/ MgCl₂ (25 mM) 10 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-A (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

ชุดที่ 2 [ddH₂O 59.2 µl, 10x PCR buffer/MgCl₂ (25 mM) 10 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-C (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

ชุดที่ 3 [ddH₂O 59.2 µl, 10x PCR buffer/ MgCl₂ (25 mM) 10 µl, dNTP (2mM) 10 µl, primer *EcoRI*-AA (5 pmole/ µl) 4 µl, primer *MseI*-CG (5 pmole/ µl) 4 µl และ Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0.8 µl]

สารละลาย master mix แต่ละชุดแบ่งใส่หลอดทดลอง ขนาด 300 µl จำนวน 4 หลอดๆ ละ 22 µl จากนั้นเติมสารละลายดีเอ็นเอ ไวรัสที่เชื่อมต่อ adapter แต่ละชนิด 3 µl ปริมาตรรวมแต่ละหลอด เท่ากับ 25 µl ผสมให้เข้ากันนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle

(Perkin Elmer Gene Amp 2400) โดยตั้งโปรแกรม PCR แบบ touchdown PCR (ตารางที่ 2) เพื่อเพิ่มโอกาสคัดเลือกเป้าหมายได้มากขึ้น และ ลดการจับคู่ของเบสที่ไม่จำเพาะ (mismatch) ดังนี้ เริ่มที่ preheat ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 2 นาที denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 60 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้น รอบที่ 2-13 ลดอุณหภูมิในขั้นตอน annealing ลงรอบละ 0.7 °C แล้วต่อกับ denaturing ที่อุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C นาน 60 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 °C นาน 60 วินาที จำนวน 23 รอบ ตั้งอุณหภูมิต่ำที่ 4 °C เพื่อรอการเก็บผลผลิต PCR ออกจากเครื่อง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา PCR นำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.5% .ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่่าเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 µg /ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบนเครื่อง UV transilluminator เพื่อถ่ายรูปและบันทึกผล

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบ PCR master mix (4x) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP

วิธีการ	10x PCR buffer (μ l)	25 mM MgCl ₂ (μ l)	dNTP (2mM) (μ l)	primer (5 pmole/ μ l) (μ l)		Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) (μ l)	ddH ₂ O (μ l)	Total (μ l)
<u>วิธีการที่ 1</u>								
Preselective	10	6	10	<i>EcoRI</i> -A 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	57.2	92
Selective								
ชุดที่ 1	10	6	10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	45.2	80
ชุดที่ 2	10	6	10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -CG 4	0.8	45.2	80
<u>วิธีการที่ 2</u>								
ชุดที่ 1	10	6	10	<i>EcoRI</i> -A 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	57.2	92
ชุดที่ 2	10	6	10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	57.2	92
ชุดที่ 2	10	6	10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -CG 4	0.8	57.2	92
<u>วิธีการที่ 3</u>	10x PCR buffer/ 25 mM MgCl ₂							
ชุดที่ 1	10		10	<i>EcoRI</i> -A 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	59.2	88
ชุดที่ 2	10		10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -C 4	0.8	59.2	88
ชุดที่ 2	10		10	<i>EcoRI</i> -AA 4	<i>MseI</i> -CG 4	0.8	59.2	88

ตารางที่ 2 โปรแกรม PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP

วิธีการ	PCR reaction conditions ^a				
	step	denaturing	annealing	extension	no. of cycles
<u>วิธีการที่ 1</u>					
Preselective	1	94 °C, 30 s	56 °C, 2 min	70 °C, 1 min	40
Selective	1	94 °C, 30 s	65 °C, 1 min	72 °C, 1 s	1
	2	94 °C, 30 s	65 °C ^b , 1 min	72 °C, 1 s	12
	3	94 °C, 30 s	56 °C, 1 min	72 °C, 1 min	23
<u>วิธีการที่ 2</u>	1	94 °C, 30 s	56 °C, 2 min	70 °C, 1 min	40
<u>วิธีการที่ 3</u>					
	1	94 °C, 30 s	65 °C, 1 min	72 °C, 1 s	1
	2	94 °C, 30 s	65 °C ^b , 1 min	72 °C, 1 s	12
	3	94 °C, 30 s	56 °C, 1 min	72 °C, 1 min	23

หมายเหตุ ^a ทุกปฏิกิริยาใช้เงื่อนไข initial denaturing 94 °C นาน 2 นาที 1 รอบ และ ensure dsDNA 72 °C นาน 6 นาที

^b ลดอุณหภูมิลงรอบละ 0.7 °C แล้วจึง ต่อด้วย step ที่ 3

วิเคราะห์ผลลักษณะลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ได้จากการใช้เทคนิคแบบ PCR-based typing ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 4 ชุด จากการออกแบบจากยีน 3 ชนิด และ เทคนิค AFLP ด้วยการใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด 3 วิธีการ เปรียบเทียบผลความแตกต่างที่ชัดเจน รวดเร็ว เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจจำแนกสายพันธุ์ไวรัสดั้งเดิม เพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดมาตรฐานของชีวภัณฑ์ได้ต่อไป

สถานที่ดำเนินการวิจัย

ดำเนินการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์พื้นพิภพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี ห้องปฏิบัติการ ศูนย์สังเคราะห์ภาพระดับนาโน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ และ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัย พัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์

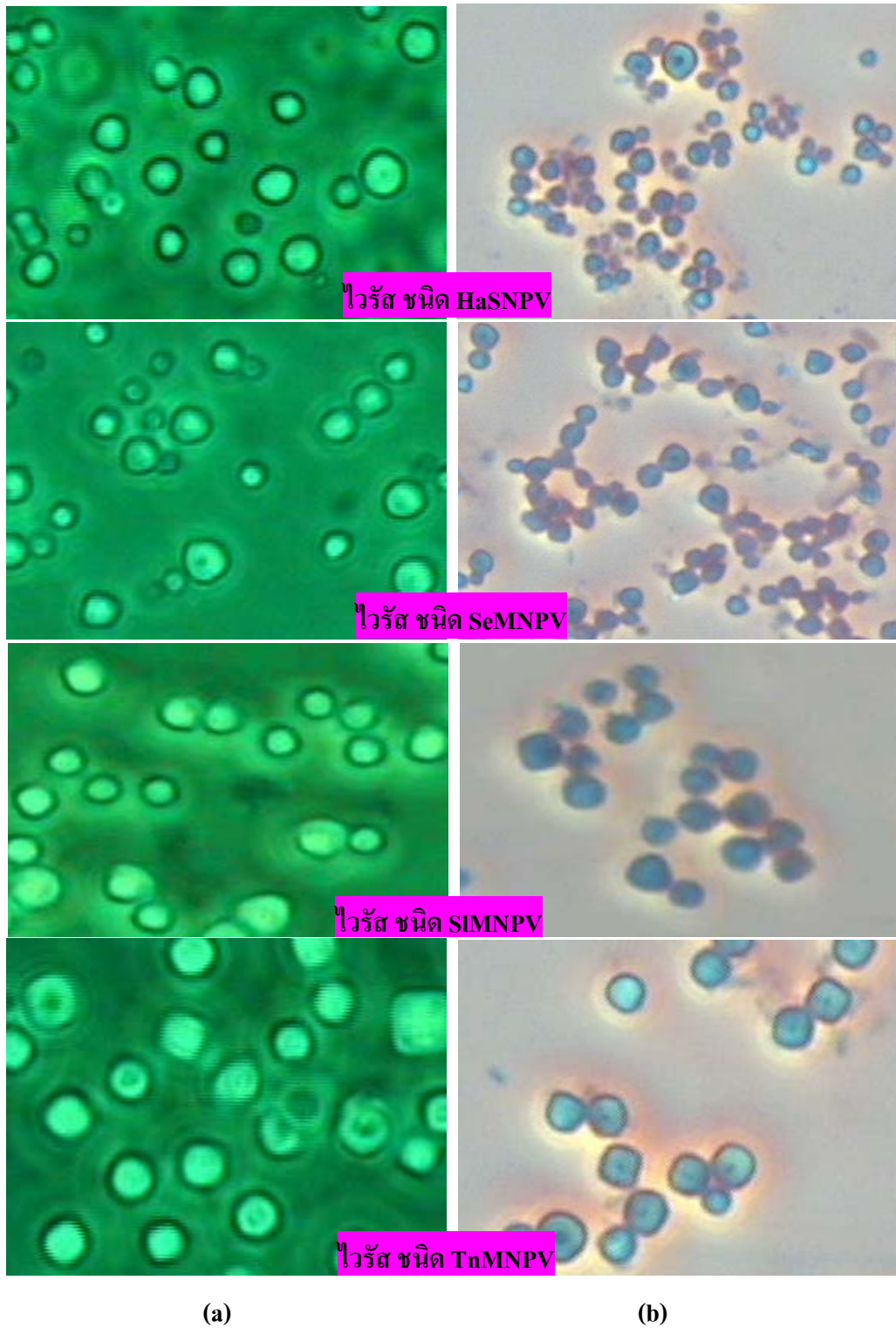
ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างผลึกไวรัสที่เก็บเกี่ยวจากตัวหนอนไถ่ตาย

จากการเก็บเกี่ยวผลึกไวรัสจากตัวหนอนไถ่ตาย ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ไวรัส HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยกำจัดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ได้ โดยง่ายและสามารถนำผลึกไวรัสไปใช้ได้ดี ลักษณะผลึกไวรัสที่เก็บเกี่ยวจากตัวหนอนไถ่ตายมีสีขาว และติดสีฟ้าเมื่อย้อมสีด้วย Giemsa เมื่อตรวจดูจากการเตรียมสไลด์สด (wet mount) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แบบ light compound microscope ด้วยระบบแสง phase contrast กำลังขยาย 1,000x พบว่า ผลึกมีลักษณะเป็นเหลี่ยมมีหลายขนาดปะปนกันในแต่ละชนิด (ภาพที่ 1) เมื่อนำไปวัดขนาดด้วยเครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ sysmex SD-2000 พบว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลึกไวรัส HaSNPV มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.89 ไมครอน SeMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.91 ไมครอน SIMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 4.08 ไมครอน และ TnMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 3.73 ไมครอน (ตารางที่ 3) ซึ่งอยู่ในช่วงเดียวกับ Rohrmann (1986) รายงานว่า ไวรัสสกุล NPV ทั่วไปมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลึก ประมาณ 0.5-15 μm

ตารางที่ 3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกไวรัส เมื่อวัดด้วยเครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Sysmex SD-2000

ชนิดไวรัส	จำนวน ผลึกไวรัส (ผลึก)	ค่าเฉลี่ยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ไมครอน)						
		Mean Diam.	Mode Diam.	90% Diam.	50% Diam.	10% Diam.	Diam. SD	Diam CV
HaSNPV	58,452	2.89	2.00	3.75	2.86	2.10	0.80	27.70
SeMNPV	57,243	3.91	3.00	4.63	3.71	3.11	0.69	17.7
SIMNPV	59,338	4.08	3.93	4.99	3.93	3.15	0.76	18.0
TnMNPV	60,004	3.73	3.03	4.46	3.65	3.10	0.55	14.9

หมายเหตุ SD = standard deviation, CV = coefficient of variation



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบลักษณะผลึกไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light compound microscope) โดยใช้ระบบ phase contrast (a) และ ลักษณะผลึกไวรัสดัดสีฟ้าของสี Giemsa (b) กำลังขยาย 1,000 x

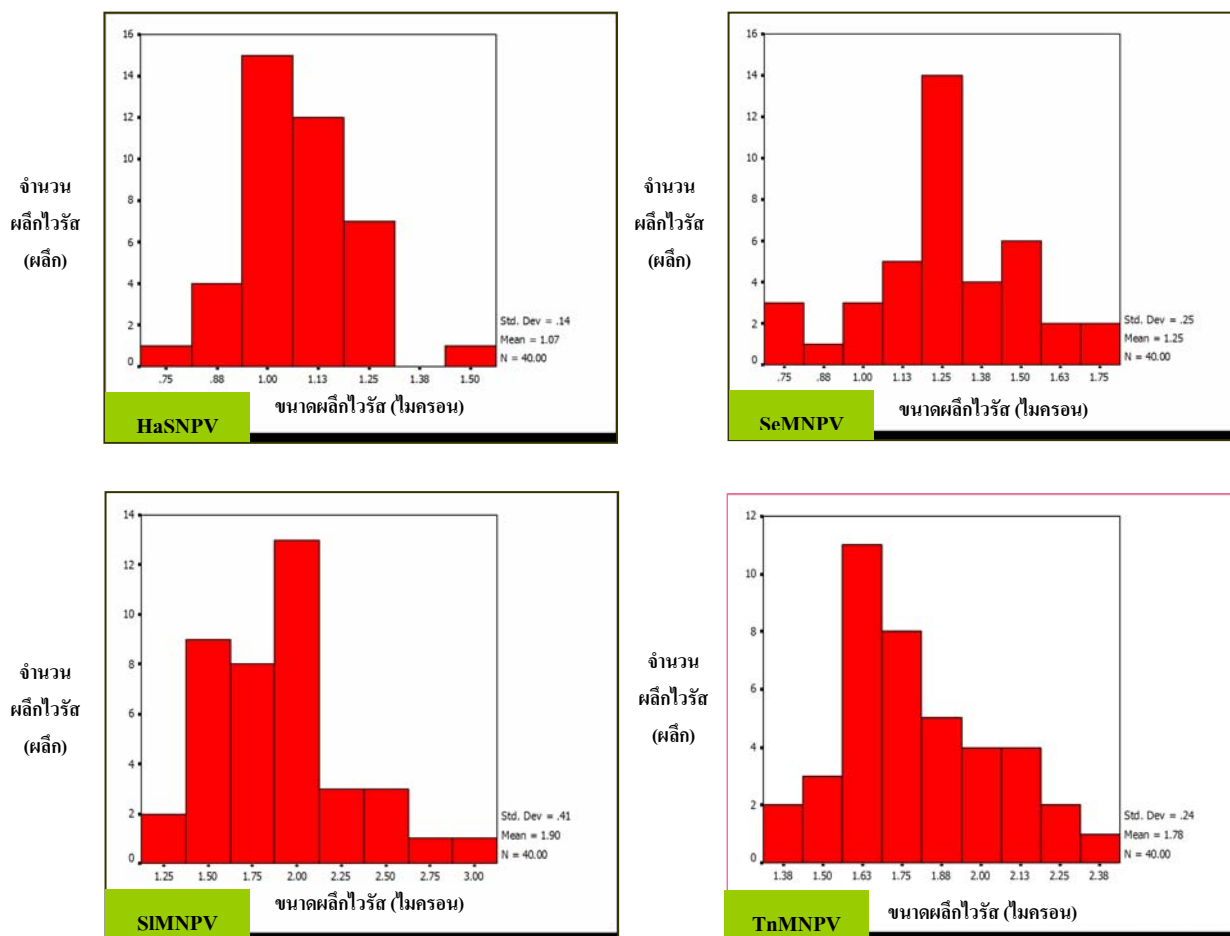
ผลการศึกษารูปร่างและขนาดผลึกไวรัสจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

รูปร่างผลึกไวรัสและอนุภาคไวรัสเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 8,000x เท่ากัน พบว่า ผลึกไวรัสทั้ง 4 ชนิด มีลักษณะทรงกลม พื้นผิวผลึกมีเหลี่ยมขนาดต่างๆกัน ผลึกมีสีขาว เมื่อส่องวัดขนาดจากจำนวน 40 ผลึก/ชนิด ทำให้ทราบขนาดผลึกไวรัส HaSNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 0.76 - 1.46 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 ไมครอน SeMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 0.70 - 1.77 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.25 ไมครอน SIMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 1.33 - 3.04 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.90 ไมครอน และ TnMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 1.39 - 2.34 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.78 ไมครอน (ตารางที่ 4) และ ปริมาณผลึกแต่ละขนาดของผลึกมีปริมาณแตกต่างกัน (ภาพที่ 2) ขนาดของผลึกที่มีขนาดแตกต่างกันจะมีผลต่อจำนวนอนุภาคไวรัส นั่นคือปริมาณของดีเอ็นเอที่ต่างกันด้วย ซึ่งทิพย์วดี (2549) รายงานไว้ว่าไวรัส HaSNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.98 ไมครอน SeMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1.4 ไมครอน และ TnSNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 1.4 ไมครอน นอกจากนี้จะเห็นว่า ผลึกไวรัสทุกชนิดจะมีขนาดเล็กกว่าการวัดขนาดผลึกไวรัสด้วย เครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer ที่ผลึกไวรัสไม่ได้ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง โดยไวรัส ชนิด HaSNPV มีขนาดลดลง 1.82 ไมครอน SeMNPV มีขนาดลดลง 2.66 ไมครอน SIMNPV มีขนาดลดลง 2.18 ไมครอน และ TnMNPV มีขนาดลดลง 1.95 ไมครอน ซึ่งการทดลองลักษณะนี้ยังไม่มีการรายงานเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดผลึกไวรัสที่วัดด้วยเครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer และ ขนาดที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ตารางที่ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกไวรัสโรคแมลง ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV สุ่มเฉลี่ยจากผลึกไวรัส จำนวน 40 ผลึก/ชนิด จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

ชนิด ไวรัส	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (ไมครอน)			
	Mean	SD	Min.	Max.
HaSNPV	1.0688	0.1428	0.7600	1.4567
SeMNPV	1.2493	0.2451	0.6967	1.7733
SIMNPV	1.8952	0.4073	1.3300	3.0400
TnMNPV	1.7844	0.2446	1.3933	2.3433

