

ชุดโครงการ 75 โครงการวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
โครงการ 213 โครงการวิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี
กิจกรรม 2. การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช
กิจกรรมย่อย 2.1 การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง
Development Technology of Nucleopolyhedrovirus Producing
from Cell Culture

สุขลวัญ ว่องไวลิขิต สาทิพย์ มาลี เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง เดือนตุลาคม 2553 ถึง เดือนกันยายน 2554 เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ต้นแบบได้ตามเทคนิควิธีการนี้ โดยมีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์หนอนเจาะสมอฝ้ายที่ 90.05 % เซลล์หนอนใยผักที่ 90.21 % เซลล์หนอนกระทู้ผัก ที่ 91.25 % และเซลล์หนอนกระทู้หอม 91.45 % ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ซึ่งต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงพัฒนาเพื่อให้ได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) และผลการตรวจวิเคราะห์ทางชีวโมเลกุลยังแสดงผลไปในทิศทางเดียวกัน

คำหลัก : เซลล์แมลงเพาะเลี้ยง การผลิต Insect cell culture, Nucleopolyhedrovirus, NPV, producing, biopesticide

คำนำ

การใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลงเป็นสารชีวอินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้แพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก เช่น สหภาพโซเวียต อินเดีย จีน ญี่ปุ่น แอฟริกา ออสเตรเลีย อเมริกา เป็นต้น บางชนิดได้มีการผลิตเป็นการค้า เนื่องจากควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีและมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ทำให้ไวรัสมีความเฉพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลง (Entwistle, 1998) สำหรับในประเทศไทย นับแต่ปี พ.ศ. 2510 มีรายงานการศึกษาวิจัยโรคไวรัส NPV สาเหตุโรคของแมลง ในกลุ่ม Nucleopolyhedrovirus (NPV) หรือชื่อเต็ม Nuclear polyhedrosis viruses (อุทัย, 2544) โดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้มีการวิจัยและพัฒนาการผลิตขยายและการใช้ไวรัสสาเหตุโรคของแมลง ชนิด *Spodoptera exigua* Multiple-nucleocapsid Nucleopolyhedrovirus (SeMNPV) เป็นปริมาณมากในรูปแบบการผลิตแบบ *in vivo* คือ ผลิตจากหนอนแมลง เนื่องจาก ไวรัสจะสามารถเจริญขยายเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น การผลิตไวรัสจึงสามารถผลิตขยายได้ 2 รูปแบบ คือ การผลิตจากหนอนแมลง เรียกว่าแบบ *in vivo* และ ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง เรียกว่า แบบ *in vitro* (สุชลวัจน, 2545; Wongwilikhit and Somsuk, 2006) ปัญหาที่พบในการผลิตไวรัส SeMNPV ที่ใช้รูปแบบการผลิต แบบ *in vivo* คือ 1.) อัตราการผลิตไวรัสแต่ละรุ่น/ชนิดไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากเลี้ยงหนอนไม่ได้ตามกำหนดเวลาที่ต้องการใช้แต่ละรุ่น 2.) ประสิทธิภาพไม่แน่นอน มีกลิ่นเหม็น เนื่องจากมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น เช่น แบคทีเรีย โปรโตซัว รา ทั้งที่เป็นสาเหตุโรคแมลงหรือแม้แต่ไวรัสที่ต่างชนิดกัน และผลิตภัณฑ์ไวรัสไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางสรีระวิทยา 3.) ผลิตภัณฑ์ไวรัสที่มีจำหน่ายทุกวันนี้ ยังไม่สามารถกำหนดมาตรฐานในการขึ้นทะเบียนสารชีวอินทรีย์ตามมาตรฐานความปลอดภัยทางชีวภาพ เพียงแต่ให้ใช้แบบไม่มีการขึ้นทะเบียนเท่านั้น 5.) การใช้สถานที่และแรงงานในการปฏิบัติงานมาก ซึ่งทำให้มีต้นทุนสูง และทำให้มีข้อจำกัดในกระบวนการผลิตขยายในปริมาณมาก (อุทัยและคณะ, 2537) การแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นของการผลิตไวรัส SeMNPV แบบ *in vivo* จึงมีการทดลองวิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง หรือที่เรียกว่า การผลิตแบบ *in vitro* โดยนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช จาก United States Department of Agriculture (USDA) ประเทศสหรัฐอเมริกา (สุชลวัจน, 2539; สุชลวัจนและคณะ, 2543; Lynn and Shapiro, 1998) มาใช้ทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนแมลงสายพันธุ์ไทยในกลุ่มแมลงศัตรูพืชผัก ผลจากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้ผักสายพันธุ์ไทย (Sl cell line : *Spodoptera litura* cell line) จากเอ็มบริโอ (Embryonic stem cell) ได้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงชนิดนี้ได้เป็นผลดี มีอัตราการเจริญ 91.49 % (สุชลวัจนและคณะ, 2545) ต่อมาใช้เทคนิคเดียวกันเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทู้หอมมีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ 90.91 % และได้เป็นรูปแบบการผลิตขยายไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่องกันได้ดี (สุชลวัจนและคณะ, 2551) ดังนั้น จึงทำการวิจัยพัฒนาต่อยอดเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดใหม่เพิ่มเติม ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ในการผลิตไวรัส NPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง เพื่อให้ได้เทคโนโลยีที่สามารถนำไปขยายผลในเชิง

