

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาถึงบทบาทและความสำคัญของยีนไคตินเนสของ *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus ในการฆ่าหนอนแมลง โดยได้ทำการศึกษายีนไคตินเนสของแบคทีเรียไวรัสสายพันธุ์ท้องถิ่นที่แยกได้จากหนอนเจาะสมอฝ้ายในประเทศไทย เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของไคตินเนสของไวรัสสายพันธุ์ไทยคล้ายคลึงกับกรดอะมิโนของไคตินเนสจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับไคตินเนสของ HaSNPV-Aus, HaSNPV-Af, HaSNPV-G4 และ HzSNPV-Elcar ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้าง HaSNPV recombinant baculovirus ที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้ โดยทำการแทรกยีน Green fluorescent protein ที่อยู่ภายใต้การควบคุมการทำงานของ polyhedrin promoter เข้าไปในยีนไคตินเนส โดยอาศัยกระบวนการ homologous recombination จากนั้นทำการทดสอบประสิทธิภาพของไวรัสดังกล่าวในการฆ่าหนอนแมลง พบว่าหนอนแมลงที่ติดเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม (wildtype) จะมีลักษณะตัวที่เปราะบาง ผิวมีสีดำนวล และมีการย่อยสลายของตัวหนอนที่รวดเร็ว (liquefied) ในขณะที่หนอนที่ติดเชื้อไวรัสที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสนั้น ลักษณะของตัวหนอนที่ตายอยู่ในสภาพที่ดี ผิวมีสีครีมและมีสีดำค่อนข้างขาว และมีการย่อยสลายของตัวหนอนที่ช้ากว่ามากโดยใช้เวลาหลายวัน นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาที่ใช้ในการฆ่าหนอนแมลงของเชื้อไวรัสที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันจำเป็นต้องใช้ปริมาณไวรัสเพิ่มขึ้นในการฆ่าหนอนแมลงเช่นกัน โดยมีค่า LC_{50} และค่า LT_{50} มากกว่า 99% และ 77% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับไวรัสสายพันธุ์ดั้งเดิม ในการศึกษานี้ได้มีความพยายามที่จะสร้างแบคทีเรียไวรัสที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคตินเนสเพิ่มมากขึ้น โดยได้ทำการเปลี่ยน chitinase promoter ด้วย polyhedrin promoter ให้มาควบคุมการทำงานของยีนไคตินเนส อย่างไรก็ตามไวรัสที่ได้ไม่สามารถที่จะสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้

ABSTARCT

This study examines the role and importance of the *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaSNPV) chitinase gene in viral pathogenesis in *H. amrmigera* larvae. A putative chitinase gene of a Thai-isolated HaSNPV (HaSNPV-Th) was identified and characterized. The deduced amino acid of the HaSNPV-Th chitinase showed a significant homology with a wide range of chitinase sequences, with the greatest degree of homology being to the chitinase of HaSNPV-Aus, HaSNPV-Af, HaSNPV-G4 and HzSNPV-Elcar strains. To investigate the HaSNPV-Th chitinase function in insect infection, a chitinase-negative recombinant baculovirus was constructed by inserting a green fluorescent protein gene (*gfp*) driven by a polyhedrin promoter into the chitinase locus of the HaSNPV-Th genome. Insects infected with the virus mutant lacking chitinase remained intact several days after death. HaSNPV-encoded chitinase played an essential role in the liquefaction of virus-infected insect larvae. In addition, bioassay data showed a significant increase in the viral dose and time required for the virus mutant lacking chitinase to kill second instar larvae. The LC_{50} and LT_{50} were 99% and 77% respectively, higher than those of the wild type HaSNPV-Th. Our results strongly suggest that the HaSNPV-Th chitinase gene is required for the infectivity of the virus and plays an important role in virus pathogenesis. Attempts have been made to generate a chitinase-overproducing HaSNPV by replacing the chitinase promoter with the polyhedron promoter. However, the recombinant virus obtained from the cotransfection was failed to produce chitinase.

Keywords: Chitinase; HaSNPV; Baculoviruses; Chitinase-negative Baculovirus; Green fluorescent protein