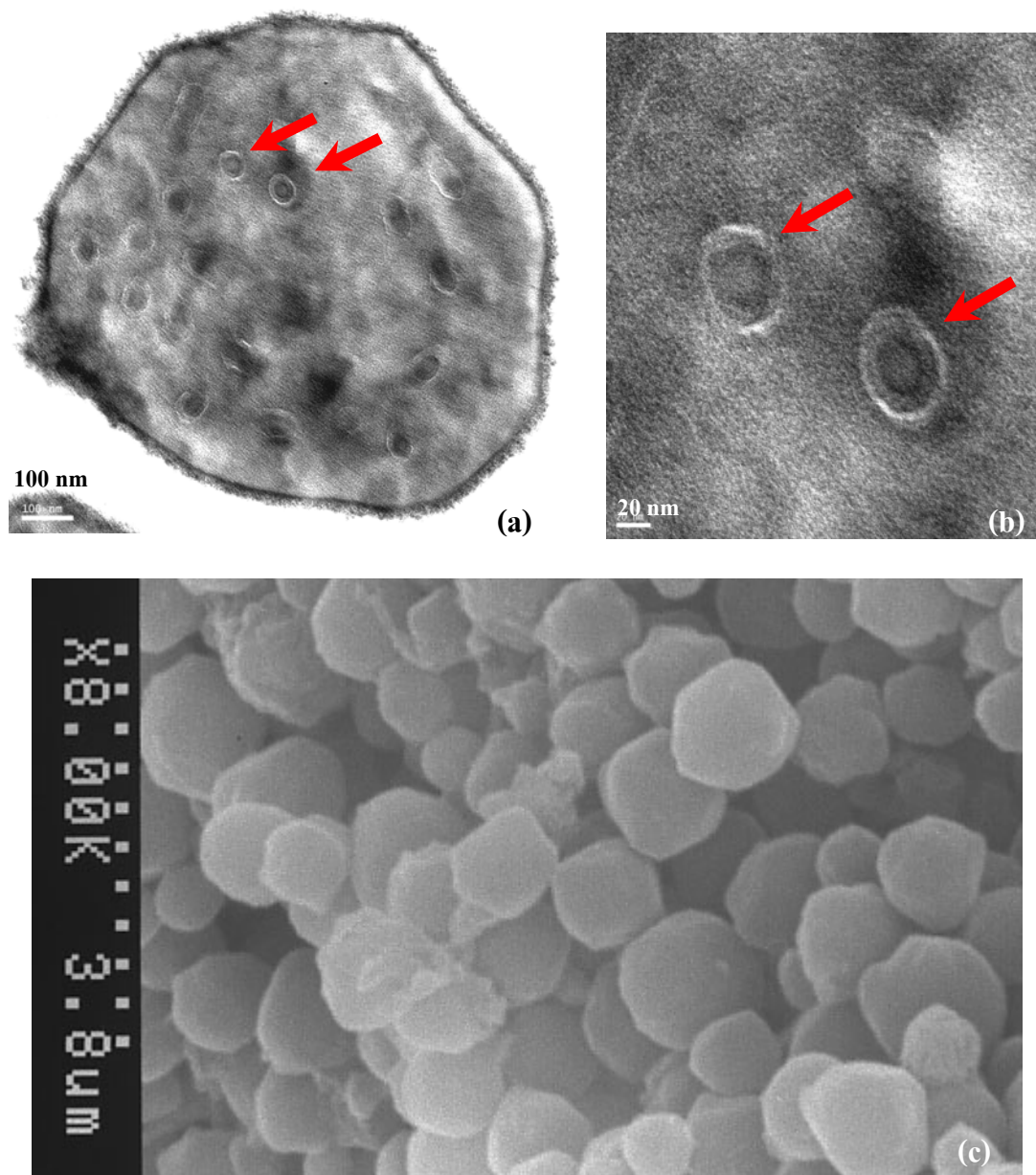
หมายเหตุ SD = standard deviation



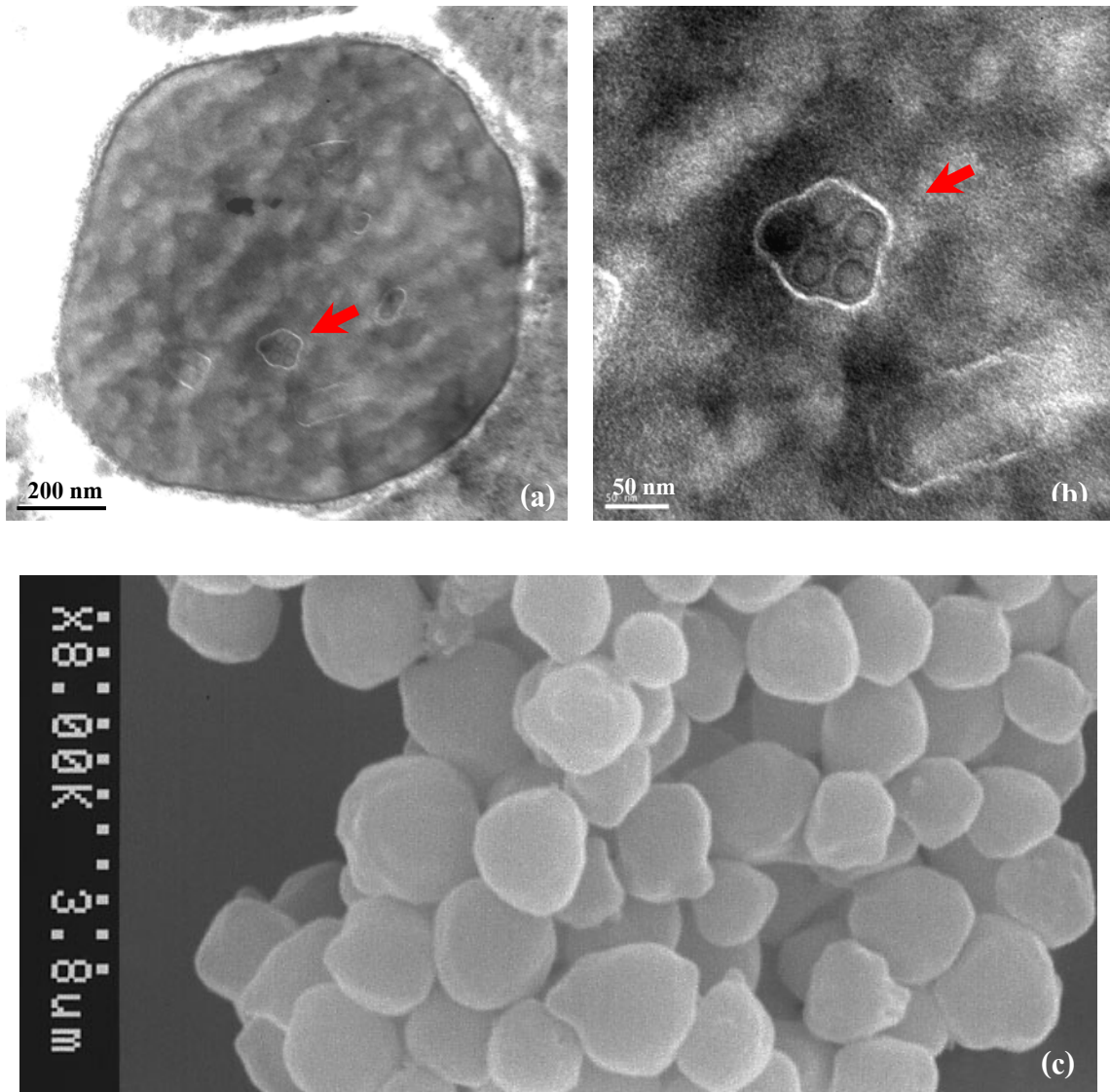
ภาพที่ 2 ปริมาณผลึกแต่ละขนาดของผลึกไวรัสโรคแมลง ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV จากจำนวนผลึก 40 ผลึก/ชนิด

ผลการศึกษารูปร่างและขนาดผลึกไวรัสจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน พบลักษณะของผลึกไวรัสที่ทดลองวิจัยมีหลายเหลี่ยมชัดเจน อนุภาคไวรัส HaSNPV มี nucleocapsid จำนวน 1 แท่ง/อนุภาค จัดเป็นแบบ single - nucleocapsid NPV (SNPV) และ ทำให้ทราบอนุภาคไวรัส แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) ในผลึกเดียวกันพบว่ามีจำนวน nucleocapsids แตกต่างกัน อนุภาคไวรัส SeMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1, 3, 4, 5 แท่ง/อนุภาค อนุภาคไวรัส SIMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1,3,7,8,9 แท่ง/อนุภาค และ อนุภาคไวรัส TnMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple -

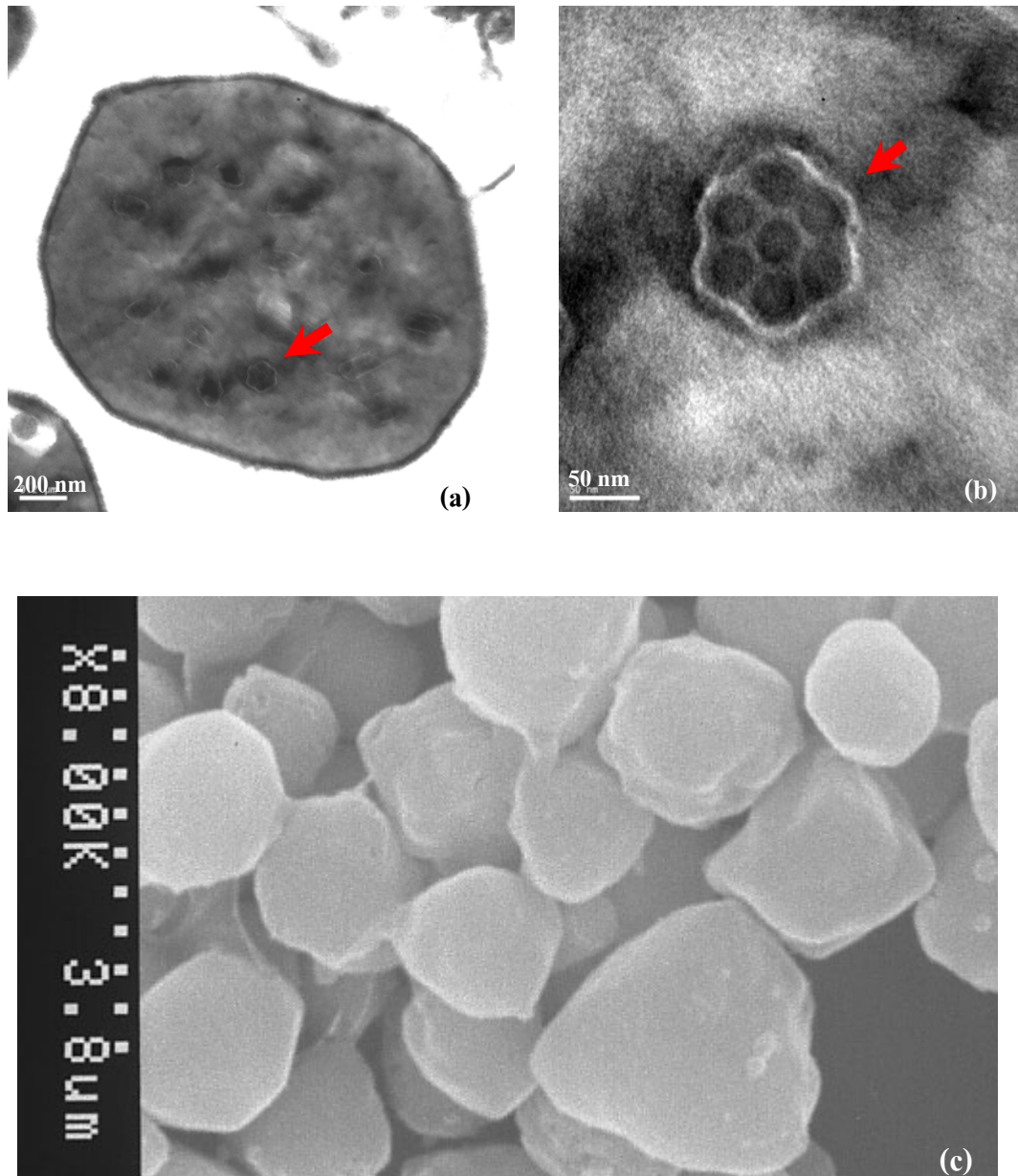
nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1,2,4,6,7,8,11 แท่ง/อนุภาค (ภาพที่ 3, 4, 5 และ 6) ทำให้ทราบว่าไวรัสที่ศึกษาเป็น ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV, TnMNPV ซึ่ง HaSNPV มีลักษณะตรงกับรายงานของทิพย์วดี (2549) Khan *et al.* (2004) Lange *et al.* (2004) และ Zhang *et al.* (2005) SeMNPV มีลักษณะตรงกับรายงานของทิพย์วดี (2549) Jakubowska *et al.* (2006) และ Lange *et al.* (2004) SIMNPV มีลักษณะตรงกับรายงานของ Pang *et al.* (2001) แต่ TnMNPV มีลักษณะที่ต่างจากรายงานของทิพย์วดี (2549) และ Willis *et al.* (2005) ที่รายงานว่าเป็น แบบ single - nucleocapsid NPV



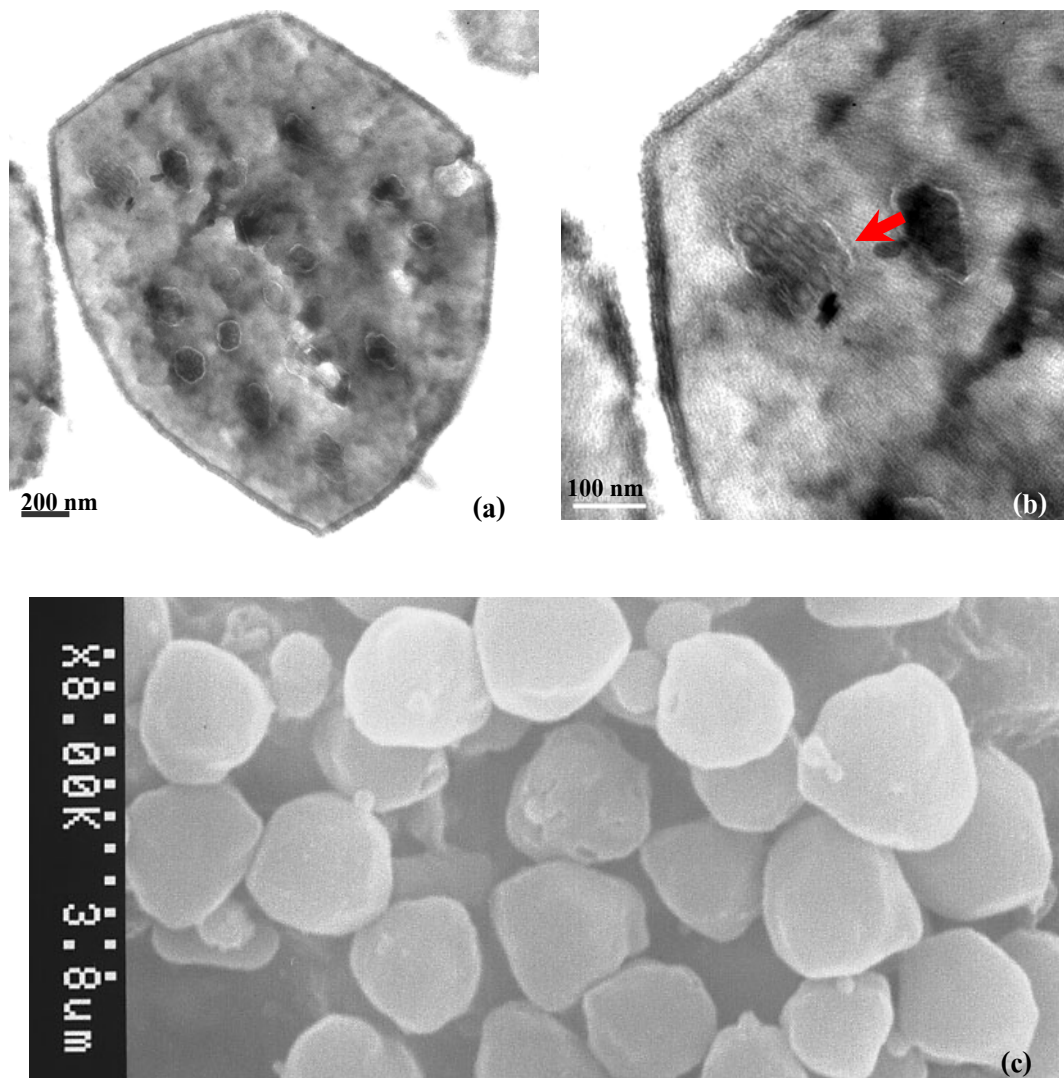
ภาพที่ 3 ลักษณะผลึกไวรัสชนิด HaSNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายขนาดอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8,000x (c)



ภาพที่ 4 ลักษณะผลึกไวรัสชนิด SeMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายขนาดอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด 8,000x (c)



