

การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*
ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิค PCR
The Isolation of *Bacillus thuringiensis*
strains in Thailand by PCR Identification

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรศ เทียนทัต สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
รัตนา นชะพงค์
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถควบคุม
หนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักได้มากกว่า 80% จำนวน 11 และ 103 isolate ตามลำดับ นำมา
เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักวัย 2
พบว่า ไม่มี isolate ใดสามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 80% มี 33 isolate ที่ทำให้หนอน
กระทู้ผักตายตั้งแต่ 80% เช่น 320-3 14-14 281-4 27-1 7-1 26/45 1 -22 26/45 2 -3 27/45 2 -14
27/45 1 -11 ทดลองนำเชื้อทั้ง 7 isolate ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้อุณหภูมิ 94°C 3 นาที จำนวน
1 รอบ อุณหภูมิ 94°C 1 นาที อุณหภูมิ 55°C 32 นาที อุณหภูมิ 72°C 2 นาที จำนวน 30 รอบ และใช้
อุณหภูมิ 72°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis พบว่าเชื้อทั้ง 7
isolate มี cry โปรตีนเป็นชนิด Cry 1AC ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อได้ดี และจะนำเชื้อ
Bacillus thuringiensis ของกรมวิชาการเกษตรซึ่งมีจำนวนมาก มาทำการศึกษาค้นคว้าต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-03-01-54

คำนำ

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถสร้างสาร toxin ภายในเซลล์พร้อม ๆ กับการสร้าง spore สาร toxin นี้มีคุณสมบัติทำลายแมลงศัตรูพืชหลายชนิดได้ดี โสธร (2512) ได้รายงานว่เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำมาใช้ควบคุมหนอนใยผัก *Plutella xylostella* และหนอนคืบกะหล่ำปลี *Trichoplusia ni* ซึ่งติดต่อสารฆ่าแมลง ต่อมาได้มีการนำ Bt สายพันธุ์ใหม่ ๆ เช่น *aizawai* สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้กว้างขวางขึ้น (อัจฉรา, 2539) จากปัญหาของหนอนใยผักที่ติดต่อกันกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น พิษตกค้างของสารฆ่าแมลงบนพืชผักจึงมีสูงขึ้น ผู้บริโภคประสบอันตรายจากสารพิษบนพืชผักเพิ่มมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2527) ได้นำ Bt ที่ผลิตได้มาควบคุมหนอนใยผักบนกะหล่ำปลีอย่างได้ผล วินัย (2533) ได้นำ Bt ไปใช้ในการบริหารแมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยนำไปใช้ลดและทดแทนสารฆ่าแมลง และได้มีการแนะนำให้ใช้ Bt ควบคุมแมลงศัตรูผักมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2536) นำ Bt มาใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูส้มเขียวหวานได้ 3 ชนิด คือ หนอนแปะใบส้ม หนอนผีเสื้อกินใบส้ม และหนอนเจาะสมอฝ้าย การนำ Bt ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชช่วยลดปัญหาผลกระทบของสารฆ่าแมลงและพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงได้เป็นอย่างดี

