**ชุดโครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

**โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

**กิจกรรม 2** การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

**กิจกรรมย่อย 2.1** การผลิตและการใช้ไวรัส NPV ควบคุมแมลงศัตรูพืช

**ชื่อการทดลอง** **การเพิ่มประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี ต่อแสงยูวีด้วยเทคนิค Starch encapsulation**

**Efficacy Increasing of Nucleopolyhedrovirus for sunlight ultraviolet through Starch-encapsulation Techniques**

**คณะผู้ดำเนินงาน**

| | | |
|---|---|---|
| **หัวหน้าการทดลอง** | สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| **ผู้ร่วมงาน** | ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | นันทนัช พินศรี | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |
| | อิศเรส เทียนทัด | สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช |


## บทคัดย่อ

ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) ต่อแสงยูวีด้วยเทคนิค Starch-encapsulation ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างปี 2557-58 โดยทำการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ ได้แก่ Titanium dioxide, Congo red, Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดัดแปร (modified tapioca starch) เป็นตัวเคลือบ เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ พบว่าเกิดฟิล์มบางๆ ล้อมรอบอนุภาคไวรัสในทุกกรรมวิธีอย่างชัดเจนเมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และเมื่อนำไปทดสอบด้วยการผ่านรังสียูวี ชนิดบี ที่เวลาต่างๆ พบว่า การเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวีทุกชนิดที่คัดเลือกมาทดสอบนี้ช่วยให้เชื้อไวรัสมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวีไปแล้ว 6 ชม. ซึ่งสูงกว่าเชื้อสดที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเหลือเพียง 32.6 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส (Original activity remaining percentage ) พบว่ามีเพียงสาร Titanium dioxide และ Congo red เท่านั้น ที่ช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวี ชนิดบีนานถึง 24 ชม. แสดงว่าการเคลือบไวรัสด้วยสารป้องกันรังสียูวีโดยเทคนิค Starch-encapsulation สามารถช่วยให้เชื้อไวรัสมีชีวิตรอดได้นานขึ้น และยังทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิม

**คำหลัก :** ไวรัสเอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม, หนอนกระทู้หอม, Starch-encapsulation, แป้งมันสำปะหลังดัดแปร,เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด

## Abstract

The study on increasing pest control efficacy of *Spodoptera exigua* Nucleopolyhedrovirus in ultraviolet light by using UV protectants and starch-encapsulation techniques was conducted at the laboratory of Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office during 2014 - 2015. By employing starch-encapsulation techniques, different UV protectants such as titanium dioxide, congo red, molasses, carbon charcoal, and skim milk were added to modified tapioca starch to coat the virus. An Transmission electron microscope revealed that the process created thin film of protectants around virus particles. The virus, treated with each formulation, was exposed to certain period of UVB light. It was found that, after exposing to UVB for six hours, the virus coated with UV protection in all tests were at least 50 percent effective in control the larvae, comparing to 32.6 percent by the cruded virus. Interestingly, after exposing to 24 hours of UVB, only the virus coated with either titanium dioxide or congo red still maintained not less than 50 percent survival according to the original activity remaining percentage. The study showed that UV protectants and starch-encapsulation technique could enable the treated virus to survive longer in UVB light and, hence, increase its efficacy in controlling larvae.
**Key word:** *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV), Beet armyworm, Starch-encapsulation, modified tapioca starch**,** original activities remainding percentage