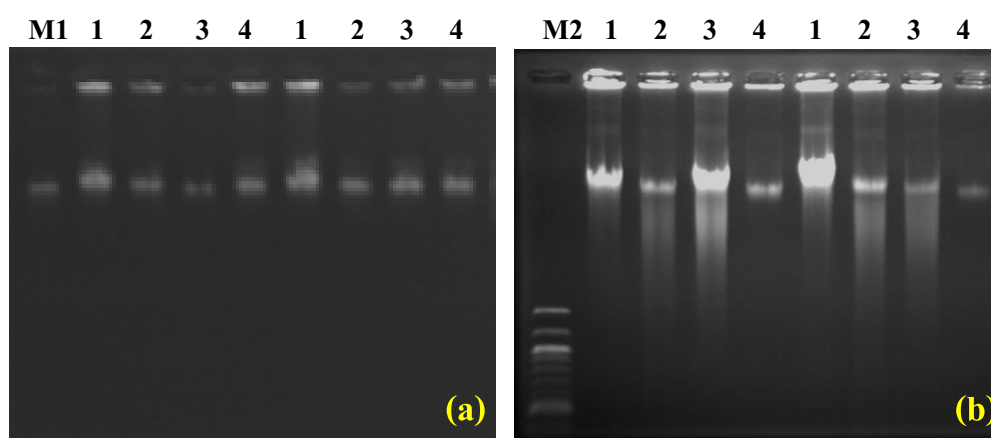
ภาพที่ 5 ลักษณะผลึกไวรัส ชนิด SIMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายส่วนอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8,000x (c)



ภาพที่ 6 ลักษณะผลึกไวรัส ชนิด TnMNPV ที่บันทึกภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (a) ภาพขยายส่วนอนุภาคไวรัสแสดงจำนวน nucleocapsid ตำแหน่งลูกศรชี้ (b) และภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด 8,000x (c)

ผลการสกัดดีเอ็นเอจากผลึกไวรัส NPV

การสกัดดีเอ็นเอจากผลึกไวรัสสกุล Nucleopolyhedrovirus ที่เก็บจากหนอนเป็นโรค ตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Hunter - Fujita *et al.* (1998) และ Christian *et al.* (2001) โดยละลายผลึกไวรัสด้วย 1 M Na_2CO_3 ก่อนแล้วจึงเติม 0.5 M EDTA และ 1 M NaCl จะเห็นว่าปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นประมาณ 1-3 เท่า (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแบบไม่ละลายผลึกไวรัสด้วย 1 M Na_2CO_3 ก่อนเติม 0.5 M EDTA และ 1 M NaCl (a) และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแบบละลายผลึกไวรัสด้วย 1 M Na_2CO_3 ก่อนเติม 0.5 M EDTA และ 1 M NaCl (b) (M1 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 50 μg , M2 = ดีเอ็นเอมาตรฐาน, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV)

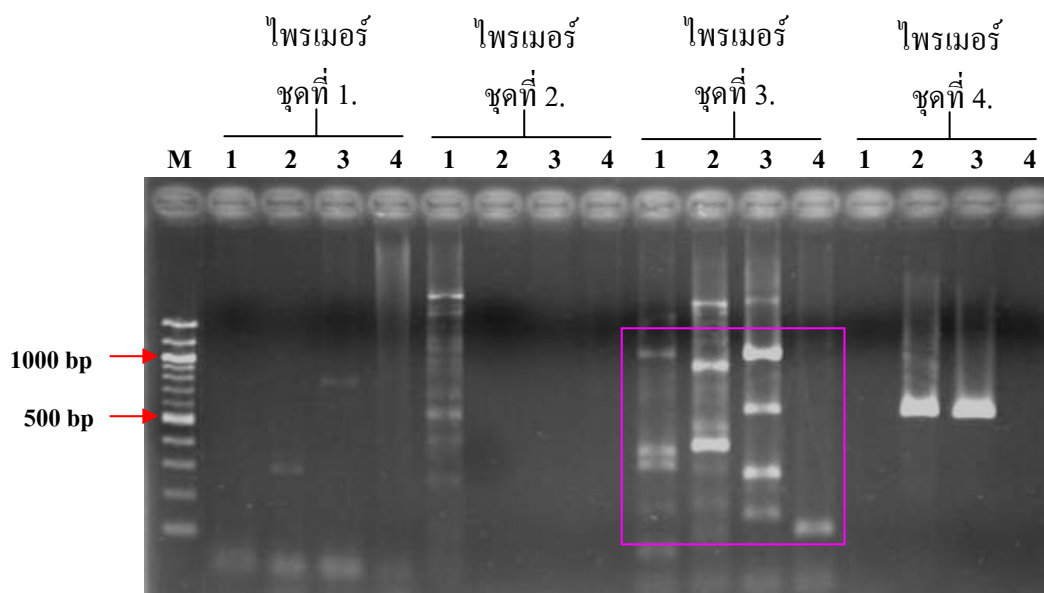
ผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR – Base Typing

คัดเลือกยีนของไวรัส 3 ยีน ได้แก่ ยีน chitinase, polyhedrin และ cathepsin ใช้ออกแบบไพรเมอร์ แบบ degenerate primer ได้ไพรเมอร์ 4 ชุด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. chitinase forward primer & chitinase reverse primer ไพรเมอร์ชุดที่ 2. polyhedrin forward primer I. & polyhedrin reverse primer I ไพรเมอร์ชุดที่ 3. cathepsin forward primer & cathepsin reverse primer และไพรเมอร์ชุดที่ 4. polyhedrin forward primer II. & polyhedrin reverse primer II พบว่า

ไพรเมอร์ชุดที่ 1 และ 2 ไม่แสดงผลลายพิมพ์ของดีเอ็นเอ (ภาพที่ 8) ทำให้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของชนิดไวรัส กรณีไพรเมอร์ชุดที่ 4 หลังทำปฏิกิริยา PCR แล้วได้ขนาดดีเอ็นเอเพียง 2 ชนิด คือ SeMNPV และ SIMNPV ที่เท่ากัน จะต้องเพิ่มขึ้นตอนโดยใช้เทคนิค RFLP มาร่วมด้วย โดยการคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกัน ซึ่งก็จะสามารถตรวจวิเคราะห์ชนิดได้เช่นเดียวกับวิธีการของ Christian *et al.* (2001) ที่ใช้เทคนิค RFLP โดยการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากการเปรียบเทียบลำดับเบสจากยีน polyhedrin และมีลำดับและใช้เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR ดังนี้ initial denature 95°C นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ denature 95°C นาน 30 วินาที annealing 45°C นาน 30 วินาที extension 72°C นาน 40 วินาที จำนวน 5 รอบ และ denature 95°C นาน 30 วินาที annealing 50°C นาน 30 วินาที extension 72°C นาน 40 วินาที จำนวน 30 รอบ อย่างไรก็ตามไพรเมอร์คู่นี้จะทำให้เพิ่มเวลาในการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะอีกขั้นตอนหนึ่ง

ไพรเมอร์ชุดที่ 3 cathepsin forward primer และ cathepsin reverse primer ที่ออกแบบจากยีน cathepsin ให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันอย่างชัดเจน ปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ไวรัสที่ได้มีปริมาณสูง ทำให้จำแนกไวรัสทั้ง 4 ชนิดได้ดีกว่า ไพรเมอร์อีก 3 ชุด จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอแสดงขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ชัดเจนในการใช้จำแนกของไวรัส คือ ไวรัส HaSNPV ขนาด 350 และ 300 คู่เบส ไวรัส SeMNPV ขนาด 400 คู่เบส ไวรัส SIMNPV ขนาด 550 และ 250 คู่เบส ไวรัส TnMNPV ขนาด 100 คู่เบส และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดไวรัสนั้นๆ ได้ เนื่องจากมีความแตกต่างอย่างชัดเจน ทั้งนี้ภายใต้เงื่อนไขการทำปฏิกิริยา PCR เดียวกัน (ภาพที่ 8) และการมีสมบัติของไพรเมอร์ที่เหมาะสมกว่าไพรเมอร์คู่อื่น (ตารางผนวกที่ 4)

จากผลการทดลอง ทำให้ทราบว่าเวลาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดไวรัส NPV ด้วยเทคนิค PCR - based typing และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบ degenerate primer จากยีน cathepsin ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอไวรัสจนถึงการอ่านผล เพียง 16 ชั่วโมง นับว่าเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีการวินิจฉัยร้อยละการตายของหนอนแมลงที่จะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน ดังนั้นการเลือกใช้วิธีการนี้จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในงานบริการได้อย่างรวดเร็ว อนึ่ง ยังไม่พบรายงานการวิจัยอื่นที่ใช้ยีน cathepsin ในการตรวจไวรัส NPV ทั้ง 4 ชนิด



ภาพที่ 8 ทรายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV SeMNPV SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% อะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค PCR – base typing เปรียบเทียบไพรเมอร์ทั้ง 3 ชุดที่ออกแบบจากยีน 3 ยีน คือ ไพรเมอร์ ชุดที่ 1. chitinase forward primer & chitinase reverse primer ไพรเมอร์ ชุดที่ 2. polyhedrin forward primer I & polyhedrin reverse primer I ไพรเมอร์ ชุดที่ 3. cathepsin forward primer & cathepsin reverse primer และ ไพรเมอร์ ชุดที่ 4. polyhedrin forward primer II & polyhedrin reverse primer II (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV)

ผลการตรวจวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม DNA ด้วยเทคนิค AFLP

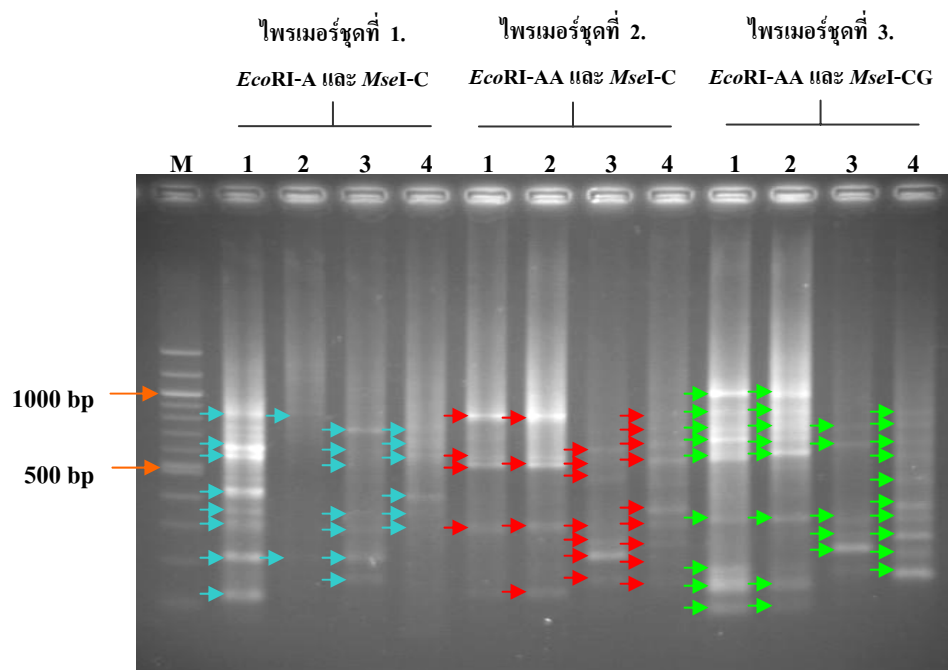
ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัสทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ไพรเมอร์ทั้ง 3 แบบจากการ amplification ทั้ง 3 วิธีการ ดังนี้

วิธีการที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด ดังนี้ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C และไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิบัติ PCR แบบ preselective amplification และ selective amplification (ตารางที่ 2) มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบจากขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 9) ดังนี้

ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 850, 650, 530, 420, 350, 300, 200, 120 คู่เบส SeMNPV ขนาด 850, 120 คู่เบส SIMNPV ขนาด 750, 650, 550, 380, 280, 200, 150 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 750, 650, 550, 400, 380, 280 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 530, 420, 350, 300 คู่เบส SeMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง SIMNPV ขนาด 180 คู่เบส TnMNPV ขนาด 400 คู่เบส

ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 800, 550, 500, 290 คู่เบส SeMNPV ขนาด 800, 500, 290, 120 คู่เบส SIMNPV ขนาด 530, 500, 480, 300, 250, 200, 100 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 800, 700, 650, 550, 350, 300, 250, 200, 150 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 550 คู่เบส SeMNPV ขนาด 500, 120 คู่เบส SIMNPV ขนาด 530, 480, 100 คู่เบส TnMNPV ขนาด 700, 650, 350, 150 คู่เบส

ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 990, 850, 750, 650, 550, 300, 230, 210, 50 คู่เบส SeMNPV ขนาด 990, 850, 750, 650, 550, 300, 210 คู่เบส SIMNPV ขนาด 750, 650, 300, 240, 220 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 850, 750, 650, 550, 450, 350, 300, 250, 200, 150 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV มีขนาด 330, 230, 210, 300 คู่เบส SeMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง SIMNPV ขนาด 240, 220 คู่เบส TnMNPV ขนาด 450, 350, 250, 200, 150 คู่เบส



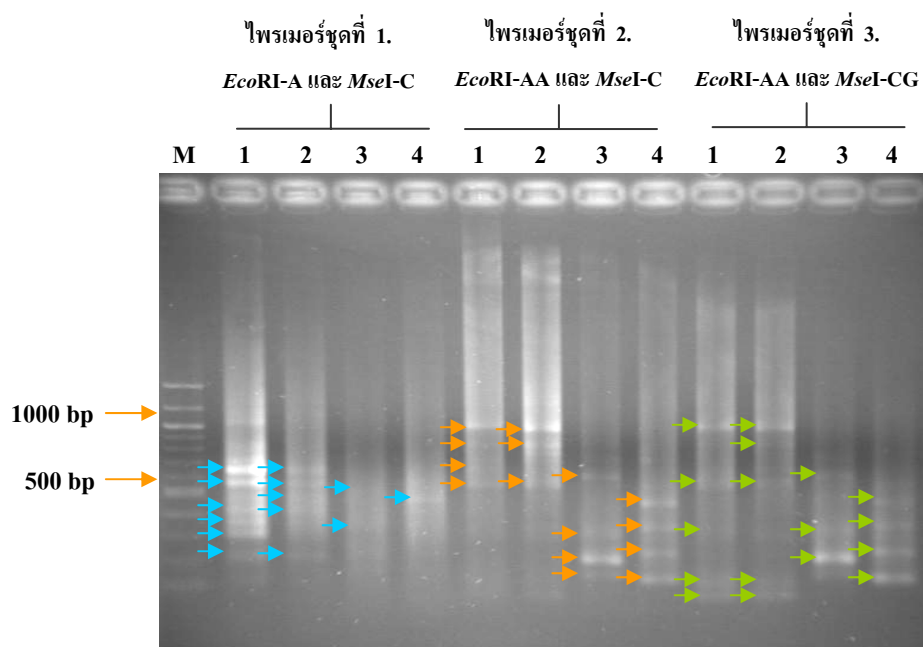
ภาพที่ 9 ปลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% อะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรเมอร์แต่ละคู่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 1 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งปลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)

วิธีการที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด ดังนี้ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C และไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิบัติ PCR ที่กำหนด (ตารางที่ 2) มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบจากขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 10) ดังนี้

ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 1000, 650, 550, 450, 350, 250, 200 คู่เบส SeMNPV ขนาด 650, 550, 450, 350, 200 คู่เบส SIMNPV ขนาด 550, 350 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 450 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 1000, 250 คู่เบส SeMNPV SIMNPV TnMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง

ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 950, 850, 650, 550 คู่เบส SeMNPV ขนาด 950, 850, 500 คู่เบส SIMNPV ขนาด 550, 350, 200, 150 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 450, 350, 250, 150 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 650 คู่เบส SeMNPV ขนาด 500 คู่เบส SIMNPV ขนาด 200 คู่เบส TnMNPV ขนาด 450, 250 คู่เบส

ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 950, 550, 350, 150, 50 คู่เบส SeMNPV ขนาด 950, 850, 550, 150, 50 คู่เบส SIMNPV ขนาด 550, 350, 200 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 450, 350, 250, 150 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 50 คู่เบส SeMNPV ขนาด 850 คู่เบส SIMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง TnMNPV ขนาด 450, 250 คู่เบส



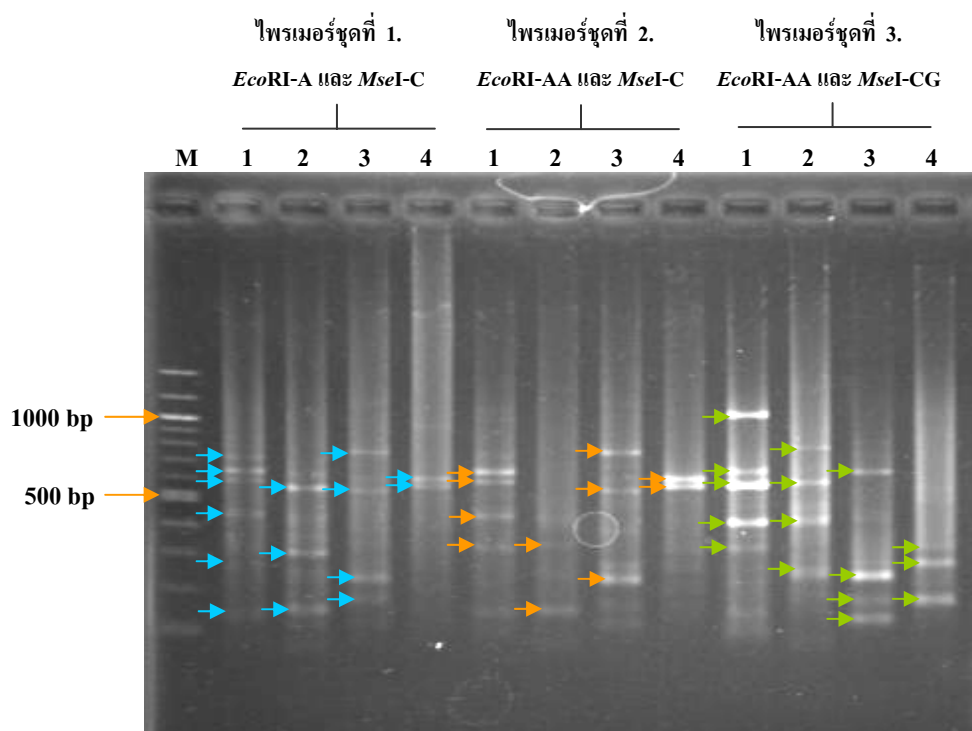
ภาพที่ 10 ปลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% อะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรมอร์แต่ละคู่ ไพรมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI-A* และ *MseI-C* ไพรมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI-AA* และ *MseI-C* ไพรมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI-AA* และ *MseI-CG* ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 2 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)