การคัดเลือกสายพันธุ์ Bt จากแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย นอกจากจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นข้อมูลของความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว อาจได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และสามารถทำลายแมลงได้มากขึ้นอีกด้วย เนื่องจากเชื้อ Bt แต่ละสายพันธุ์สร้างโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืชต่างชนิดกัน ซึ่งการสร้างนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน Höfte และ Whiteley (1989) จึงได้จัดระบบอนุกรมวิธานของโปรตีนและยีนที่ควบคุมแต่ละชนิดว่า “cry” และเรียกโปรตีนที่สร้างขึ้นว่า “Cry” การในการจำแนกสายพันธุ์ของ Bt โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของผลึกโปรตีนของสารพิษ (toxin) จากกล้องจุลทรรศน์ electron microscope การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Bt ในปัจจุบันได้นำเทคนิคทางด้านอิมมูโน (H-antigen) เทคนิคทางชีวเคมี (Barjac และ Frachon, 1990) และเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดย Chak และคณะ (1994) รายงานการศึกษาการจำแนกเชื้อ Bt จากดินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific oligonucleotide primer สามารถค้นพบเชื้อ Bt จำนวน 225 ชนิด (isolates) ด้วยต้นทุนและแรงงานที่ต่ำ สามารถจำแนกเชื้อ Bt ที่มียีน cry แตกต่างกัน 6 ชนิด ประกอบด้วย cry 1 A(a), cry 1 A(b), cry 1 A(c), cry 1 C, cry 1 D และ cry 4 Bourque และคณะ (1993) รายงานการศึกษาการจำแนกเชื้อ Bt โดยใช้ multiplex polymerase chain reaction และ primers ที่นำมาใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อกลุ่มผลึกโปรตีนของเชื้อ Bt. สามารถจำแนกยีน cry ได้ 3 ชนิด คือ cry 1 A(a), cry 1 A(b) และ cry 1 A(c)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. กล้องจุลทรรศน์
4. เครื่องแยกเชื้อบริสุทธ์ (centrifuge)
5. เครื่องผสมอาหารเทียม
6. เครื่อง PCR
7. เครื่อง electrophoresis
8. สารเคมีผลิตอาหารเทียม
9. สารเคมีเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บีที
10. สารเคมีทำ PCR

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของกรมวิชาการเกษตร ที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอมตายตั้งแต่ 80% ขึ้นไป
2. นำเชื้อ Bt ที่ได้มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 72 ชั่วโมง
3. นำเชื้อแต่ละ isolate มาทดสอบโดยหยดเชื้อบนอาหารเทียมสำหรับหนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้หอมวัย 2 Isolate ละ 30 ตัว บันทึกข้อมูลหนอนที่ตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ข้อมูล

ขั้นตอนที่ 2

1. ใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ที่สามารถจำแนก cry ต่างๆ ได้แก่ cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1l, cry2 และ cry3
2. นำเชื้อ Bt ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 80% ขึ้นไป มาสกัดดีเอ็นเอ
3. ทำ PCR โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 μ l DNA, 12.5 μ l PCR mixture, primers จำนวน 2 สาย สายละ 1.25 μ l และ Dye 2.5 μ l
4. นำดีเอ็นเอ ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	ที่ 94°C	3 นาที
Denaturation	ที่ 94°C	1 นาที

Annealing	ที่ 55°C	2 นาที	35 รอบ
Extension	ที่ 72°C	2 นาที	
Final extension	ที่ 72°C	7 นาที	

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย gel วิเคราะห์ผล

5. นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel วิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการทดลอง

เวลา สถานที่ ตุลาคม 2553-กันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 คัดเลือกเชื้อ Bt ของกรมวิชาการเกษตร ได้เชื้อที่ทำให้หนอนตายตั้งแต่ 80% โดยทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 103 isolate และหนอนกระทู้หอมตาย 11 isolate เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ หนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม นำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 126 isolate มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อ สร้างผลึกโปรตีน ตรวจสอบผลึกของแต่ละ isolate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อทั้งหมดสร้างผลึก โปรตีน และทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้หอม วัย 2 จำนวน 30 ตัว ต่อ isolate เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและเชื้อ Bt ทางการค้า พบว่าเชื้อที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 0-25% 25.01-50% 50.01-75% และ 75.01-100% มีจำนวน 15 9 14 และ 65 isolate ตามลำดับ โดยมีเชื้อที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายตั้งแต่ 80% 33 isolate และจะนำเชื้อดังกล่าวไปจำแนกสายพันธุ์โดย เทคนิค PCR ต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อ isolate ต่างๆ