## คำนำ

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาปกป้องผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะต่อการเพิ่มผลผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก เนื่องจากเกษตรกรคุ้นเคยกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงมานานมากกว่า 30 ปี เพราะออกฤทธิ์เร็ว และควบคุมความเสียหายจากแมลงศัตรูพืชได้ทันต่อเหตุการณ์ ปัจจุบันจึงพบว่าแมลงศัตรูพืชที่เป็นปัญหาสำคัญหลายชนิด สามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องพ่นสารฆ่าแมลงบ่อยครั้งขึ้น ใช้ชนิดของสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น และใช้สารฆ่าแมลงหลายชนิดพ่นพร้อมๆ กันในคราวเดียว ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้สารฆ่าแมลง และสารฆ่าแมลงเหล่านี้ยังเป็นพิษตกค้างบนผลิตผล เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของประชากร ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ กรมวิชาการเกษตรจึงได้ค้นคว้าวิจัยนำจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง โดยการค้นคว้าวิจัยไวรัสชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่พบในประเทศไทยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อไป จุลินทรีย์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูง มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย จึงปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมสูง และเป็นที่ยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าไวรัส NPV เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหลักร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดอื่นๆ ที่เหมาะสมในระบบการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest

Management) กรมวิชาการเกษตรได้มีนโยบายที่จะสร้างความปลอดภัย ลดการปนเปื้อนและผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ด้วยการหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและไม่เพิ่มต้นทุนการผลิต (กรมวิชาการเกษตร, 2542; Matthews,1984) แต่การใช้ไวรัสก็มีข้อจำกัดอยู่บางประการ จากการเสื่อมจากสภาพอากาศที่ร้อนมีแสงแดด โดยเฉพาะรังสียูวีบีในแสงแดดเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการลดประสิทธิภาพของเชื้อ จึงได้มีความพยายามที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อให้คงทนต่อสภาพแดดจัดในบ้านเรา ด้วยการผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ รวมถึงเทคนิคการเคลือบอนุภาคด้วยสารเคมีป้องกันแสงยูวี เพื่อให้อนุภาคไวรัสอยู่ได้นานขึ้นในสภาพไร่ (ทิพย์วดี, 2549; อุทัย, 2537; Herbert,1999)

## วิธีดำเนินการ

**อุปกรณ์**

- เครื่องบดละเอียดความเร็วสูง DMF 2B ความเร็วรอบ 28,000 รอบต่อนาที
- สารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ ได้แก่ Titanium dioxide, congo red, กากน้ำตาล( molasses), ถ่านไม้ผง (carbon charcoal) และ หางนมผง (Skim milk)
- แป้งชนิดต่างได้แก่ แป้งบริสุทธิ์จากธัญพืช, น้ำมันพืชบริสุทธิ์ (refined vegetable oil), และแป้งมันสำปะหลังดัดแปร (modified tapioca starch)
- เครื่องวัดพลังงานแสง และเครื่องวัดแสงยูวี ชนิด บี (LT Lutron UV-340 )
- กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) และแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope)
- อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ หลอดยูวี ชนิดบี Phillip 26 W, อาหารเทียมเลี้ยงแมลง, ภาชนะเลี้ยงแมลง และถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์

**วิธีการ**

1. ทดสอบการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยวิธี Starch-encapsulation โดยดัดแปลงจากวิธีของ Dunkle และ Shasha (1988) ด้วยการนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม มาผสมกับน้ำบริสุทธิ์ และน้ำมันพืชบริสุทธิ์ (refined vegetable oil) ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปผสมกับสารป้องกันรังสียูวีแต่ละชนิดที่ได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้วได้แก่ Titanium dioxide, Congo red, Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk กับ modified tapioca starch ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้แป้งคืนตัว (retrogradation) แล้วจึงนำส่วนผสมทุกสูตรทั้งหมดออกมาวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปผสมกับแป้งบริสุทธิ์ที่ผลิตจากธัญพืช โดยปรับอัตราส่วนผสมทั้งหมดให้เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ $1x10^9$ PIB/ml นำไปบดให้ละเอียดอย่างช้าๆ แล้วเก็บตัวอย่างในตู้เย็นระหว่างการนำไปถ่ายภาพเพื่อดูโครงสร้างของไวรัสใต้กล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องกราดและแบบส่องผ่าน

2. การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการ

2.1 เตรียมอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนในภาชนะมีฝาปิดขนาดปริมาตร 2 ออนซ์ แล้วเคลือบผิวหน้าอาหารเทียมด้วยชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส หนอนกระทู้หอมที่เตรียมเสร็จแล้วในข้อ 1 ถ้วยละ 30 ไมโครลิตร กรรมวิธีละ

30 ถ้วย จำนวน 2 ชุด โดยใช้อัตราความเข้มข้นเช่นเดียวกับอัตราที่แนะนำ ส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้น้ำกลั่นเคลือบผิวหน้าอาหารเทียม

2.2 นำถ้วยอาหารเทียมชุดแรกทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วไปเข้าตู้ทึบที่ติดหลอดยูวี ชนิดบี ที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 250-300 นาโนเมตร แหล่งกำเนิดแสงใช้หลอดยูวีชนิดบี ที่มีกำลังส่องสว่าง (output) 26 วัตต์ต่อ 100 ชั่วโมง จำนวน 2 หลอด ติดตั้งหลอดให้มีระยะครอบคลุมตัวอย่างเท่ากันทั่วพื้นที่สำหรับวางตัวอย่าง และวัดระดับแสงด้วยเครื่องวัดแสงยูวี LT Lutron UV-340 ให้ได้พลังงานแสงตกลงพื้นที่เท่ากับ 1 $\mu W/cm^2$ ระยะห่างของตัวอย่างถึงแหล่งกำเนิดแสงประมาณ 20 เซนติเมตร ให้ถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดผ่านรังสียูวีเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนอาหารชุดที่ 2 ไม่ต้องผ่านแสงยูวี แล้วนำอาหารทั้ง 2 ชุดเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 6 ± 2$^{o}$C เพื่อรอทดสอบ Bioassay กับหนอนกระทู้หอม ด้วยวิธี feeding method ต่อไป

2.3 นำถ้วยอาหารเทียมที่ผ่านรังสียูวีและไม่ผ่านรังสียูวี ตามเวลาที่กำหนดไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัย 3 ถ้วยละ 1 ตัว กรรมวิธีละ 30 ถ้วย ตรวจนับการตายของหนอนที่ 3, 5, 7และ 10 วัน ตามลำดับ

**การบันทึกข้อมูล**

บันทึกจำนวนการตายของหนอนจากการทดลอง แล้วนำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

**เวลาและสถานที่**

**ระยะเวลา :** ตุลาคม 2557-กันยายน 2558

**สถานที่ :** ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ทำให้เห็นลักษณะพื้นผิวของผลึกโปรตีนได้ละเอียดชัดเจน พบว่ามีลักษณะพื้นผิวเป็นร่องขรุขระเล็กๆ ซึ่งเป็นร่องที่เกิดจากการฝังตัวของ virions ในผลึกโปรตีน ผลึกโปรตีนเหล่านี้มีหลายรูปแบบ แต่ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปทรงกลม และมีขนาดที่แตกต่างกัน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.7-2.8 ไมครอน (Fig.1) เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าไวรัสชนิดนี้เป็นชนิด multiple embedded เนื่องจากในผลึกโปรตีนมี virion ที่ประกอบด้วยอนุภาคไวรัสตั้งแต่ 1 หรือมากกว่า 1 อนุภาคในผนัง 2 ชั้นที่ล้อมรอบ ซึ่ง virion ก็คือ อนุภาคไวรัส (nucleocapsid) ที่มีผนังล้อมรอบแล้ว และขนาดของวิริออนก็จะขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคไวรัส (Fig.2)

เมื่อทำการเคลือบอนภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ด้วยวิธี Starch-encapsulation ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Dunkle และ Shasha (1988) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดัดแปร (modified tapioca strach) ที่มีคุณลักษณะเป็น pregelatinization ด้วยการให้ความร้อนกับแป้งที่แขวนลอยในน้ำ จากนั้นทำให้แห้งด้วยความร้อน แป้งพรีเจลาติไนซ์จะมีความหนืดและ adhesiveness ต่ำกว่าแป้งสุกที่เตรียมใหม่ๆ ช่วยให้อนุภาคถูกเกาะติดกับสารชนิดอื่นได้ดีขึ้น เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัสกับสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ ได้แก่ Titanium dioxide, Congo red, Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk ผลการศึกษาพบว่า ปรากฏฟิล์มบางๆ ล้อมรอบอนุภาคไวรัสจากสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆทุกชนิดอย่างชัดเจน (Fig.3-7) เมื่อเปรียบเทียบภาพของอนุภาคไวรัส