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- วัสดุอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างแมลงและการเลี้ยงแมลงในห้องปฏิบัติการ เช่น กล่องพลาสติก ปากคีบ น้ำหวาน อาหารเทียมเลี้ยงแมลง เป็นต้น
- วัสดุอุปกรณ์การเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ขวดใส่สารละลาย สารเคมีผสมสูตรสำเร็จ กระจกกรอง ชุดกรองสารละลาย จานพลาสติกเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง ชุดเครื่องผ่าตัด หลอดดูดสารละลาย หลอดปั่นแยกสาร T-flask และภาชนะเพาะเลี้ยง Cells lines ขนาดต่างๆ อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ สารเคมีที่จำเป็น เช่น Sodium phosphate, Serum, Glucose, Yeastolate, Tryptose, Primatone, Cystine, Methionine, Inosine, Pluronic, Sodium bicarbonate, Potassium chloride, Magnesium sulfate เป็นต้น
- เครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เช่น เครื่องกรองอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลง เครื่องวัดค่าออสโมซิส กล้องจุลทรรศน์ ถังไนโตรเจนเหลวเก็บสต็อกเซลล์ ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องเพาะเลี้ยงเซลล์ cell spin เป็นต้น
- วัสดุอุปกรณ์เก็บตัวอย่าง Cell line เช่น หลอด Cryotube ใส่สารละลาย ไนโตรเจนเหลว เป็นต้น

วิธีการ

ดำเนินการทดลองวิจัยย่อย 2 การทดลอง ได้แก่ 1.) เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ 2.) เพาะเลี้ยงไวรัสจากเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

การทดลองที่ 1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

เพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell ตามเทคนิควิธีการของ สุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 °C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซิส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 อัตราการเลี้ยงขยายเซลล์ (sub-culture) 1:5 ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มม. ทำการ sub-culture 3-4 วัน/ครั้ง คัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability)

มากกว่า 80% เพื่อให้ได้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5-10 เท่า ภายใน 4-7 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) จำนวน 2 ซ้ำ เพื่อหาอัตราการเจริญของเซลล์ที่เหมาะสมในแต่ละภาชนะ และอัตราการขยายเพิ่มปริมาณ บันทึกผลโดยการตรวจนับจำนวนเซลล์ทุกวันต่อเนื่องด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ เปรียบเทียบอัตราการเจริญของเซลล์ โดยคำนวณจากค่าร้อยละของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ แล้วคัดเลือก Se-cell line ไปใช้ในการทดลองที่ 2

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับเซลล์หนองแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างหนองและเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วยโกร่งเย็น เติม PBS 1,000 μ l เพื่อรักษาสภาพเซลล์ ปั่นเหวี่ยง 2,000 - 5,000 rpm 5 นาที เติม extraction buffer 500 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เติม cool 5M potassium acetate 120 μ l และ proteinase K 10 μ l แช่เย็น 30 นาที เติม phenol/chloroform 1:1 500 μ l ปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 95% Cool ethanol ปริมาตรเป็น 2 เท่าของส่วนใส ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 70% ethanol 200 μ l ปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอนทิ้งให้ ethanol ระเหยที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จากนั้นเติม TE buffer 30 μ l ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

การทดลองที่ 2. เพาะเลี้ยงไวรัสจากเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