ชื่อ isolate	เปอร์เซ็นต์การตายของ หนอนกระทู้ผัก	สถานที่เก็บตัวอย่างเชื้อ
7-1	83.33	ต.ห้วยไร่ อ.คอนสวรรค์ จ.ชัยภูมิ
14-4	80	อ.เมือง จ.อุดรธานี
14-14	93.33	อ.เมือง จ.อุดรธานี
27-1	86.67	ต.โพนสา อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
281-4	89.66	ต.วังหมี่ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา

ตารางที่ 1 (ต่อ) แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อ isolate ต่างๆ

ชื่อ isolate	เปอร์เซ็นต์การตายของ หนอนกระทู้ผัก	สถานที่เก็บตัวอย่างเชื้อ
7-1	83.33	ต.ห้วยไร่ อ.คอนสวรรค์ จ.ชัยภูมิ
14-4	80	อ.เมือง จ.อุดรธานี
14-14	93.33	อ.เมือง จ.อุดรธานี
27-1	86.67	ต.โพนสา อ.ท่าบ่อ จ.หนองคาย
281-4	89.66	ต.วังหมี่ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา
320-3	96.66	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
320-20	86.66	อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี
⁴ 26/45 1 -22	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
³ 26/45 2 -3	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
³ 27/45 2 -14	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
³ 27/45 1 -11	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
³ 28/45 1 -6	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
⁴ 28/45 2 -2	100	อ.แม่สอด จ.ตาก
⁴ 29/45 2 -28	93.10	อ.แม่สอด จ.ตาก

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและหาความเข้มข้นของเชื้อปีที่ 65 ไอโซเลท เป็นเซลล์รูปแท่ง มีโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NA 48-72 ชั่วโมง จะสร้างสปอร์และผลึกโปรตีนเป็นรูปพีระมิดคู่(Bipyramid) ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ปะปนกัน

ขั้นตอนที่ 2 นำเชื้อ 7 isolate มาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปทำ PCR พบว่ากระบวนการ PCR ที่เหมาะสมคือใช้อุณหภูมิ 94°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94°C 1 นาที อุณหภูมิ 55°C 32 นาที อุณหภูมิ 72°C 2 นาที จำนวน 30 รอบ และใช้อุณหภูมิ 72°C 7 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis พบว่าเชื้อทั้ง 7 isolate มี cry โปรตีนเป็นชนิด Cry 1AC

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาพบว่า เชื้อ *Bt* ของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมได้มากกว่า 80% จำนวน 11 isolate เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่า ไม่มี isolate ใดสามารถทำให้หนอนตายมากกว่า 80% ส่วนหนอนกระทู้ฝักนำเชื้อ *Bt* จำนวน 103 isolate มาทดสอบกับหนอนกระทู้ฝักวัย 2 พบว่ามี 33 isolate ที่ทำให้หนอนตายตั้งแต่ 80% เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR จำนวน 7 isolate พบว่าเชื้อทั้ง 7 isolate มี *cry* โปรตีนเป็นชนิด *Cry 1AC* ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อได้ดี นอกจากนี้เชื้อ *Bt* ของกรมวิชาการเกษตรยังมีอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- โสธร ประเสริฐผล. 2512. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์. กสิกร 42(3) : 289-305.
- อัจฉรา ตันติโชค. 2539. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารทางวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 163-182.
- อัจฉรา ตันติโชค. 2527. การศึกษาความคงทนของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บนกะหล่ำปลีในสภาพไร่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2527. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 110-114.
- อัจฉรา ตันติโชค และอุทัย เกตุนุติ. 2537. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสูตรผสมละลายน้ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมบนองุ่น. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2537. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 22-29.
- Bourque, S.N, J.R. Valero, J.Mercier, M.C.Lavoie and R.C.Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:523-527.
- Chak,K.F., D.C. Chao, M.Y. Tseng, S.S. Kao, S.J.Tuan and T.Y.Feng. 1994. Determination and distribution of *cry* – type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 60:2415-2420.
- Hofte, H.and H.R. whiteley.1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbial. Rev. 53 : 242-25.