ก่อนเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวี (Fig.2) เมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนแบบส่องผ่าน แสดงให้เห็นว่าการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี ด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ สามารถใช้เทคนิค starch-encapsulation ได้ดี

เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดไปทดสอบความสามารถในการป้องกันรังสียูวี ด้วยการละลายน้ำ แล้วเคลือบเป็นแผ่นฟิล์มบางๆบน plate ก่อนนำไปผ่านแสงยูวี ชนิดบี ตามระยะเวลาที่กำหนด อนุภาคไวรัสที่ผ่านการเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวีเหล่านี้ เมื่อนำไปทดสอบความทนทานต่อแสงยูวีกับหนอนกระทู้หอมวัย 3 พบว่า ทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทุ้หอมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ไวรัสสด (Cruded virus) และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้น้ำกลั่น โดยประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมจะลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับแสงยูวี กล่าวคือ ที่ระยะเวลา 6 ชม. อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Congo red, molassee, Skim milk และ Carbon charcoal แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 68.2, 62.0, 54.6, 52.0, 50.4, 32.6 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อผ่านแสงยูวีเป็นเวลา 12 ชม. ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมเริ่มลดลง แต่ทุกกรรมวิธีก็ยังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 60.1, 57.2, 48.8, 40.2, 38.0, 20.4 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเมื่อผ่านแสงยูวีเป็นเวลา 24 ชม. ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้หอมลดลงอย่างชัดเจนและทุกกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับไวรัสสดและน้ำกลั่นเช่นเดิม โดยไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย molassee, Carbon charcoal และ Skim milk แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไวรัสสดและน้ำกลั่น โดยมีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ย 50.0, 48.6, 40.1, 30.4, 29.3, 12.0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อพิจารณาในภาพรวมที่ 24 ชม. จะพบว่า ไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide มีประสิทธิภาพสูงสุดเพียง 50.0 เปอร์เซนต์ รองลงมาเป็นกรรมวิธีที่เคลือบสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆที่เหลือซึ่ง มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 48.6-29.3 เปอร์เซนต์ แต่ยังคงมีประสิทธิภาพสูงกว่า ไวรัสสดที่มีประสิทธิภาพเพียง 12.0 เปอร์เซนต์ (Table 1)

**Table 1** Mean percentage mortality of Starch-encapsulated *Spodotera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) formulated with UV protectants and exposed to simulated sunlight UV for different period of time.

| Treatment | % mortality of larvae after UV exposure[1] | | |
|---|---|---|---|
| | 6 hr. | 12 hr. | 24 hr. |
| 1. Titanium dioxide | 68.2± 3.3 a[2]A[3] | 60.1± 2.6 aAB | 50.0±4.3 aB |
| 2. Congo red | 62.0± 2.1 aA | 57.2± 1.3 aA | 48.6± 3.2 aB |
| 3. Molase | 54.6± 3.8 abA | 48.8± 1.4 b AB | 40.1± 1.6 bB |
| 4. carbon charcoal | 50.4± 2.9bA | 40.2± 1.5 bcB | 30.4± 0.8 cC |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 5. Skim milk | 52.0± 1.3 abA | 38.0± 0.7 cB | 29.3± 1.5 cC |
| 6. Crude virus | 32.6± 4.2 cA | 20.4± 0.8 dB | 12.0± 1.2 dC |
| 7. Distilled water | 0 d | 0 e | 0 d |
| C.V. (%) | 13.2 | 18.6 | 10.4 |