นำเซลล์หนองกระทุ้หอมเพาะเลี้ยงที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 ข้างต้น มาเลี้ยงขยายในภาชนะ แบบ T-flask ใช้เซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการสร้างผลึกไวรัสในเซลล์หนอง กระทุ้หอมเพาะเลี้ยง หลังจาก sub-culture 4 วัน และเพาะอนุภาคไวรัส (infection) จากเลือดหนองกระทุ้หอม ในเซลล์เพาะเลี้ยง อนุภาคไวรัสที่ใช้มีค่า Multiplicity of infection (MOI) ที่เหมาะสมต่อความเข้มข้นของเซลล์ตั้งต้น $2 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ เซลล์/มล. จำนวน 2 ซ้ำต่ออัตราอนุภาคไวรัส หลังจากนั้น ตรวจดูการสร้างผลึกโปรตีนไวรัสบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted microscope เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ ตรวจนับจำนวนผลึกไวรัสที่ได้ด้วยสไลด์ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light compound microscope จำนวน 4 ซ้ำ คัดเลือกอัตราอนุภาคไวรัสที่ดีที่สุดในการทดลองข้างต้นนำมาใช้ผลิตขยายแบบต่อเนื่องจำนวน 3 รอบการผลิต โดยทำการปั่นแยกอนุภาคไวรัสจากผลผลิตไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง ปั่นตกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 10,000g นาน 8 นาที มาใช้เพาะเลี้ยงอนุภาคไวรัสในเซลล์เพาะเลี้ยงในรอบการผลิตถัดไป รอบที่ 1 และ 2 ในภาชนะ แบบ cell spin flask (ปริมาตร 500 - 1,000 มล./ขวด)

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล เปรียบเทียบกับไวรัสที่ผลิตจากหนองแมลงปกติ โดย สกัดตัวอย่างไวรัสที่ผลิตจากหนอง และ ไวรัสที่ผลิตจาก

เซลล์เพาะเลี้ยงตามวิธีการของ (Wongwilikhit *et al.* 2008) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับวิเคราะห์แถบของดีเอ็นเอ

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองวิจัย ตั้งแต่ เดือนตุลาคม 2553 ถึงสิ้นสุด เดือนกันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยาสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองย่อยที่ 1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

จากการเพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell จากหนอนแรกเกิด เปรียบเทียบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม ตามเทคนิควิธีการของ สุชลวัจน์ (2545) เพาะเลี้ยงไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่ 27 °C ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช มีค่าออสโมซิส 350 – 360 mOsmols/kg. ค่า pH 6.2- 6.3 อัตราการเลี้ยงขยายเซลล์ (sub-culture) 1:5 ในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มม. ทำการ sub-culture 3-4 วัน/ครั้ง คัดเลือกเซลล์เพาะเลี้ยงให้มีค่าร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80% เพื่อให้ได้อัตราการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น 5 เท่าภายใน 4 วัน ใช้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงตั้งต้น (starter cells) และตรวจดูความต่อเนื่องของการเจริญของเซลล์ พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง 4 ชนิด สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ต้นแบบได้ตามเทคนิควิธีการนี้ โดยมีค่าร้อยละการเจริญที่สูงสุดของเซลล์ เซลล์หนอนใยผักที่ 90.21 % หนอนเจาะสมอฝ้ายที่ 90.05 % เซลล์หนอนกระทู้ผัก ที่ 91.25 % และเซลล์หนอนกระทู้หอม 91.45 % (ตารางที่ 1) ซึ่งยังคงสภาพได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยง (cell line) ซึ่งต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงพัฒนาเพื่อให้ได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) จึงจะนำไปใช้ในการทดลองที่ 2 ต่อไป

การควบคุมคุณภาพเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลพบว่า แถบของดีเอ็นเอเซลล์เพาะเลี้ยงเปรียบเทียบกับเซลล์หนอนแมลงอยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อยืนยันผลความเหมือนกัน

ตารางที่ 1. ร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability) มากกว่า 80%

แหล่งที่เก็บ ตัวอย่างแมลง	ร้อยละการเจริญของเซลล์ที่สามารถเจริญต่อไปได้ (cells viability)			
	เซลล์ หนอนใยผัก	เซลล์หนอน เจาะสมอฝ้าย	เซลล์หนอน กระทู้ผัก	เซลล์หนอน กระทู้หอม
1. กาญจนบุรี	90.21	90.05	91.25	91.45
2. นครราชสีมา	-	85.90	-	-
3. นนทบุรี	-	-	87.35	-
4. กรุงเทพฯ	-	-	83.25	-

การทดลองย่อยที่ 2. เพาะเลี้ยงไวรัสจากเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ

ดำเนินการต่อจากการทดลองย่อยที่ 1. เพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืชสายพันธุ์ไทยต้นแบบ จนกระทั่งได้เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงต่อเนื่อง (continuous cell line) แล้ว และ การควบคุมคุณภาพไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล พบว่า แถบของดีเอ็นเอ ไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยง อยู่ที่ตำแหน่งตรงกัน ซึ่งควรได้มีการวิจัยเพิ่มเติม โดยใช้ Degenerate primers หรือ Restriction enzyme หรือ ลำดับเบสของดีเอ็นเอ เพื่อ ยืนยันผลความเหมือนกันต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงขยายเซลล์แมลงเพาะเลี้ยง จาก Embryonic stem cell จากหนอนแรก เกิด เปรียบเทียบ 4 ชนิด ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ต้นแบบได้ตามเทคนิควิธีการนี้ ที่สามารถนำไปเผยแพร่ได้ และถ้าวิจัย ต่อเนื่องนำไปประยุกต์ต่อยอด จะได้เป็นต้นแบบที่เหมาะสมต่อการผลิตขยายไวรัสจากเซลล์เพาะเลี้ยง มาตรฐาน ที่สามารถนำไปจดสิทธิบัตร เพื่อเป็นประโยชน์ของกรมวิชาการเกษตรต่อไป นอกจากนี้ การตรวจวิเคราะห์คุณภาพไวรัสที่ผลิตจากหนอน และ ไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ยืนยันผลไปในทิศทางเดียวกัน

การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

ผลงานวิจัยนี้เมื่อเสร็จสมบูรณ์ จะสามารถเผยแพร่เทคนิคการผลิตขยายไวรัสจากเพาะเลี้ยง เซลล์ และ การควบคุมคุณภาพไวรัสที่ผลิตจากเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล ให้กับผู้สนใจได้

กลุ่มเป้าหมายคือ นักวิจัย นักวิชาการ ด้านการป้องกันกำจัดโดยชีววิธี และด้านอารักขาพืชที่เกี่ยวข้อง รวมถึงผู้สนใจทั้งภาครัฐและเอกชน

เอกสารอ้างอิง

- ทิพย์วดี อรรถธรรม และ สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2530. เอกสารวิชาการ เทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อไวรัสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต 2545. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์แมลงศัตรูพืช เอกสารประกอบการบรรยายเชิงปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพฯ.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต อุทัย เกตุนุติ และ พิมลพร นันทะ. 2543. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทุ้หอมเพื่อการผลิตเชื้อไวรัส NPV. น. 447-458. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 12. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 28-31 มีนาคม 2543. ณ โรงแรมอมารี ออคิด รีสอร์ท เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2544. เชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนคืบกะหล่ำปลี. น. 73-78. ใน เอกสารการประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ. ครั้งที่ 5. 21-23 พฤศจิกายน 2544. โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จ.กาญจนบุรี.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต พิมลพร นันทะ และ วัชรีย์ สมสุข.. 2545. การเพาะเลี้ยงเซลล์หนอนกระทุ้ฝักสวายพันธุ์ไทยจากเอ็มบริโอ. น. 197-206. ใน เอกสารวิชาการประชุมสัมมนาทางวิชาการ “เทคโนโลยีการจัดการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชเพื่อเกษตรดีที่เหมาะสม” ครั้งที่ 13. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร . 6-9 สิงหาคม 2545. ณ โรงแรม โกลเด้นแซนด์ จังหวัดเพชรบุรี.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต วัชรีย์ สมสุข เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ และ สาทิพย์ มาลี. 2548. การตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ไวรัส NPV. รายงานผลงานประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.
- สุขลวีจัน ว่องไวลิขิต วัชรีย์ สมสุข สาทิพย์ มาลี และ เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์. 2551. วิจัยรูปแบบการผลิตไวรัส SeMNPV จากเซลล์เพาะเลี้ยง (*in vitro*). น. 1-11. ใน เอกสารผลงานวิจัยดีเด่นและผลงานวิจัยที่เสนอเข้าร่วมพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2550. การประชุมวิชาการประจำปี 2551 กรมวิชาการเกษตร. วันที่ 16-18 มิถุนายน 2551. ณ โรงแรม มิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.
- สุดาวรรณ เขยชมศรี. 2542. เทคโนโลยีการผลิตไวรัสกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์. น. 72-82. ใน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สารชีวอินทรีย์กำจัดศัตรูพืช ในศตวรรษที่ 21. จัดโดย สมาคม กัญและสัตววิทยาแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริม

การเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ
แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 15-16 กรกฎาคม 2542. ณ โรงแรมมิราเคิล แกรนด์
คอนเวนชั่น กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ อัจฉรา ตันติโชคก สุชลวัจน ว่องไวลิขิต และ พิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิต
และทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. น. 457-486. ใน เอกสารวิชาการ การประชุมสัมมนา
วิชาการ”แมลงและสัตว์ศัตรูพืช” ครั้งที่ 9 กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. น. 141-177. ใน เอกสารวิชาการ การ
ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี เพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการ
เกษตร. พิมพ์ที่โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด กรุงเทพฯ.

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

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