วิธีการที่ 3 ใช้ไพรเมอร์ 3 ชุด ดังนี้ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C และ ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิบัติ PCR ที่กำหนด (ตารางที่ 2) มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เปรียบเทียบจากขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 11) ดังนี้

ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 700, 650, 600, 450, 280 และ 150 คู่เบส SeMNPV ขนาด 550, 300 และ 150 คู่เบส SIMNPV ขนาด 700, 550, 250, 180 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 600, 550 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 650, 450, 280 คู่เบส SeMNPV ขนาด 300 คู่เบส SIMNPV ขนาด 250, 180 คู่เบส TnMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง

ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 650, 600, 400, 300 คู่เบส SeMNPV ขนาด 300, 150 คู่เบส SIMNPV ขนาด 700, 550, 250 bp และ TnMNPV ขนาด 600, 550 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 650, 400 คู่เบส SeMNPV ขนาด 150 คู่เบส SIMNPV ขนาด 700, 250 คู่เบส TnMNPV ไม่มีขนาดลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่าง

ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ทำให้มีลายพิมพ์ไวรัสชนิด HaSNPV ขนาด 1000, 650, 600, 400, 350 คู่เบส SeMNPV ขนาด 750, 550, 400, 300 คู่เบส SIMNPV ขนาด 650, 250, 200, 150 คู่เบส และ TnMNPV ขนาด 300, 250, 180 คู่เบส มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างของไวรัสทั้ง 4 ชนิด ดังนี้ HaSNPV ขนาด 1000, 600, 350 คู่เบส SeMNPV ขนาด 750, 550 คู่เบส SIMNPV ขนาด 200, 150 คู่เบส TnMNPV ขนาด 180 คู่เบส



ภาพที่ 11 ปลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไวรัส ชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ที่ปรากฏใน 1.5% อะกาโรสเจล โดยใช้เทคนิค AFLP เปรียบเทียบไพรมเมอร์แต่ละคู่ไพรมเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI-A* และ *MseI-C* ไพรมเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI-AA* และ *MseI-C* และไพรมเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI-AA* และ primer *MseI-CG* ปฏิบัติ PCR วิธีการที่ 3 (M = Marker, 1 = HaSNPV, 2 = SeMNPV, 3 = SIMNPV และ 4 = TnMNPV, ลูกศร = ตำแหน่งลายพิมพ์ดีเอ็นเอ)

จากผลการทดลองจะเห็นว่า ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค AFLP ทั้ง 3 วิธีการ นั้นวิธีการที่ 3 ที่ใช้ไพรเมอร์ ชุดที่ 3 primer *EcoRI*-AA และ primer *MseI*-CG สามารถจำแนกไวรัสทั้ง 4 ชนิด ได้ชัดเจนกว่าชุดอื่นๆ เนื่องจาก มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเฉพาะในแต่ละชนิดครบทั้ง 4 ชนิด และมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันในตำแหน่งที่ง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิด เนื่องจากตำแหน่งที่เข้าสู่ของเบสไพรเมอร์มีตำแหน่งเฉพาะน้อยกว่าไพรเมอร์ชุดอื่น ทำให้เกิดการแข่งขั้นน้อย ไพรเมอร์เข้าสู่ของเบสได้ดีขึ้น และในวิธีการที่ 3 มีการใช้ $MgCl_2$ ผสมรวมใน TE buffer ต่างจาก 2 วิธีการแรก ชุดเดียวกับที่ใช้ในเทคนิค PCR-based typing ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ชัดเจนกว่า แสดงว่าปริมาณ $MgCl_2$ เหมาะสมในการทำ amplification ภายใต้งีออนไนต์ ด้วยเป็นที่ทราบกันดีว่าถ้าในปฏิกิริยามีการแตกตัวของ Mg^{2+} น้อย จะทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้น้อยไปด้วย และ ถ้าในปฏิกิริยามีการแตกตัวของ Mg^{2+} มาก จะทำให้พันธะที่จับกันของเบสที่แน่นหนาจนทำให้ดีเอ็นเอแยกสายได้น้อย และวิธีการที่ 3 นี้ยังใช้เวลาขั้นตอนเดียวในการ amplification ซึ่งปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการที่ 3 มีความเหมาะสมมากกว่า 2 วิธีการแรก เพราะมีการตั้งงีออนไนต์ โปรแกรม PCR แบบ touchdown PCR เพื่อเพิ่มโอกาสคัดเลือกเป้าหมายได้มากขึ้น และลดการจับคู่ของเบสที่ไม่จำเพาะ

สำหรับไพรเมอร์ชุดที่ 1 และ 2 ผลผลิตพีซีอาร์ที่น้อยกว่าไม่ชัดเจน และทำให้ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอไม่เหมือนกันได้ แม้ในงีออนไนต์ปฏิกิริยา PCR ที่เหมือนกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไพรเมอร์มีขนาดของ nucleotide 16 และ 17 คู่เบส (ตารางผนวกที่ 5) ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าที่ส่วนใหญ่มักจะให้อยู่ที่ 18-30 คู่เบส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าสู่เกิดการจับกันของ H-bond ได้แข็งแรง อยู่ตัวกว่า ทำให้ผลการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอได้ดีขึ้น จะทำให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มากขึ้น ในกรณีนี้ขนาดของไพรเมอร์จะเป็นสิ่งสำคัญถึงแม้ว่าจะมีการเชื่อมต่อกับ adapter ไว้ก่อนแล้ว

การตรวจลักษณะทางพันธุกรรมดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค AFLP นี้ สามารถอ่านผลความแตกต่างได้ด้วย 1.5% อะกาโรสเจล เนื่องจาก จีโนมของไวรัส NPV เหล่านี้มีขนาดเล็ก ทำให้ขึ้นดีเอ็นเอที่ใช้อ่านผลมีจำนวนน้อยไม่เกิน 10 แถบ มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสที่แตกต่างกัน ในแต่ละชนิดเพียงพอต่อการเปรียบเทียบความแตกต่างในระดับชนิด ซึ่งจะประโยชน์ในการศึกษาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโมเลกุลไวรัส เมื่อได้มีการปรับวิธีการหรือเลือกใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่น

การประยุกต์ขั้นตอนเทคนิค AFLP นี้ได้ผลการทดลองในการจำแนกชนิดได้เช่นเดียวกับ Boucias *et al.* (2000) ที่ศึกษาโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์จุลินทรีย์ราโรคแมลงชนิด *Nomuraea rileyi* จากแหล่งพันธุ์ Florida, Brazil และ Argentina ที่ประยุกต์ขั้นตอนเทคนิค AFLP แล้วตรวจจับด้วย ethidium bromide เช่นเดียวกัน และยังไม่พบรายงานการใช้เทคนิค AFLP ในการตรวจจำแนกชนิดของไวรัสโรคแมลง

แต่เมื่อเปรียบเทียบผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอไวรัสระหว่างเทคนิค PCR – base typing และ เทคนิค AFLP เทคนิค PCR – base typing แสดงให้เห็นความแตกต่างของไวรัสแต่ละชนิดได้ชัดเจนกว่าซึ่งน่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในการตรวจจำแนกชนิดได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าใช้เวลาน้อยกว่าเทคนิค AFLP มีความเหมาะสมในการบริการตรวจจำแนกชนิดที่ต้องการความรวดเร็ว เหมาะสมกับการตรวจวิเคราะห์จำแนกตัวอย่างไวรัสที่มีจำนวนมากๆ อย่างไรก็ตาม การนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ชนิดควรใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากสายพันธุ์ดั้งเดิมเปรียบเทียบกับทุกครั้ง ทั้งนี้เพื่อทำให้มีมาตรฐานเปรียบเทียบถูกต้องชัดเจนยิ่งขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

ลักษณะโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาของ ไวรัสโรคแมลง สกุก Nucleopolyhedrovirus สายพันธุ์ดั้งเดิม เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ จำนวน 4 ชนิด จัดจำแนกตามจำนวนของ nucleocapsids เป็นชนิด HaSNPV, SeMNPV, SIMNPV และ TnMNPV ซึ่งไวรัส TnMNPV เป็นชนิดที่แตกต่างจากรายงานอื่นที่เป็นแบบ TnSNPV ผลึกไวรัสเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยอนุภาคไวรัส HaSNPV มี nucleocapsid จำนวน 1 แห่ง/อนุภาค จัดเป็นแบบ single - nucleocapsid NPV (SNPV) อนุภาคไวรัส SeMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1, 3, 4, 5 แห่ง/อนุภาค อนุภาคไวรัส SIMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1,3,7,8,9 แห่ง/อนุภาค และ อนุภาคไวรัส TnMNPV มีลักษณะ nucleocapsid แบบ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV) มี nucleocapsid จำนวน 1,2,4,6,7,8,11 แห่ง/อนุภาค ผลึกไวรัสเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลึกไวรัส HaSNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 0.76 - 1.46 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.07 ไมครอน SeMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 0.70 - 1.77 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.25 ไมครอน SIMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 1.33 - 3.04 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.90 ไมครอน และ TnMNPV มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ระหว่าง 1.39 - 2.34 ไมครอน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.78 ไมครอน ผลึกไวรัสทุกชนิดจะมีขนาดเล็กกว่าการวัดขนาดผลึกไวรัสด้วย เครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer ซึ่งผลึกไวรัสไม่ได้ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่าง โดยไวรัส ชนิด HaSNPV มีขนาดลดลง 1.82 ไมครอน SeMNPV มีขนาดลดลง 2.66 ไมครอน SIMNPV มีขนาดลดลง 2.18 ไมครอน และ TnMNPV มีขนาดลดลง 1.95 ไมครอน ซึ่งการทดลองลักษณะนี้ยังไม่มีการรายงานเปรียบเทียบความแตกต่างของขนาดผลึกไวรัสที่วัดด้วยเครื่อง sheath flow particle size distribution analyzer และ ขนาดที่ได้จากการส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

การตรวจจำแนกชนิดของไวรัสสกุก Nucleopolyhedrovirus ทั้ง 4 ชนิด ด้วยเทคนิค PCR - based typing โดยใช้ไพรเมอร์ แบบ degenerate primer ออกแบบจากยีน 3 ยีน ได้แก่ ยีน chitinase, polyhedron และ cathepsin ออกแบบเป็นไพรเมอร์ 4 ชุด ได้แก่ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. chitinase forward primer & chitinase reverse primer ไพรเมอร์ชุดที่ 2. polyhedron forward primer I & polyhedron reverse primer I ไพรเมอร์ชุดที่ 3. cathepsin forward primer & cathepsin reverse primer และไพร

เมอร์ชุดที่ 4. polyhedrin forward primer II & polyhedrin reverse primer II พบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 3. cathepsin forward primer & cathepsin reverse primer ให้ผลการตรวจวิเคราะห์จำแนกได้ชัดเจนกว่าใช้ไพรเมอร์คู่อื่น โดยมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างได้แก่ ไวรัส HaSNPV ขนาด 350 และ 300 คู่เบส ไวรัส SeMNPV ขนาด 400 คู่เบส ไวรัส SIMNPV ขนาด 550 และ 250 คู่เบส ไวรัส TmMNPV ขนาด 100 คู่เบส ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชนิดไวรัส และเทคนิคนี้ใช้เวลาในการตรวจวิเคราะห์ ตั้งแต่การสกัดดีเอ็นเอไวรัสจนถึงการอ่านผล เพียง 16 ชั่วโมง นับว่าเป็นวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสได้อย่างรวดเร็วกว่าวิธีการวินิจฉัยร้อยละการตายของหนอนแมลงที่จะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 15 วัน ดังนั้น การเลือกใช้วิธีการนี้จะเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสในงานบริการได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งงานวิจัยการออกแบบไพรเมอร์จากยีน cathepsin เพื่อการตรวจไวรัส NPV ทั้ง 4 ชนิด ยังไม่พบในรายงานวิจัยอื่น

การจำแนกชนิดของไวรัส ด้วยเทคนิค AFLP ไพรเมอร์ 3 ชุด ดังนี้ ไพรเมอร์ชุดที่ 1. *EcoRI*-A และ *MseI*-C ไพรเมอร์ชุดที่ 2. *EcoRI*-AA และ *MseI*-C และ ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิกริยา PCR 3 วิธีการ พบว่า ไพรเมอร์ชุดที่ 3. *EcoRI*-AA และ *MseI*-CG ปฏิกริยา PCR วิธีการที่ 3 ให้ผลการตรวจจำแนกชัดเจนกว่า 2 วิธีการ ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ที่น่าสนใจและควรที่จะมีการศึกษาต่อไป

ในการทดลองวิจัยนี้จะเห็นว่า การจำแนกชนิดของไวรัส ด้วยเทคนิค PCR - based typing ให้ผลความแตกต่างที่ชัดเจน สามารถตรวจวิเคราะห์จำแนกชนิดได้อย่างง่าย รวดเร็ว กว่าเทคนิค AFLP ซึ่งจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานบริการการตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์โรคไวรัสของแมลง และจุลินทรีย์โรคแมลงชนิดอื่น นอกจากนี้ควรมีการทดลองเทคนิคนี้ กับยีนชนิดอื่นเพื่อเปรียบเทียบผล และใช้วิเคราะห์ผลเปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่นที่มีจำหน่ายและจากแหล่งธรรมชาติ เพื่อพัฒนาต่อในการตรวจวิเคราะห์ระดับย่อยของสายพันธุ์

การตรวจจำแนกชนิดด้วยเครื่องหมายข้อมูลทางพันธุกรรมจะเป็นประโยชน์ในการใช้เป็นแนวทางในการกำหนดมาตรฐานวิธีการตรวจวิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมของไวรัสโรคของแมลงศัตรูพืช และจุลินทรีย์โรคแมลงอื่นๆ เพื่อให้สอดคล้องกับขอบเขตและสาระมาตรฐานสารชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืช ของสำนักมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) ที่จะเป็มาตรฐานการเชิงรับที่มีความสำคัญในด้านคุณภาพสินค้าเกษตรและด้านความปลอดภัยต่อเกษตรกรและผู้บริโภค รวมไปถึงการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรให้ได้มาตรฐานความปลอดภัยสากล

นอกจากนี้ข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการบ่งชี้ชนิดของสายพันธุ์ไวรัสโรคแมลงดั้งเดิมให้มีมาตรฐานความตรงตามพันธุ์ ใช้เปรียบเทียบสายพันธุ์ไวรัสชนิดอื่น หรือตรวจสอบไวรัสที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม และช่วยให้การคัดเลือกสายพันธุ์อย่างมีประสิทธิภาพที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตไวรัสเป็นปริมาณมาก ทั้งแบบการผลิตจากแมลงอาศัย (*in vivo*) และ การผลิตจากเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง (*in vitro*) และเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลีอีโตรไวรัส. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2530. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- พิมลพร นันทะ. 2545. ศัตรูธรรมชาติหัวใจของ IPM. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สุขลวัญ ว่องไวลิจิต และ พิมลพร นันทะ. 2542. การขยายเชื้อไวรัส NPV ของหนอนกระทู้ผัก และหนอนคืบกะหล่ำปลีจากแมลงอาศัย, น. 1-7. ใน รายงานผลงานประจำปี 2542 กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สุขลวัญ ว่องไวลิจิต อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV, น. 447-458. ใน เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนาทางวิชาการประจำปี “แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สุขลวัญ ว่องไวลิจิต และ พิมลพร นันทะ . 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกะหล่ำปลี, น. 73-76. ใน เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 (อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก). สมาคมคนไทย-ผู้ประกอบการธุรกิจสารเคมีเกษตร สมาคมอารักขาพืชไทย สมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย สมาคมวิทยาการวัชพืชแห่งประเทศไทย สมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย และสมาคมกัญและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย.