[1] Percentage mortaliy of larvae adjusted by Abbott's formula

[2,3] Means fellowed by the same small letter (within the column) and capital letter (within the rows) do not differ significantly at 95 % by DMRT

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส (Original activity remaining percent ;% OAR ) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่เคลือบด้วยสารป้องกันแสงยูวี ชนิดต่างๆ และได้รับแสงยูวี ณ เวลาที่ศึกษา กับค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่เคลือบด้วยสารป้องกันแสงยูวี แต่ไม่ได้รับแสงยูวี ผลการทดลองพบว่า ที่เวลา 24 ชม. อนุภาคไวรัสที่เคลือบด้วย Titanium dioxide และ Congo red มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส สูงที่สุดถึง 54.1 และ 53.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนกรรมวิธีที่เหลือได้แก่ Molasses, Carbon charcoal และ Skim milk มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส เท่ากับ 42.4, 33.7 และ 31.4 ตามลำดับ โดยเชื้อไวรัสสด มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเชื้อไวรัส เหลือเพียง 13.3 เปอร์เซ็นต์ (Table 2 )

**Table 2** Mean percentage mortality and percentage original activity remaining of Starch-encapsulated *Spodotera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) formulated with or without UV protectants and exposed to sunlight 24 hr.

| UV protectant[1] | UV treatment[2] | % mortality of larvae[3] | | % OAR[4] |
|---|---|---|---|---|
| | | Means | ± SE | |
| 1.Titanium dioxide | treated<br>untreated | 50.0<br>92.4 | 4.3<br>2.4 | 54.1 |
| 2.Congo red | treated<br>untreated | 48.6<br>91.2 | 3.2<br>1.2 | 53.3 |
| 3. Molase | Treated<br>untreated | 40.1<br>94.5 | 1.6<br>2.5 | 42.4 |
| 4.carbon charcoal | treated<br>untreated | 30.4<br>90.3 | 0.8<br>3.4 | 33.7 |
| 5.Skim milk | treated<br>untreated | 29.3<br>93.2 | 1.5<br>2.0 | 31.4 |
| 6.Cruded virus | treated<br>untreated | 12.0<br>90.0 | 1.2<br>2.6c | 13.3 |
| 7.Distilled water | untreated | 0 | 0 | 0 |

[1] Includes starch-encapsulated SeNPV and UV protectant.

[2] Treat sample were exposed to simulated sunlight UV and untreat sample were not exposed to simulated sunlight UV.

[3] Mortality of Spodoptera exigua larvae after 10 days at 25± 2 °C

[4] Percentage of the original activity remaining based on ratio between treated and untreated mortality after exposure for 24 hr to simulated sunlight UV.

จากการศึกษาของสมชัยและคณะ (2556) ได้รายงานถึงประสิทธิภาพของสารป้องกันรังสียูวีชนิดเดียวกับการทดลองนี้ไปผสมกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี โดยไม่ผ่านการเคลือบอนุภาคไวรัส เมื่อผ่านแสงยูวี ชนิดบี พบว่า

ประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสจะยังคงมีประสิทธิภาพได้เพียง 3 ชม. โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนฉลี่ยระหว่าง 85.0-89.2 เปอร์เซ็นต์ แต่หลังจากนั้นเชื้อไวรัสจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ในทุกกรรรมวิธี แต่การศึกษานี้ได้เพิ่มระยะเวลาของการรับแสงยูวีให้นานขึ้นถึง 24 ชม. แม้ว่าเชื้อจะผ่านแสงยูวีนานถึง 6 ชม. เชื้อไวรัสที่ผ่านการเคลือบด้วยสารป้องกันรังสียูวีก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยสารป้องกันรังสียูวี ด้วยเทคนิค Starch-encapsulatin สามารถยืดระยะเวลาให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้นานขึ้นกว่าการผสมเชื้อกับสารป้องกันรังสียูวีแบบธรรมดา สอดคล้องกับการศึกษาของ Ignoffo และ Batzer (1971) ที่รายงานถึงการเคลือบอนุภาคไวรัสด้วยสารป้องกันรังสียูวีโดยเทคนิค Starch-encapsulation จะช่วยให้เชื้อมีชีวิตรอดได้นานขึ้นในสภาพธรรมชาติที่มีแสงแดดเป็นตัวทำลายเชื้อไวรัส ซึ่งจะช่วยให้เชื้อไวรัสสามารถกำจัดหนอนได้นานขึ้นกว่าเดิม แต่เนื่องจากงานวิจัยนี้ยังอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการเป็นส่วนใหญ่ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องทดสอบในสภาพไร่ที่มีปัจจัยแวดล้อมจำนวนมากเพื่อให้สามารถยืนยันผลที่ชัดเจนต่อไป

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาภาพถ่ายอิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม ทำให้เห็นลักษณะพื้นผิวของผลึกไวรัสที่ประกอบด้วยโปรตีนได้ละเอียดชัดเจน พบว่ามีลักษณะพื้นผิวเป็นร่องขรุขระเล็กๆ ซึ่งเป็นร่องที่เกิดจากการฝังตัวของ virions ในผลึกโปรตีน ซึ่งผลึกโปรตีนเหล่านี้มีหลายรูปแบบแต่ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปทรงกลม และมีขนาดที่แตกต่างกันไม่แน่นอน มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 0.7-2.8 ไมครอน ไวรัสชนิดนี้เป็นชนิด multiple embedded มี virion ซึ่งหมายถึง อนุภาคไวรัส (nucleocapsid) ที่มีผนังล้อมรอบ ในแต่ละ virion อาจพบอนุภาคไวรัสได้ตั้งแต่ 1 ถึง 6 อนุภาค เมื่อทำการเคลือบอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมด้วยสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆ โดยเทคนิค Starch-encapsulation พบว่าเกิดฟิล์มบางๆ ล้อมรอบอนุภาคไวรัสในทุกกรรมวิธีอย่างชัดเจนเมื่อมองจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และผลจากการนำไปทดสอบด้วยการผ่านรังสียูวี ชนิดบี ที่เวลาต่างๆ พบว่าสาร Titanium dioxide และ Congo red มีความสามารถในการป้องกันแสงยูวีให้กับอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมได้ดีที่สุด ช่วยให้เชื้อมีชีวิตอยู่รอดได้ไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวี ชนิดบีนานถึง 24 ชม.

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ได้ข้อมูลเทคนิคการผลิตสูตรสำเร็จรูปเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ด้วยวิธี (Encapsulation) และชนิดของสารเคมีที่ใช้เพิ่มประสิทธิภาพ ทนทานรังสียูวี สามารถนำไปผลิตขยายในเชิงพาณิชย์ต่อไป
2. ผลิตภัณฑ์ที่ได้ สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในพื้นที่ปลูกพืชได้หลายชนิด
3. เทคนิคการผลิตเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี นี้จะเป็นแหล่งที่นักเรียน นิสิต นักศึกษา ได้เข้ามาเรียนรู้ถึงบทบาทการนำจุลินทรีย ที่มีประโยชน์ไปใช้ควบคุมศัตรูพืช เรียนรู้และเข้าใจวิธีการผลิตและนำไปใช้ราะห์
4. ผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สามารถช่วยลดปัญหาพิษตกค้างบนพืชผักและผลไม้ได้เป็นอย่างดี จะช่วยเพิ่มคุณภาพและมูลค่าผักและผลไม้ที่ผลิตเพื่อบริโภคในประเทศ รวมทั้งเพื่อบริโภคในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ

5. สามารถผลิตสูตรสำเร็จรูปเชื้อไวรัส เอ็นพีวี จากโรงงานต้นแบบไปสนับสนุนงานทดสอบสาธิตและเผยแพร่ของกรมฯ เช่น โครงการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานบนพืชเศรษฐกิจ และสนับสนุนสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร เขต 1 – 8 ทั่วประเทศในการสาธิตและเผยแพร่วิธีการผลิตผักอนามัยปลอดภัยจากสารพิษ