- ศิรินันท์ เอี่ยมประภา. 2528. คุณสมบัติบางประการและผลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อประสิทธิภาพและความคงทนของเชื้อไวรัสของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* Hübner. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศิริวัลย์ สิริมังครารัตน์. 2525. ผลของ sublethal dose ของเชื้อ nuclear polyhedrosis virus ต่อการเจริญเติบโต การวางไข่ และ รุ่นลูกของผีเสื้อหนอนเจาะสมอฝ้ายอเมริกัน *Helicoverpa armigera* (Hübner). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. ม.ป.ป. ข้อคิดและเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาค: ตัวอย่างทางชีววิทยา. ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สถาบันผลิตผลเกษตรฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV, น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.
- Adams, J.R. and T.A. Wilcox. 1982. Scanning electronmicroscopical comparisons of insect virus occlusion bodies prepared by several techniques. **J. Invertebr. Pathol.** 40: 12-20.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith and K. Struhl. 1991. **Current Protocols in Molecular Biology.** Wiley Interscience, Inc., New York.
- Black, B.C., L.A. Brennan, P.M. Dierks and I.E. Gard. 1997. Commercialization of baculoviral insecticides, pp. 341-387. In L. K. Miller, ed. **The Baculoviruses.** Plenum Press, Inc., New York and London.

- Boucias, D., C. Stokes, A. Suazo and J. Funderburk. 2000. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia** 92: 638–648.
- Bozzola, J.J. and L.D. Russell. 1992. **Electron Microscopy. Principles and Techniques for Biologist**. Jones and Bartlett Publishing Inc., Boston, MA.
- Carbonell, L.F., M.D. Hodge, M.D. Tomalski and L.K. Miller. 1988. Synthesis of a gene coding for an insect specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. **Gene** 73: 409-418.
- Christian, P. D., N. Gibb, A.B. Kasprzak and A. Richards. 2001. A rapid method for the identification and differentiation of *Helicoverpa* nucleopolyhedroviruses (NPV Baculoviridae) isolated from the environment. **J. Virol. Methods** 96: 51-65.
- Cory, J.S., M.L. Hirst, T. Williams, R.S. Haik, D. Goulson and B.M. Greer. 1994. Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. **Nature** 370: 138-140.
- Crook, N.E. and C.C. Payne. 1980. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. **J. Gen. Virol.** 46: 37-39.
- de Moraes, R.R. and J.E. Marunniak. 1997. Detection and identification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. **J. Virol. Methods** 63: 209-217.
- Evan, H.F. 2000. Viruses, pp.179-208. In L.A. Lacey and H.K. Kaya, eds. **Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology**. Kluwer Academic Publishing. The Netherlands.
- Groner, A. 1986. Specificity and Safety of Baculoviruses, pp.177-202. In R.R. Granados and B.A. Federici, eds. **The Biology of Baculoviruses Volume 1. Biological Properties and Molecular Biology**. CRC Press, Inc., Boca Rato, Florida.

- Herniou, E.A., J.A. Olszewski, D.R. O'Reilly and J.S. Cory. 2004. Ancient coevolution of baculoviruses and their insect host. **J. Virol.** 78: 3244-3251.
- Hungspruke, S. 1981. **Studies on Nuclear Polyhedrosis Viruses Recovered from *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera exigua* Larvae in Thailand.** M.S. Thesis, Mahidol University.
- Huang, Y. J., J. Kobayashi and T. Yoshimura. 2002. Genome mapping and gene analysis of *Antheraea pernyi* Nucleopolyhedrovirus for improvement of Baculovirus expression vector System. **J. Biosci. Bioeng.** 93: 183-191.
- Hunter-Fujita, F.R., P.F. Enwistle, H.F. Evans and N.E. Crook. 1998. **Insect Viruses and Pest Management.** John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Jakubowska, A.K., S.A. Peters, J. Ziemnicka, J.M. Vlak and M.M. van Oers. 2006. Genome sequence of an enhancin gene-rich nucleopolyhedrovirus (NPV) from *Agrotis segetum*: collinearity with *Spodoptera exigua* multiple NPV. **J. Gen. Virol.** 87: 537-551.
- Jewell, J.E. and L.K. Miller. 1980. DNA sequence homology relationships among six lepidopteran nuclear polyhedrosis viruses. **J. Gen. Virol.** 48: 161-175.
- Lange, M., H. Wang, H. Zhihong and J.A. Jehle. 2004. Towards a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. **Virology** 325: 36-47.
- Lynn, D.E. 2003. Comparative susceptibilities of insect cell lines to infection by the occlusion-body derived phenotype of baculovirus. **J. Invertebr. Pathol.** 83: 215-222.
- Kao, S., T. Jinn and C. Wang. 2000. Detection and identification of five nucleopolyhedrovirus isolates from Taiwan by PCR-RFLP. **Chinese J. Entomol.** 20: 23-25.

- Khan, S., B. Fielding and S. Davison. 2004. Identification of three genes of *Helicoverpa armigera* single enveloped nucleopolyhedrovirus and their application in determining HaSNPV-SA phylogeny. **S. Afr. J. Sci.** 100: 301-305.
- Miller, L. K. 1986. The Genetics of Baculoviruses, pp. 217-238. In R.R. Granados and B.A. Federici, eds. **The Biology of Baculoviruses. Vol. 1. Biological Properties and Molecular Biology.** CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- Miller, L.K. 1996. Insect viruses, pp. 533-556. In B.N.Fields, D.M. Knipe and P.M. Howelly, eds. **Fields Virology, Third Edition.** Lippincou-Rayen Publishing, Philadelphia.
- Munoz, D., R. Murillo, P.J. Krell, J.M. Vlak and P. Caballero. 1999. Four genotypic variants of a *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus (Se-SP2) are distinguishable by a hypervariable genomic region. **Virus Research** 59: 61–74.
- Murillo R., D. Munoz, T. Williams, N. Mugeta and P. Caballero. 2006. Application of the PCR-RFLP method for the rapid differentiation of *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus genotypes. **J. Virol. Methods** 135: 1-8.
- Najimi, B., N. Boukhatem, S.E. Jaafari, M. Jlibène, R. Paul and J. Jacquemin. 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of markers associated with H5 and H22 Hessian fly resistance genes in bread wheat. **Biotechnol. Agron. Soc. Environ.** 6: 79–85.
- O'Relly, D.L. and L.K. Miller. 1991. Improvement of baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. **Bio/Technology** 9: 1086-1089.

- Pang, Y., J. Yu, L. Wang, X. Hu, W. Bao, G. Li, C. Chen, H. Han, S. Hu and H. Yang. 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Virology** 287: 391-404.
- Possee, R.D. and G.F. Rohrmann. 1997. Baculovirus Genome Organization and Evolution, pp. 109-140. In L.K. Miller, ed. **The Baculoviruses**. Plenum Press, Inc., New York and London.
- Rohrmann, G.F. 1986. Polyhedrin structure. **J. Gen. Virol.** 67: 1499-1513.
- Rohrmann, G.F., M.E. Martignoni and G.S. Beaudreau. 1982. DNA sequence homology between *Autographa californica* and *Orgyia pseudotsugata* nuclear polyhedrosis viruses. **J. Gen. Virol.** 62: 137-143.
- Seufi, M.A. 2008. Characterization of an Egyptian *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus and a possible use of a highly conserved region from polyhedrin gene for nucleopolyhedrovirus detection. **Virol. J.** 5:13.
- Smith, G.E. and M.D. Summer. 1978. Analysis of baculovirus genomes with restriction endonuclease. **Virology** 89: 517-527.
- Thomas, C. J., H. L. Brown, C. R. Hawes, B. Y. Lee, M. Min, L. A. King and R. D. Possee. 1998. Localization of a baculovirus-induced chitinase in the insect cell endoplasmic reticulum **J. Virol.** 72: 10207–10212.
- Toprak, U. and M.O. Gürkan. 2004. First record of a NPV isolated from *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) in Turkey and its molecular identification according to the partial lef-8 gene. **Turk. J. Biol.** 28: 71-77.

- Treacy, M.F. 1999. Recombinant baculoviruses, pp. 321-340. *In*: F.R. Hall and J.J. Menn, eds. **Biopesticides Use and Delivery**. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Treacy, M.F. and J.N. All. 1996. Impact of insect-specific *AalT* gene insertion on inherent bioactivity of baculovirus against tobacco budworm, *Heliothis virescens*, and cabbage looper, *Trichoplusia ni*, pp. 911-917. *In*: P. Duggar and D. A. Richter, eds. **Proceedings of the Beltwide Cotton Production and Research Conferences**. National Cotton Council, Memphis.
- van Lenterren, J.C. 2003. **Quality Control and Production of Biological Control Agents :Theory and Testing Procedures**. CABI Publishing, The Netherlands.
- van Oers, M.M., E.A. Herniou, M. Usmany, G.J. Messelink and J.M. Vlak. 2004. Identification and characterization of a DNA photolyase-containing baculovirus from *Chrysodeixis chalcites*. **Virology** 330: 460-470.
- Volkman, L.E. 1985. Classification, identification and detection of insect viruses by serological techniques, pp. 27-53. *In* K. Maramorosch and K.E. Sherman, eds., **Viral Insecticides for Biological Control**. Academic Press, Inc., New York.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. **Nucl. Acids Res.** 23 : 4407-4414.
- Vos, P. and M. Kuiper. 1997. AFLP analysis, pp. 115-131. *In* Caetano-Anolles and Gresshoff, eds. **DNA Markers Protocols, Applications and Overviews**. Wiley-Liss, Inc., New York.
- White, B.A., 1993. **PCR Protocols Current Methods and Applications**. Humana Press, Inc., New Jersey.

- Willis, L.G., R. Siepp, T.M. Stewart, M.A. Erlandson and D.A. Theilmann. 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. **Virology** 338: 209-226.
- Wu, C. and C. Wang. 2005. Characterization and polyhedrin gene cloning of *Lymantria xyliana* multiple nucleopolyhedrovirus. **J. Invertebr. Pathol.** 88: 238-246.
- Wongwilikhit, S. and P. Nanta. 2002. The nuclear polyhedrosis virus of cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hubner), p. 44. Ruay-aree, S. ed. *In Biennial Report 2000-2001*. Department of Agriculture, Bangkok.
- Zhang, C.X., X.C. Ma and Z. J. Guo. 2005. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the *Helicoverpa armigera* single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **Virology** 333: 190-199.

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 การจัดจำแนกไวรัสโรคของสัตว์จำพวก arthropods

Virus family	Genus	Nucleic acid type	Occlusion bodies	Hosts	Site of replication	Large scale use
Ascoviridae	Ascovirus	ssDNA	-	Lepidoptera Noctuidae only	Nuclei : fatbody, Hypodermis, tracheal matrix	No
Baculoviridae	Nucleopolyhedro virus (NPV)	dsDNA	Polyhedral	Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera	Nuclei : gut or systemic	yes
	Granulovirus (GV)	dsDNA	Granular	Neuroptera, Siphonaptera, Thysanura, Trichoptera		yes
Iridoviridae	Iridovirus and Chloriridovirus	dsDNA	-	Wide range of invertebrate families	Cytoplasm : fat body, hemocytes, sometimes systemic	No
Parvoviridae	Densovirus	ssDNA	-	Diptera, Blattoideae, Lepidoptera, Odonata, Orthoptera	Most tissues expect midgut	No
Polydnaviridae	Ichnovirus	dsDNA	-	Hymenoptera, Ichneumonidae	No effects on parasitoids	No
	Bavovirus	dsDNA	-	Hymenoptera, Braconidae		No

ตารางผนวกที่ 1 การจัดจำแนกไวรัสโรคของสัตว์จำพวก arthropods (ต่อ)

Virus family	Genus	Nucleic acid type	Occlusion bodies	Hosts	Site of replication	Large scale use
Poxviridae	Entomopoxvirus	dsDNA	Spheroid	Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orthoptera	Cytoplasm : mainly fat body other organs can be infected	Minor
Unclassified	Oryctes virus	dsDNA	-	Coleoptera	Nucleus : gut in adult, systemic in larvae	yes
Birnaviridae	Birnavirus	dsRNA		Diptera, Drosophila X virus	No tissue symptoms : adults sensitive to CO ₂	No
Caliciviridae	Chronic stunt virus	ssRNA		Lepidoptera, Noctuidae	Pathology poorly understood	No
Nodaviridae	Nodavirus	ssRNA	-	Diptera, Coleoptera, Lepidoptera	Cytoplasm ; gut and later systemic	No
Picornaviridae	Picornavirus	ssRNA	-	Diptera, Lepidoptera and other families by injection	Cytoplasm ; gut and other organs	No
Reoviridae	Cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV)	dsRNA	Polyhedral	Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera	Cytoplasm ; gut only	Minor
Rhabdoviridae	Sigma virus	ssRNA	-	Diptera	No tissue symptoms : adults sensitives to CO ₂	No
Tetraviridae	Tetravirus	ssRNA	-	Lepidoptera	Cytoplasm : choronic infection	No

ที่มา: Evans (2000)

ตารางผนวกที่ 2 ลำดับเบสของยีน chitinase, polyhedrin และ cathepsin ที่นำมาใช้ในการออกแบบ
ไพรเมอร์ โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ยีน	Accession* ของไวรัส			
	HaSNPV	SeMNPV	SIMNPV	TnSNPV
chitinase	AF114795	NP_037779	-	AAZ67432
	(4 Apr 1999)	(30 Mar 2006)		(4 Oct 2005)
polyhedrin	EU047914	NC_002169	AF037262	AF 093405
	(1 May 2008)	(30 Mar 2006)	(11 Sep 2001)	(30 Nov 1999)
cathepsin	AF268612	NP_037776	-	AAZ67431
	(1 Jan 2002)	(30 Mar 2006)		(4 Oct 2005)

หมายเหตุ * <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> มีการเปลี่ยน Accession ในระบบฐานข้อมูลใหม่
ลำดับเบสให้ดูจากผลการวิเคราะห์ตารางผนวกที่ 3

ตารางผนวกที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีนที่นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้
ข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank ใน <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

เปรียบเทียบลำดับเบสของยีน polyhedrin จากไวรัส 4 ชนิด

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

SeNPV      ATGTATACTCG-----CTACAGCTATAACCCAGCCTTGGGTGCGACTTACGTGTAC 51
SlNPV      ATGTATAGTCGTTATAGTGCCTACAATTATAGTCCCCATCTGGGCAAACCTATGTATAC 60
TnNPV      ATGTATACACG-----TTACAGCTACAGCCCGTCTCTGGGCCCGCACCTACGTTTAC 51
HaNPV      ATGTATACTCG-----TTACAGTTACAGCCCTACTTTGGGCAAAACCTATGTGTAC 51
***** **          **** * * *          ***** ** * * * * *

SeNPV      GACAACAAATCTACAAGAACTTGGTTCGGTCAATCAAAAACGCCAAACGCAAGGAGCAT 111
SlNPV      GATAACAAGTATTACAAAAATCTAGGTACCGTGAATTAATAATGCTAAACGCAACACGAT 120
TnNPV      GACAACAAATACTACAAAAATTTGGGTGCCGTAATCAAGAATGCAAAGCGCAAGAAGCAC 111
HaNPV      GACAACAAATACTTTAAGAAATTTAGGTGCTGTTAATTAATAATGCAAACGCAAGAAGCAT 111
** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      CTATTGCAACATGAAATGAAGAGAGAACTCTCGATCCTCTAGAAAGGTATGTCGTCGCC 171
SlNPV      GCTCTCGAACGCGAGGCCGACGAGCGTGAGCTCGATCACCTCGACAAGTATCTGGTCGCA 180
TnNPV      TACGCCGAACATGAATTAGAAGAAGCCACCTTAGATCCCCGACAACTACCTAGTGGCT 171
HaNPV      TTAGAAGAGCACGAACATGAAGAAGCGCAACTTAGATTGCTCGACAAATACTTTGGTGGCG 171
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GAAGATCCCTTCTTGGGACCCGGCAAAAACCAAAAAGTTGACTCTCTTCAAGGAAATTCGT 231
SlNPV      GAGGATCCGTTTCATGGGTCTCTGGTAAAAATCAAAAAGTTGACTCTGTTCAAAGAGATTCGT 240
TnNPV      GAGGATCCCTTCTTGGGACCCAGGTAAGAACCAAAAACCTCACTTTGTTCAAAGAAATCCGT 231
HaNPV      GAAGATCCCTTTTTTGGGACCCGGCAAAAATCAAAAATTAACCTTTGTTTAAAGAAATTCGC 231
** ***** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      ATCGTCAAACCCGACACGATGAAACTGGTTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCCGC 291
SlNPV      AACGTGAAGCCCGACACGATGAAGCTGATCGTCAATTGGAACGGTAAAGAGTTTCTGCGC 300
TnNPV      AATGTAAGCCCGATACCATGAAGCTTGTGTCGTCAAATTGGAGCGGTAAAGAGTTTCTGAGG 291
HaNPV      AGCGTTAAGCCCGACACAATGAAGCTTGTAGTTAACTGGAGCGGTTCGCGAAATTTCTTCGC 291
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GAAACTTGGACGCGTTTTCATGGAAGACAGCTTTCCCATCGTCAACGATCAAGAAATCATG 351
SlNPV      GAGACTTGGACTCGCTTATGGAAGACAGCTTCCCCTCGTGAACGATCAAGAAGTGATG 360
TnNPV      GAAACTTGGACCCGCTTATGGAAGACAGCTTCCCTATGTTAAACGACCAAGAAATATG 351
HaNPV      GAAACTTGGACGCGTTTTCATGGAAGACAGTTTCCCATGTTAAACGACCAAGAAATATG 351
** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GACGTTTTCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTTCCGATTTTTTG 41
SlNPV      GACGTGTTTTTAGTGGTAAACATGCGTCCACTAGACCGAACCGTTGCTTTAGATTTTTTA 420
TnNPV      GATGTTTTCTGCTAGTAAACATGCGCCCACTAGACCTAACAGATGCTTTAAATTCCTT 411
HaNPV      GACGTGTTCTGCTGTTAATATGCGCAACCAACCGAACCGTTGTTACCGGATTTCTTA 411
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GCTCAGCACGCTCTCCGTTGCGATCCCGACTACGTTCCCCACGAAGTCATCCGCATCGTC 471
SlNPV      GCGCAGCACGCGTCCGATGCGATCCCGACTACGTTCCCTCAGCAGTGATCCGTATCGTA 480
TnNPV      GCCAACATGCTCTGCGTTGCGATCCCGACTACGTTCCCTCATGAGGTGATCAGGATCGTA 471
HaNPV      GCGCAACACGCTCTGCGTTGTGATCCCGACTATATTCCTCAGGAAGTCATTCGTATTGTA 471
** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GAGCCCGTGTACGTGCGCACCAACAACGAATACCGCATCAGTTTAGCCAAAAAGGGCGGC 531
SlNPV      GAACCGTGTACGTGCGCACCAATAACGAATACCGCATCAGTCTGGCTAAGAAGGGCGGC 540
TnNPV      GAGCCTTCTGCGTGGGTGGGACCAACAACGAGTACCGCATCAGCCTGGCTAAGAAGGGCGGT 531
HaNPV      GAACCTTCTATGTAGGACGTAACAACGAGTACAGAATTAGTTTAGCCAAAAATACGGC 531
** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GGTGCCCCGTCATGAATCTCCACTCCGAGTACACCAACTCGTTTCGAGGAATTCATCAAC 591
SlNPV      GGTGTCCTCGTATGAACCTGCACGCCGAATACACCAGTCGTTTCGAGAGCTTCATCGAC 600
TnNPV      GGCTGTCCCATCATGAACCTCCACTCCGAATACACCAACTCGTTTCGAGGAGTTTATCAAC 591
HaNPV      GGTGTCCTCGTTATGAACCTGCACGCTGAATACACTAATTCCTTTGAAGATTCATTACC 591

```

```

** ** ** * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV   CGCGTCATTTGGGAGAACTTTTACAAACCCATCGTTTACGTAGGAACCGACTCGGGTGAG 651
SlNPV   AAGGTGATATGGTACAAGTTTACAAGCCCATCGTTGTACGTGGGCACCGACTCGGCTGAA 660
TnNPV   CGTGTGATCTGGGAGAACTTCTACAAGCCCATCGTTTACGTGGGCACCGATTCAGCTGAG 651
HaNPV   AACGTAATTTGGGAGAACTTTTACAAACCAATTGTTTACGTAGGCACTGATTCTGCCGAA 651
      ** ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV   GAAGAGGAAATCCTCCTCGAACTGTCGCTCGTGTTC AAGATCAAGGAATTCGCACCCGAT 711
SlNPV   GAGGAGGAGATCCTTCTCGAAGTGTGCTCGTGTTC AAGATCAAAGAGTTTGCTCCCGAC 720
TnNPV   GAAGAGGAGATTCTTCTTGAGGTATCTTTAGTCTTTAAAATTAAGGAATTCGCACCTGAT 711
HaNPV   GAAGAGGAAATACTCCTAGAAAGTTTCTTTGATATTTAAGATCAAAGAATTTGCACCTGAC 711
      ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV   GCGCCTCTTTACAACGGACCCGCTATTAA 741
SlNPV   GCGCCTCTATACACGGGTCCCGCTATTAA 750
TnNPV   GCGCCTCTGTACTCAGGCCCGCATACTAA 741
HaNPV   GCTCCGCTATACACTGGTCTGCATATTAA 741
      ** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

เปรียบเทียบลำดับเบสยีน chitinase จากไวรัส 3 ชนิด

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

SeNPV      -----ATGCCCTAT-ATTATTAC 17
TnNPV      -----ATGCATTTTGT-ATTCAATTG 19
HaNPV      ATGTTTTTTTATAATAAGTACTATAAAATTACACAAAATAAATATGAATAAATTATTGTTTG 60
                                         *   ***   *

SeNPV      GCTGTTCTTGGCTTGCCT--GGTGTGTGTC-CACGAAA--GCAGATGTACCCGGCGTTCCC 72
TnNPV      GAATCGCATGCTATATAATCGCCATCGGC-GGCGGAGATGCTGCGGCTCCTGGAATTCCT 78
HaNPV      TATTTGTTTGCCTTTTAGTATTTAATATTACATAGCTACGCTGCTCCACCCGGCGTTCCC 120
                                         **   *   *           ** *   ** **   ****

SeNPV      ACTATCGATTGGTCCGATCGAAACTATGCGCTCGTAAAGATCGACCACGAAGCTACATCG 132
TnNPV      GTGATCGATTGGGCCGACAGAAACTATGCTTTGGTTCAAGTCAGTCACGAAGCCACATCA 138
HaNPV      ACATTAGACTGGGCCGATCACAGTTACGCTTTAGTGCAAATAAATCATCAAGCCACCGCT 180
                                         * ** *** ** *   * ** ** * ** *   * ** ** ** ** *

SeNPV      TATGAAAAATTAATCAAAATCACGTCCAATGTGCAAGTGCCG--GTTTCATGGAACGTTT 190
TnNPV      TATGAAATCTAGTTAAAAAAGTCGATCGAGTACAAGTTTCA--GTGTCGTGGAACGTTT 196
HaNPV      TACGAATCATTAGT--AACTCTCAACCGTTTGTAACTATCAAAGTATCATGGAGCGTAT 238
                                         ** ** *   ** *   ** *   * ** * *   ** ** ** ** ** ** *

SeNPV      GGACGGGAGACGTAGGAGACGTGGCGTACGTCCTCTTCGATGGCAAACAAATGTACAAAG 250
TnNPV      GGAGCGGTGAACAGGGCGATATCGCTTACGTGCTCTTTGACAAAAACCAAGTATGGAGCG 256
HaNPV      GGTCCGGCGAACAAGGCCAAATCGCTCAAGTGTATCTAGAAAAATAAACTAGACTGCAAAG 298
                                         **   ** **   ** ** * ** *   ** *   ** ** *   * * *

SeNPV      GAG---ACGCTA---CCGTCAAAAAGGCCATAGTCTTGGT-----CGACAAGG 292
TnNPV      GTG---ACGCAT---CCAATAAACACGCTATCGTATCGGT-----CAATAAAG 298
HaNPV      TAATCAACGTTTGGACTGGTCCGACGCAAGATCGTTTTGCTACTTTTGATTACAATACGA 358
                                         ***           *   ** ** * * *   * * *

SeNPV      GGGGCAATTTTCGATATGACCGTTAAACTATGCAACGTCGACGGTTGCTCTACGAGCAGCG 352
TnNPV      GCGGTCGATATATAATGACCGTAAAGCTATGCAACTCGGACGGATGCACCTCGAGTCAAG 358
HaNPV      GCGGTCGTTATTCGATGTATGTAAACTGTGCAATGCCGACGGCTGTTCCGCTAGTCAAA 418
                                         * **   *   *** ** ** * ** ** *   ** ** * * **

SeNPV      CA-TTGAAGT-GTG-TCGCCGACACGAGCGGATCCCACCTGGCGCCGCTCACGTACGACT 409
TnNPV      CGGTCGAAGTTGTAATCGCAGATACGGACGGTTCTCATCTTGCTCCGCTCTATTACGAAT 418
HaNPV      CCGTAGAAGTCGTGATCGCAGACCCGATGGTAAACATTTAAACCGTTACAATACACGT 478
                                         * * ** ** ** *   ** ** ** *   ** *   ** ** *   ** *

SeNPV      ATTTCGAAAAACAACAGCGTTTCGAAATCCATCCCC--ATAAAATCGTGGCGGCCTACT 466
TnNPV      ATCAGGAATTAATCAACCTTTCGAAACGCGAGTCGTGGATAAAATCGTTGCCGCAATT 478
HaNPV      GGCAAGAAAAACAATAAACCGT--ATACGTACAACACTGATCACACCCGATGCGGCCTATT 535
                                         ***   ** * * *   * *   *   ** * * ** * * ** ** *

SeNPV      TTGTCGAATGGGGAGTGTACCTGAGACAGTTCCCCGTCGACAAGGTGCCGGCGCCGAATC 526
TnNPV      TTGTCGAGTGGGGTGTATCATAGAAACTTTCTGTCACTCGAGTTCCCACTCCTAATC 538
HaNPV      TTGTCGAATGGGGCGTTACGGTCGATCTTTCCCCGTGGACAAAGTGCCACGCGCCGAACC 595
                                         **** ** * ** ** *   **   ** ** **   ** ** * ** ** *

SeNPV      TATCACATATACTATACGGCTTCGTGCCGATATGCGGAGGCGACGGCATCAACGACGCGC 586
TnNPV      TGTACACATTCTCTACGGATTACATCCGATATGCGGCGGCGACGGCATTACGACAGTC 598
HaNPV      TTTGCGACATTTTATACGGATTATACCGATTTGCGGCGGTGACGGTATAAACGACAGTT 655
                                         * ** ** * *   * ** ** * *   * ** ** * ** ** * * ** ** *

SeNPV      TAAAAACGGTGCCTGGCAGTTTTGAGGCATTGCAACGTTGCGTGTGCGGGTGGGGCCGATT 646
TnNPV      TCAAGACGATAACCGGTAGTTTTGAAGCCTTCAGCGATCGTGTTCGGGTGCGAGACGACT 658
HaNPV      TAAAATCTATCACGGGGAGTTTTGAAGCGTTGCAAAGATCGTGCCTGGCAGGGACAATT 715
                                         * ** *   *   * ** ** ** ** ** * *   * ** ** * ** * * * *

SeNPV      TCAAGGTGGCTATACACGATCCGTGGGCGCAATACAAAAGCCCCAAAAGGGCGTCTCGT 706
TnNPV      TCAAAGTTCGATTTCATGACCCGTGGGCTGCGGTCCAAAAGCCCCAAAACAAGTGACCG 718
HaNPV      TTAAAGTTTCCATACACGATCCGTGGGCGGCGCTCCAAAACCAACAACAGGCGTTAGCG 775
                                         * ** ** *   * ** ** * *   * ** ** * * ** ** *   **

```

SeNPV	CATG	GAACGAACCGTACAAAGGCA	ACTTTGGTCAACTGATGGCAATGAAGAGGGCCAATC	766
TnNPV	CATG	GAACGAACCATACAAAGGCA	ACTTTGGACAATTGATGGCAGCTAAACTGGCGAATC	778
HaNPV	CATG	GAACGAACCGTACAAAGGCA	ATTTTGGTCAATTAATGGCAGCAAAATGGCCAATC	835
		*****	*****	
SeNPV	CTCACATTAAGTGTTCGCATCGATCGGCGGATGGACTCTGTCCGATCCATTTTATCATA			826
TnNPV	CCCATGTTAAAGTGCCTTCGATCGGTGGCTGGACTTTATCCGATCCGTTCTTTTACT			838
HaNPV	CCAATCTAAAGTGTGGCATCAATCGGCGGTTGGACACTGTCCGATCCCTTCTATCATA			895
		* * * *	* * * *	
SeNPV	TGCACGACGCCGACGTCAGACGGGTGTTTATCGATTCAAGTGAAGAATTTCTGCTCACGT			886
TnNPV	TTCACGATGCGGTCAAACGCAAAATTTTGTGCGATTCTGTCGTCGAGTTTTTACAGACCT			898
HaNPV	TGCACGATGCGCGAACGCGACAAATTTTGTGCGAATCCGTGCGTGAATTTGTGTTGACAT			955
		* * * * *	* * * * *	
SeNPV	GGAAGTTCTATGACGGCGTCCACATCGATTGGGAGTTTCCCGGCGGCAAGGGAGCCAACC			946
TnNPV	GGAAATTTTTCGATGGTGTGACATCGACTGGGAGTTTCCCGGCGGAAAGGGGCCAATT			958
HaNPV	GGAAATTTTTCGACGGCATCGATATTGATTGGGAATTTCCCGGCGGCAAGGGCGCCAATC			1015
		*****	*****	
SeNPV	CCGACGTGGGCGACGCGGAACGCGACCGCGAAACGTACACGCTCCTCCTGCAAGAGCTGC			1006
TnNPV	CCAACGTGCGGCGATGCCGAACGCGATCGCAACACGTACACGATTCTGTTACGAGATTTAC			1018
HaNPV	CAAACGTTGGCGATGTGGAACGCGACAATAACACGTATATCGCTTTATTGGGCGAATTGC			1075
		* * * * *	* * * * *	
SeNPV	GTTTACGTTTAAACGCGCTCGGCGCCCGCACCAACCGATATTACGCCCTGACTTCGGCAG			1066
TnNPV	GCGAAGCGCTAGACCGACTAAGCCTCGAAACGAATCGAACATACGAGCTAACAGCGCCA			1078
HaNPV	GCGCCATGCTCGATCAAGTTCAAATACAAACGAATCGTACTTTAGAACTCACACAGCGA			1135
		* * * *	* * * *	
SeNPV	TGAGCGCGGGCAACGACAAGATAGCCGTCGTCAACTATAACGAAGCGCAAAAGTATTTGG			1126
TnNPV	TTAGCGCCGGCGATGACAAAATCACGGTCGTCGACTACACAGCCGCTCAAAAATATTTAG			1138
HaNPV	TTAGCGCTGGCATAGACAAGATCGCCGCGTTAATTACGACCGAGCACAAACAGTATTTAG			1195
		* * * * *	* * * * *	
SeNPV	ACACAATCTTTTGGATGACA	TACGATTTCAAAGGAGCGTC	GAGCAACACTGAATTGGGAC	1186
TnNPV	ATTATATTTTGGATGACA	TACGATTTTAAAGGCGCTTGGT	CGAATAGCGATCTGGGCT	1198
HaNPV	ATAAAATTTTCGTGATGAGT	TATGATTTCAAAGGAGCTTGGT	CTAATACCGATCTCGGTC	1255
		* * * *	* * * *	
SeNPV	ATCAGACCGCGCTTTTTCGCGCCACTTGGCGTCCCAGCAACCATACCTGCGCCGACCGCG			1246
TnNPV	ATCAGACGACTTTGTACGCGCCTGCGTTAATCCTAAAGAACACTATACGACCGATTTTG			1258
HaNPV	ATCAGACGGCACTGTACGGTTCCGCGTGGAAACCTAACGAACCGTACACCGCCAACGTGG			1315
		*****	*****	
SeNPV	CCGTAGAGCTATTGCTCGGCCAGCAGCTGCCGCGGAAAGATTGCGCTCGGCGTCCGCA			1306
TnNPV	CGGTTCTGCTCTGCTTAAACAAAAGTTCGAGAATAAAAAGATTGTAGTCGGCGTAGCTA			1318
HaNPV	CCGTGGACGCTTTGCTCGCGCAACGAGTGAATCCAAAAAACTCGTGTGGGCGTAGCAA			1375
		* * *	* * *	
SeNPV	TGTACGCGCCGCGATGGAGCGGCGTCG-TGAG--CGACGACCCGATAATCCGTTCTCTCG			1363
TnNPV	TGTACGGTCGCGGGTGGACCGGCGTGGTGTATTTCGTCGACAAAAACAATCCATTTTCCG			1378
HaNPV	TGTACGCGCCGCGTGGACGGGCGTCCACAA--CTACACAGTGACAATCCATTCAGTG			1432
		*****	*****	
SeNPV	GCGTCGCGGATGGCCCCGTGCCCGCACTTGGGAAGCGGGCGTAGTGGACTATCGTCAGA			1423
TnNPV	GCACGGCAAGGGACCTGTCAAAGGTACCTGGGAAGACGGAGTCTGTTGATTTAGAGAAA			1438
HaNPV	GCGTAGCCGTCCGACCGATCACGGGTACATGGGAAAACGGCGTGGTCTGACTACAGACAGA			1492
		** ** *	** ** *	
SeNPV	TCGTCCACAACATG-----TCACAGTACGATT-ATGTATACGACGAGTTGTCAAAGGGG			1477
TnNPV	TTTTCAACTCTTTTGTGACTAACAAACCGATGGATCGTTACGATGCTATAGCAAAGCGT			1498
HaNPV	TTGCTAAAAACATT-----TCGCGTTACGAAT-ACGCATTTCGACGACATGGCCAAAGCTG			1546
		* * * *	* * * *	
SeNPV	CGTACGTTTACAATCGTGAAAAACGGCAATCTTATCACATACGACGACCCAAAGTCTGTCCG			1537
TnNPV	CATACGTTTTTAATAATTTCGACAGGTGATCTCATCACTTACGACAGTCCCAGTCGGTTC			1558
HaNPV	CGTACGTATTTCGACCGCGCTCTGGCGACTTAATATCGTATGACAGCGAAAGATCGGTAC			1606
		* * * * *	* * * * *	
SeNPV	CCGATAAGACTAAGTACGTGCTCGATCACGAGTTGGCCGGCGTGTTCGCTGGGAAATTG			1597
TnNPV	TGGATAAAGCAAAGTATGTGTTAGACTACAACCTGGGTGGGTTGTTTTCGCTGGGAAATCG			1618
HaNPV	TGGCCAAAGGCGAATACGTGCTTCAGCGTAGACTCGGCGGATTATTCGCATGGGAAATCG			1666

เปรียบเทียบลำดับเบสยีน cathepsin จากไวรัส 3 ชนิด

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

SeNPV      -----TGAACAAATTACTCATACTTTTT---CTGCTATT 31
TnNPV      -----ATGAAAAAATTATACTATTTTTTGTTCGTCGTC 36
HaNPV      ATGCGCAAGTACCATTCAAATATCATGCATAAAATTATTACATTTGTT-TCCTTGTGTG 59
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      AAAC---GCGGCGTTAAC---GCGCCAAGATAATCATGCGAGTGC-CAACAATAAACCT 83
TnNPV      GCATCCGGCGGCTTGGACAATGGCGTCAACGCCGTTAT-CGACTATGTCGCAGCAGCGCC 95
HaNPV      GACGTTTGTCTGTGTGATGAAATATCTTTGCATACGT-CGTCGTCGCCACCGCCATTGT 118
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      ATGCTTTA-----CAATATCA-----ACAGCGCCCCGCTTACTTTGAAAAATTTATTA 132
TnNPV      ACATTTTAA-ATTGCAATATAATTTAGAACGAGCTCCACAATACTTTGAAACGTTTCAGA 154
HaNPV      CTTCCGCAGTGTCTGATTATAATTTAGATCAATCTGAAATTTATTTCAACATTTCTTAC 178
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      CGCAATACAACAAACAATACAAGAGCGAAGACGAAAAAAGTATCGCTACAATATATTTTC 192
TnNPV      CCAAATACAAGAAAGTATATGCCGACGACAACGAACGTGATTATCGGTATAAAATCTTTA 214
HaNPV      AGCAATACAACAAAGCTACGACGATCCCAAAGAATACCAATACCGTTACAATGTGTTCA 238
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      GACACAAC-----ATTGAATCTATAAATCAAAA-----GAATAGTCGTAACG 234
TnNPV      AAACCAAT-----CTCGAAATCATTAATTTAAA-----GAATCAACAAAACG 256
HaNPV      AAGACAATTTGAACAAAATCAATTTCTCAAAATCGAGAAAATCTGTTGAATAACAAGAACA 298
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      AT-----TCTGCGGTGTACA-----AGATTAATCGTTTTGCGGACATGCCCA 276
TnNPV      AT-----TCTGCGGTCTATA-----ACATTAACAAATTTGCCGATTTAACCA 298
HaNPV      ATAACGACTCGCTCTCTACATCGGCTCAATTTGGTGTGAACAAATTTAGTGACAAGACCC 358
              ** * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      AGAATGAAATAGT-CATCCGTCATACGGGTCTAGCTTCGGGA--GAATGGGATTA--A 330
TnNPV      AAAATGAAGTCAT-CGCCAAATTTACCGTCTCGGTGTAAAA--TCGCCAATTTAAAAA 355
HaNPV      CAGACGAAGTGTTACATTCGA-ACACTGGTTTTTTTTTAAATCTTAGCCAACACTAC--A 415
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      ATTTTTGCGAAACAATCGTAGTCGACGGACCGGCGCAACGACAACGACCGGTCAAGTTTTG 390
TnNPV      ACTTTTGTGATCCCCCTCATAGTTGATGGTCCCTCGAAAT-ACACTCA-AGAAACCTTCG 412
HaNPV      CATTATGCGAAAAATAGAATAGTTAAAGGCGCGCCCAACATACGTTTGCCCGATTATTATG 475
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      ATTGGCGATCTATGAACAAGATCACTTCGGTGAAAGATCAGGGCATGTGCGGCGCGTGT 450
TnNPV      ACTGGAGACAATTCATAAAAATCACCTCGGTCAAAGACCAAGGGTTTTGCGGATCGTGT 472
HaNPV      ATTGGCGGACACCAATAAAGTGACTCCATAAAAAGATCAAGGAGTTTGGCGATCGTGT 535
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      GCGGTTTTCGAGTCTGGGAGCGC TCGAGAGTCAAGTATGCCAT CAAGTACGATCGGTTGA 510
TnNPV      GGGCCTTTCTACAATAGCCGGAT TAGAGAGTCAATATGCTAT CAAGTATAACGAACATA 532
HaNPV      GGGCTTTCGTAGCAATAGGCAATA TTGAAAGTCAATATGCCAT ACGGCACAAACAAATTA 595
              ** * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      TCGATTTATCCGAGCAACAGTTGGTTCGATTCGATTTTCGTCGATATGGGATGCGATGGCG 570
TnNPV      TCGACCTTTCGGAACAGCAGTTGGTTCGACTGTGACACTATAGACATGGGCTGCGCCGGTG 592
HaNPV      TAGATCTGTCCGAACAGCAACTGTTAGATTGCGATGAAGTTGATTTAGTTGTAATGGTG 655
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      GGTAAATTCACACCGCCTACGAACAAATCATGAAAAATGGGCGGCGTCAACAAAGAGTTTG 630
TnNPV      GACTGCTGCACACAGCATACGAAGAAATATGAGTATGGGCGGTGTGGAATACGAGGAAG 652
HaNPV      GTTTGTGATTTAGCGTTTCAAGAACTATTGCTGATGGGCGGTGTTGAAACGGAAGCAG 715
              * * * * * * * * * * * * * *
SeNPV      ACTATTCGTACAAAGCGGAACGTCAGCCGTGCGCTCTCAAACCGCACAAATTCGCGACCG 690
TnNPV      ATTATCCCTATAGATCGGTACAAGCCCGTGTGCAATCGAAAAACGACAAATTCGAAGTGT 712
HaNPV      ATTATCCCTATCAGGGCAGTGAACAAATGTGCACTTTAGATAATCGCAAAATAGCTGTCA 775
              * * * * * * * * * * * * * *