**คำขอบคุณ**

ขอบคุณคณะทำงานทุกท่านในกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพที่ได้ให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด และขอขอบเจ้าหน้าที่กลุ่มงานกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ช่วยเหลือถ่ายภาพอนุภาคไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอมจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีมา ณ โอกาสนี้

**เอกสารอ้างอิง**

กรมวิชาการเกษตร. 2542. นโยบายการอารักขาพืชของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 395 น.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ และ อิศเรส เทียนทัด. 2556. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสเอ็นพีวี สูตรต่างๆที่ผลิตด้วยวิธี Encapsulation. .*ใน* รายงานประจำปี 2556 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร.

อุทัย เกตุนุติ. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอมด้วยเชื้อไวรัส. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 16 หน้า.

Dunkle, R. L.,and B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis* : a potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17: 120-126.

Herbert B. Scher. 1999. Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides. Marcel Dekker, Inc. new York. 329 pp.

Ignoffo,C. M. and O. P. Batzer. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. *J. Econ. Etomol*. 64: 850-853.

Matthews, G.A. 1984. Pest management. Longman Inc. New York. 231 pp.

**ภาคผนวก**

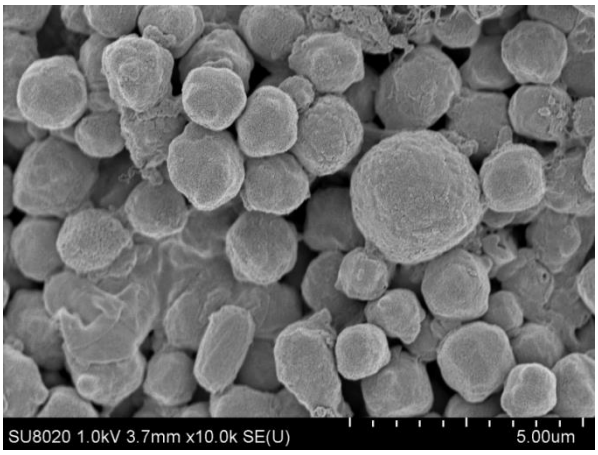


**Fig 1** Scanning electron microscope of occlusion bodies of SeNPV

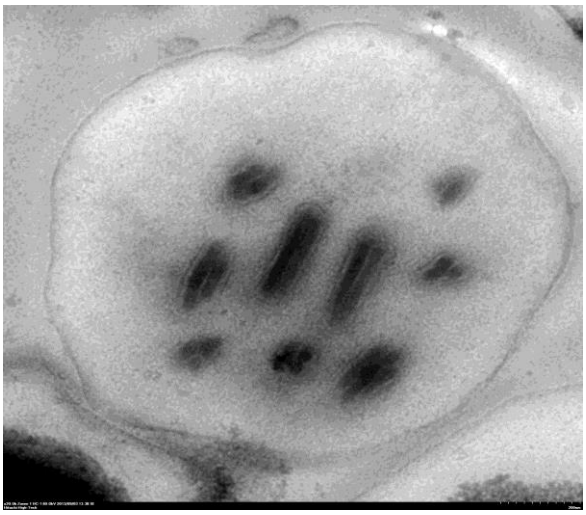

**Fig 2** Transmission eletron micrograph of occlusion bodies of SeNPV

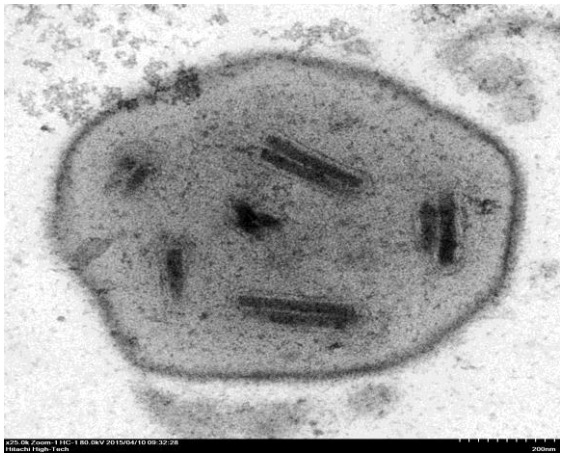

**Fig 3** Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Titanium dioxide

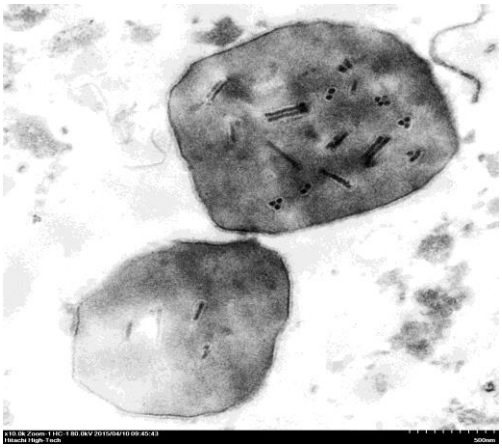

**Fig 4** Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Congo red

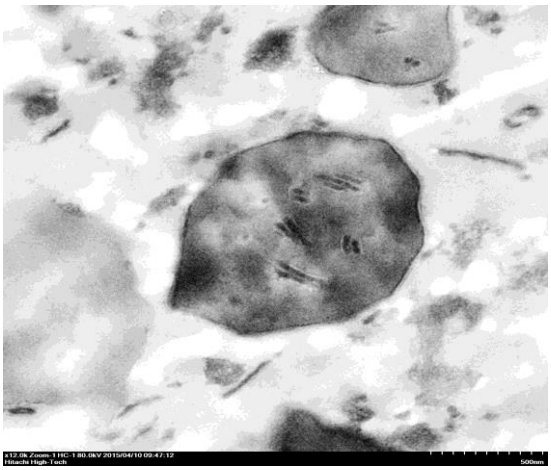

**Fig 5** Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Molasses

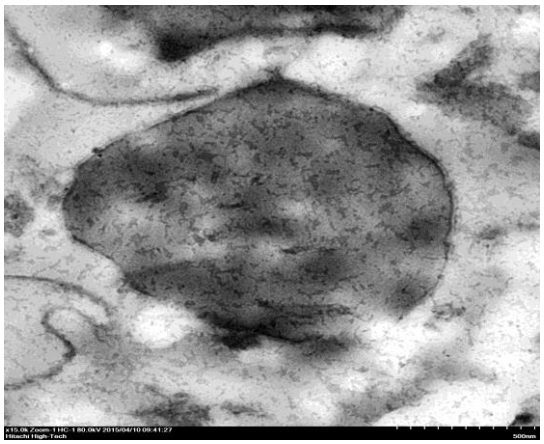

**Fig 6** Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion

bodies after starch encapsulation with Carbon charcoal

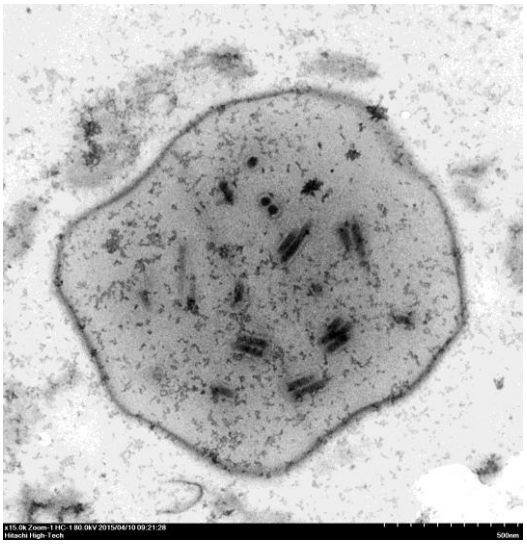


**Fig** 7 Eletron micrograph of the cross section of SeNPV occlusion bodies after starch encapsulation with Skim milk