```

```

SeNPV      GCGTACGCAATTGTTACCGATACGTCATCCTCAACGAGGAGCGCCTCGAGGATTTGTTGC 750
TnNPV      CCGTCGACAATTGTTACAGGTACATATTATACAGTGAGGATAAGTTGAAGGATGTGCTCC 772
HaNPV      AATTGAACTCTTGCTTTAAATACGACATACGTGACGAGAATAAATTGAAAGAATTGGTGT 835
          *   *   *** *   ***   *   *** *   *   *   *   *

SeNPV      GCTACGTGGGCCCGATAGCGATAGCCGTCGACGCCGTCGATCTGACCGACTATTACGGCG 810
TnNPV      ATGAAATGGGACCAATAGCAGTAGCCGTCGATGCCGTCGATCTTACCGATTATTACGGAG 832
HaNPV      ACACACTGGACCTGTGGCGATAGCAGTCGACGCCATGGACATTATTAATTATCGCAGAG 895
          ** ** * ** ***** ** * ** * ** * ** *

SeNPV      GAATCGTGAGTTTCTGCGAGAACAACGGTCTCAATCATGCGGTGCTGCTGGTGGGCTACG 870
TnNPV      GAATAATCACTTCTTGTA AAAACTATGGACTCAATCATGCCGTGCTTCTTGTCGGTTACG 892
HaNPV      GAATATGAATCAATGTACATTTATGATTTGAATCATGCCGTTTTGCTTATCGGTTGGG 955
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      GCGTCGAGAACAACGTGCCCTACTGGATCATAAAGAATTCGTGGGGCAGCGATTACGGCG 930
TnNPV      GCACAGAAAATGGCATTCCGTTCTGGGTGTTGAAAAATTCGTGGGGAACAGACTACGGAG 952
HaNPV      GTATCGAAAAACAATGTACCCTATTGGATTATAAAAAATTCATGGGGAGAAGATTGGGGCG 1015
          *   ** ** * ** * ** * * * * * * * * * * * * * * *

SeNPV      AAGACGATACGTGCGGGTTCGTGCGGAGTCAATTCTGCGGCATGATAAACGAACTGG 990
TnNPV      AAAACGGATTTGTCAGAGTAAAAAGAAACGTA AACTCGTGCGGTATGATCAACGAATTGG 1012
HaNPV      AAAACGGCTATTTGCGAGTGCGGCGCAACGTCAAC----- 1050
          ** **** * * * ** * ** **

SeNPV      CGTCGAGCGCTCAAGTCGTATAAGCCTGCGGATTACTCAACGAATTCGGCGCGTCGTCCG 1050
TnNPV      CGGCATCGGCGCGAATAAAATAA----- 1035
HaNPV      -----

SeNPV      TAATTCAATAA 1061
TnNPV      -----
HaNPV      -----

```

ตารางผนวกที่ 4 ค่า melting temperature (Tm) และปริมาณเบส G และ C ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน
เทคนิค PCR- based typing

ชนิดไพรเมอร์/ลำดับเบส	ขนาด (คู่เบส)	ค่า Tm (°C)	ปริมาณ GC (%)
chitinase forward primer			
5'-GAA CGA ACC A(GC)TA CAA AGG CA-3'	20	58 (60)	45 (50)
chitinase reverse primer			
5'-TAC(T) GAT TTC(T) AAA(G) GGA(C) GCG(T) TG-3'	20	58 (56)	45 (40)
polyhedrin forward primer I			
5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC A-3'	19	50 (56)	31.58 (41.37)
polyhedrin reverse primer I			
5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) G-3'	19	48 (56)	26.32 (47.37)
polyhedrin forward primer II			
5'-ATT(C) AAA(G) AAT(C) GCC(TA) AAA(G) GGC AA-3'	20	52 (58)	30 (45)
polyhedrin reverse primer II			
5'-AAC TTT(C) TAC AAA(G) CCA(C) ATT(C) GT-3'	20	50 (56)	25 (45)
cathepsin forward primer			
5'-TT(AC)G AA(G)A GTC AA(G)T ATG CC(T)A T-3'	19	50 (54, 56)	31.58 (42.11, 47.37)
cathepsin reverse primer			
5'-TAG CA(GC)G TCG AC(T)G CCC A(G)TG(C) G-3'	19	62 (66)	63.16 (73.68)

ตารางผนวกที่ 5 ค่า melting temperature (Tm) และปริมาณเบส G และ C ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน
เทคนิค AFLP

ชนิดไพรเมอร์/ลำดับเบส	ขนาด (คู่เบส)	ค่า Tm (°C)	ปริมาณ GC (%)
<i>EcoRI</i> primer + 0 (E-0)			
5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'	16	48	50
<i>MseI</i> primer + 0 (M-0)			
5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'	16	46	43.75
<i>EcoRI</i> primer + 1 (E-A)			
5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'	17	50	47.06
<i>MseI</i> primer + 1 (M-C)			
5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'	17	50	45 (40)
<i>EcoRI</i> primer + 2 (E-AA)			
5'-GAC TGC GTA CCA ATT CAA - 3'	18	52	44.44
<i>MseI</i> primer + 2 (M-CG)			
5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACG-3'	18	54	50

ตารางผนวกที่ 6 สรุปขนาดของชิ้นดีเอ็นเอไวรัสจากการใช้ไพรเมอร์ *EcoRI* แบบต่างๆ ที่มีการเพิ่มเบส โดยวิเคราะห์จาก โปรแกรมคอมพิวเตอร์ <http://www.bioinformatics.vg/sms/> และใช้จีโนมของไวรัสใน www.ncbi.co.th เพื่อประเมินก่อนปฏิบัติงานจริง

ชนิด ไวรัส	<i>EcoRI</i> +1 base	ขนาด (คู่เบส)	<i>EcoRI</i> +2 base	ขนาด (คู่เบส)	<i>EcoRI</i> +3 base	ขนาด (คู่เบส)
HaSNPV	A	556, 330, 142, 101, 91, 77, 47	AA	556, 330, 101	AAT	556
			AC	77	ACG	77
			AT	142, 47	AAC	330
			AG	91	ATC	47
					ATT	142
					ATA	101
					AGA	91
SeMNPV	A	382, 75	AA	382, 75	AAC	382, 75
			AT	232	ATC	232
			CA		ACT	75
					CAT	50
SIMNPV	A	208, 199, 192, 160, 134, 85, 78, 63, 55, 48, 11	AA	208, 192, 134, 85, 63	AAA	208, 192, 63
			AT	199, 160, 196, 55, 48, 11	ATC	199, 48, 11
			AG	78	CTA	199
					ATA	160
					AAC	134
					AAG	85
					AGT	78
					ATT	55
TnSNPV	A	577, 138, 124, 51	AT	577	ATA	577
			AA	138, 51	AAT	138
			AC	124	ACG	124
					AAG	51

ตารางผนวกที่ 7 สรุปขนาดของซันดีเอ็นเอไวรัสจากการใช้ไพรเมอร์ *Mse* I แบบต่างๆ ที่มีการเพิ่มเบสโดยวิเคราะห์จาก โปรแกรมคอมพิวเตอร์ <http://www.bioinformatics.vg/sms/> และใช้จีโนมของไวรัสใน www.ncbi.co.th เพื่อประเมินก่อนปฏิบัติงานจริง

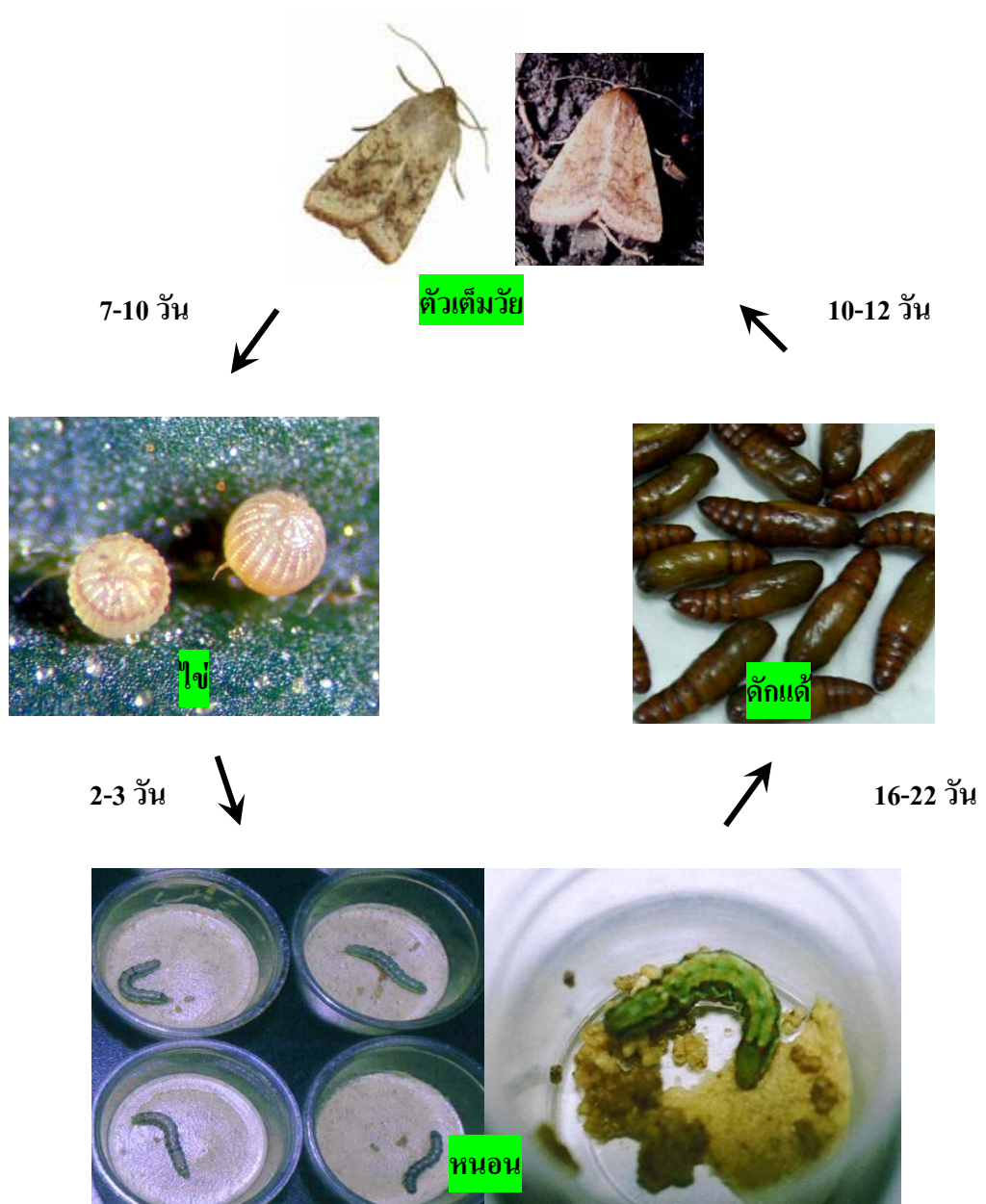
ชนิดไวรัส	<i>Mse</i> I+1 base	ขนาด (คู่เบส)	<i>Mse</i> I+2 base	ขนาด (คู่เบส)	<i>Mse</i> I+3 base	ขนาด (คู่เบส)
HaSNPV	C	434, 311, 177	CG	434, 177	CGA	434
			CA	311	CAA	311
					CGA	177
SeMNPV	C	636, 339	CG	636, 339	CGC	636
			CA	50	CGT	339
					CAT	50
SiMNPV	C	555, 199	CG	555	CGC	555
			CT	199	CTA	199
TnSNPV	C	214, 229, 113, 39	CT	229	CTA	229
			CA	214, 113	CAG	214
			CG	39	CAA	113
					CGT	39

การเตรียมสารละลาย

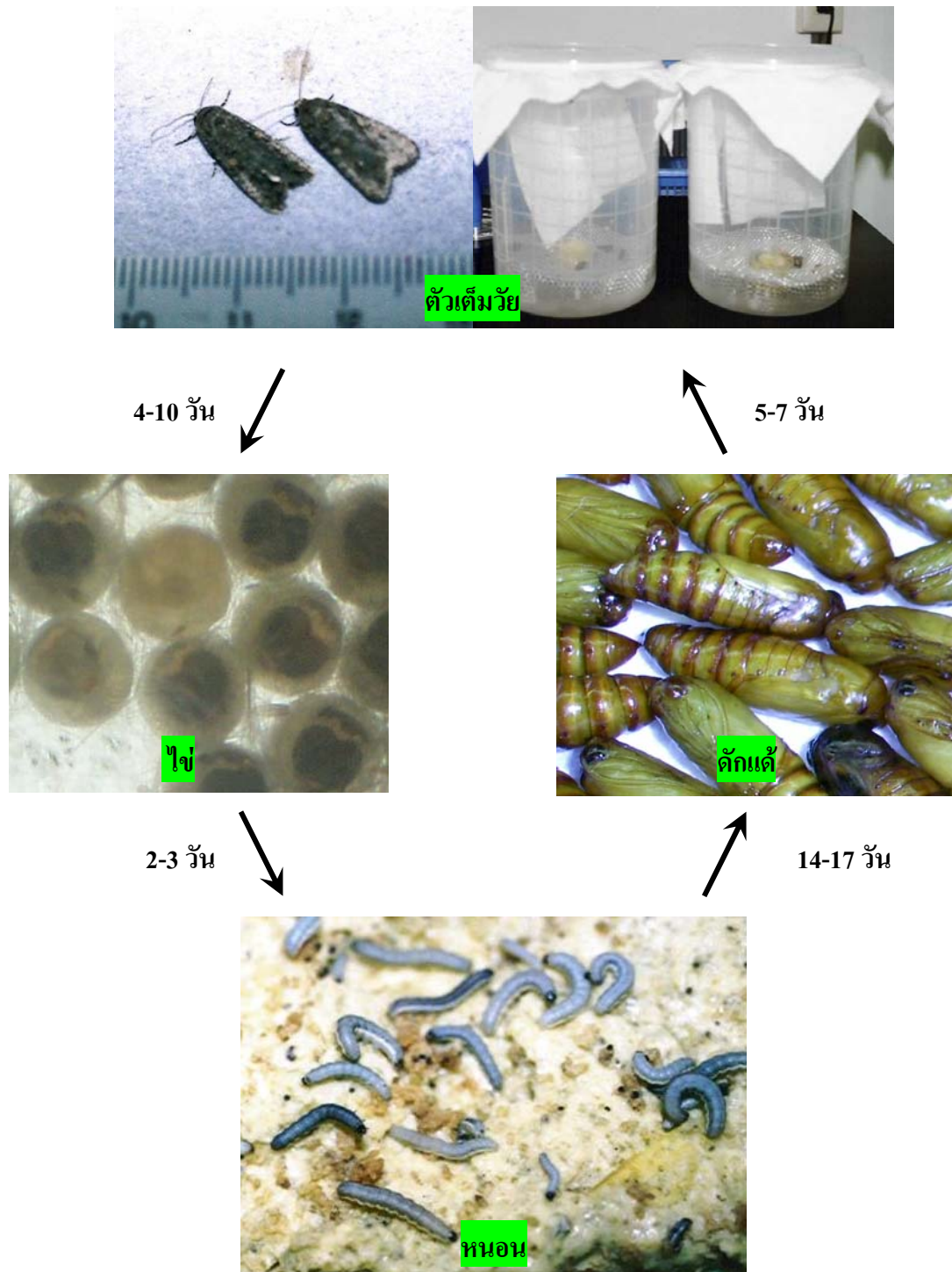
การเตรียมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสมักเตรียมไว้เป็นความเข้มข้นสูงๆ เวลาจะใช้จึงจะเจือจางลงตามที่ต้องการ ดังนี้ 10x TBE ประกอบด้วย Tris base 108 กรัม boric acid 55 กรัม 0.5 M EDTA (pH 8) 40 มิลลิลิตร ปริมาตรรวม 1 ลิตร และ การเตรียม 6x loading buffer ประกอบด้วย 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol ใน electrophoresis buffer หรือน้ำกลั่น



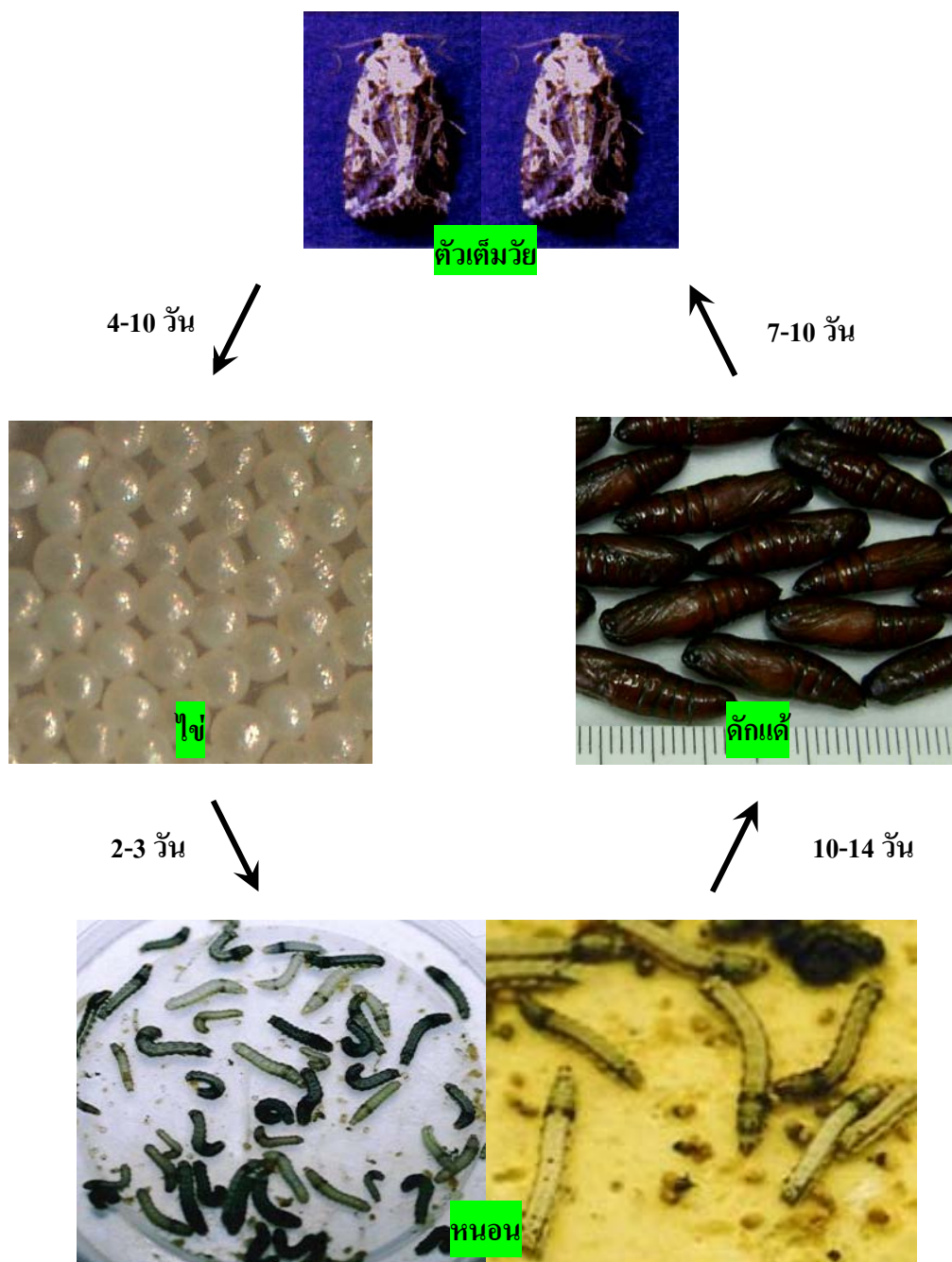
ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะหนอนเจาะสมอฝ้าย (a) หนอนกระทู้หอม (b) หนอนกระทู้ผัก (c) และ หนอนคืบกะหล่ำ (d) ตายด้วยไวรัส NPV



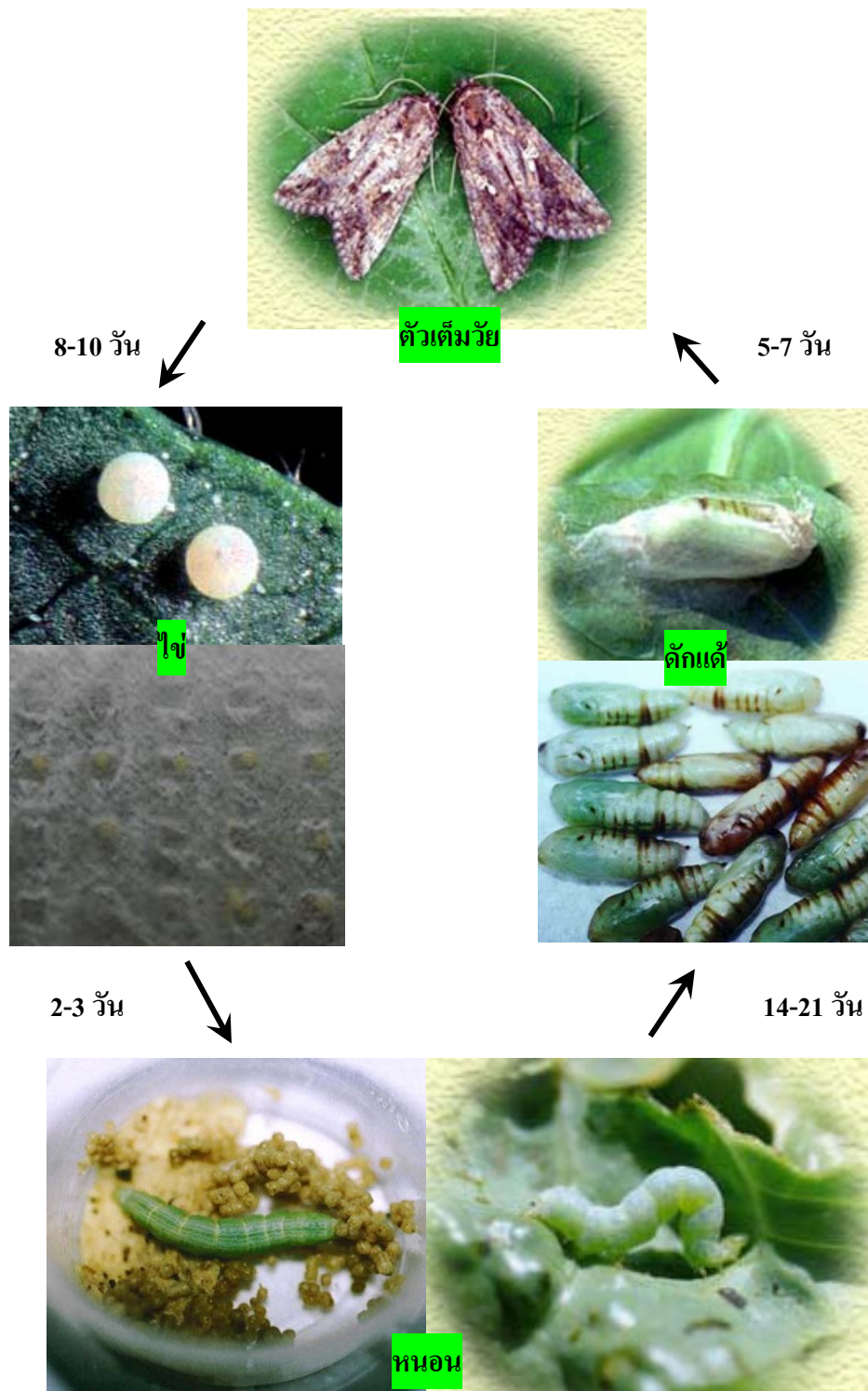
ภาพผนวกที่ 2 วัฏจักรชีวิตของหนอนเจาะสมอฝ้าย ได้แก่ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย



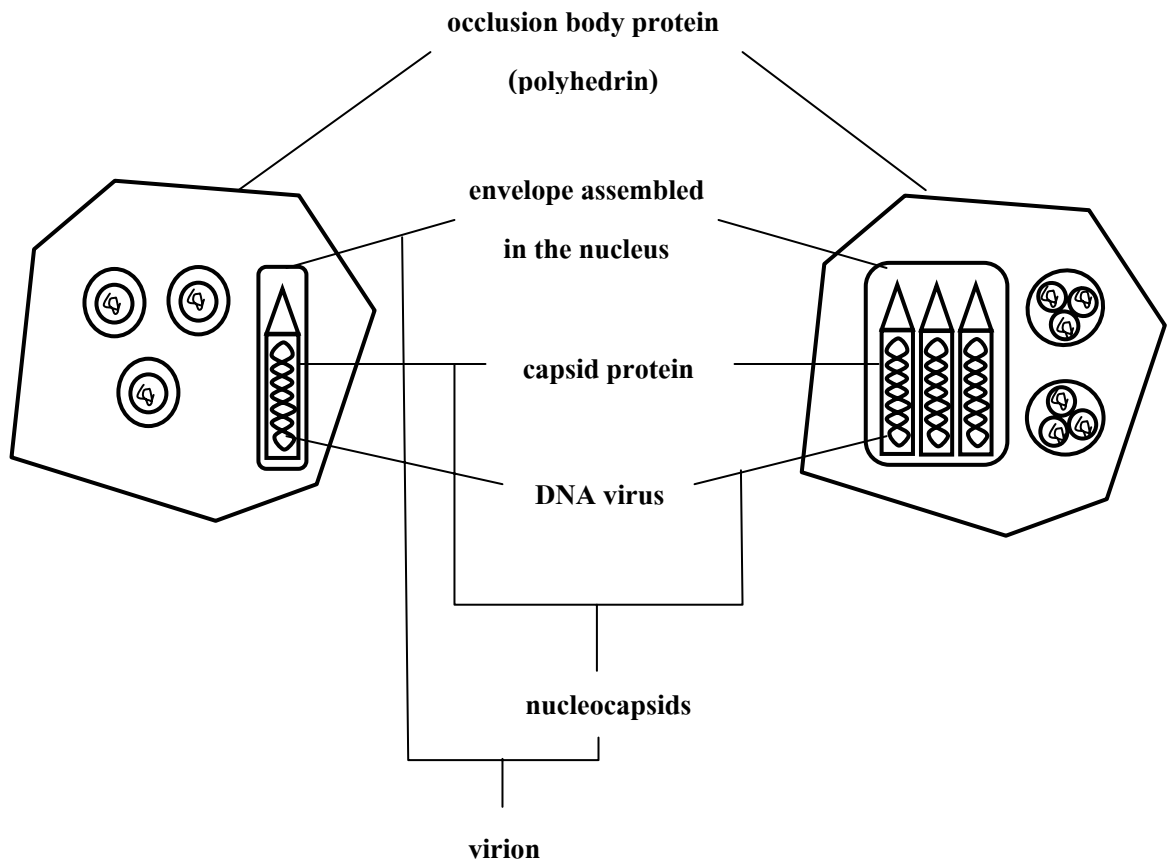
ภาพผนวกที่ 3 วิถีจักรชีวิตของหนอนกระทู้หอม ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ตักแต้ และตัวเต็มวัย



ภาพผนวกที่ 4 วัฏจักรชีวิตของหนอนกระทู้ผัก ได้แก่ ไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย



ภาพผนวกที่ 5 วัฏจักรชีวิตของหนอนทึบกะหล่ำ ได้แก่ ระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย



Single - nucleocapsid NPV (SNPV)

Multiple - nucleocapsid NPV (MNPV)

ภาพผนวกที่ 6 ลักษณะโครงสร้างไวรัสแบบ single - nucleocapsid NPV (SNPV) และ multiple - nucleocapsid NPV (MNPV)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวสุชลวรัตน์ ว่องไวลิขิต
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 16 มกราคม 2507
สถานที่เกิด	จังหวัดจันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยรามคำแหง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักกีฏวิทยา 7ว
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร 50 ถนนพหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	<ol style="list-style-type: none">รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น (หัวหน้าคณะวิจัย) เรื่อง วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส <i>Spodoptera exigua</i> Multiple-nucleocapsids Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) จากเซลล์เพาะเลี้ยง (<i>in vitro</i>) ในการประชุมวิชาการกรม วิชาการเกษตร ผลงานวิจัยปี 2550 (วันที่ 16-18 มิถุนายน 2551)รางวัลผลงานวิจัยระดับดี อันดับ 3 (หัวหน้าคณะวิจัย) เรื่อง ลักษณะรูปร่างและชีวโมเลกุลของไวรัส NPV โรค หนอนคืบกะหล่ำ ในการประชุมวิชาการอารักขาพืช แห่งชาติ ครั้งที่ 8 (วันที่ 20-22 พฤศจิกายน พ.ศ. 2550)รางวัลผลงานวิจัย อันดับ 3 (หัวหน้าคณะวิจัย) เรื่อง เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกะหล่ำปลี ใน การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 (วันที่ 21- 23 พฤศจิกายน พ.ศ. 2544)รางวัลผลงานวิจัยดีเด่น (ผู้ร่วมวิจัย) เรื่อง การผลิตไวรัส NPV เชิงพาณิชย์ในประเทศไทย เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ในการ ประชุมวิชาการกรมวิชาการเกษตร ผลงานวิจัยปี 2539 (วันที่ 28 เมษายน พ.ศ. 2540)

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

1. ทุนผู้ช่วยสอนจากบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2546)
2. ทุนอุดหนุนการค้นคว้าและวิจัยประเภทวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2547)