เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย ด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

Maintenance of Entomopathogenic Nematodes Species and Their Symbiotic Bacteria by Cryopreservation Technique

พัชรีวรรณ มณีสาคร สาทิพย์ มาลี วิไลวรรณ เวชยันต์
สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ อัมพร วิโนทัย
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* และ *Heterorhabditis indica* ได้แก่ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* ได้แล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว โดยโคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีน้ำเงินเข้มตรงกลาง และขอบโคโลนีไม่เรียบมีสีอ่อนลง ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า clear zone สำหรับโคโลนีของแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีเขียวเข้มตรงกลาง และขอบไม่เรียบมีสีอ่อนลง จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทดลองนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth (แยกขวด) ทำการตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี slide smear พบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น สามารถนำเก็บในสารละลายกลีเซอรีนตามระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้

สำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ยังคงอยู่ในขั้นตอนการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) สำหรับใช้ในงานทดสอบโดยนำผลผลิตที่ได้เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งคาดว่าจะเริ่มดำเนินการทดสอบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย หลังจากได้เก็บรักษาแบคทีเรียในตู้ควบคุมอุณหภูมิแล้ว

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-04-06-56

คำนำ

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน และมีความแข็งแรงเมื่อนำออกมาใช้ประโยชน์สามารถคงประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างสูงสุด ซึ่งรูปแบบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้อ และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำไปใช้**ประโยชน์**กำจัดแมลงศัตรูพืช มีรูปแบบที่แตกต่างกัน คือการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อนำไปเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงระยะเวลาการมีชีวิตรอด การคงสภาพ และความสามารถในการพัฒนาการเจริญเติบโตได้**หลังการเก็บรักษา** ส่วนการเก็บรักษาผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหลังจากผ่านการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือคุณภาพและประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช อายุการเก็บรักษาในวัสดุภัณฑ์ที่เหมาะสม ความสะดวกในการเก็บรักษาและการขนส่ง จะต้องง่ายและเหมาะสมเมื่อนำไปใช้ฉีดพ่นในสภาพไร่นา ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย และรวมถึงเป็นแหล่งรวบรวมและสถานที่เก็บรักษาชนิดพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังคงมีชีวิตชนิดต่างๆ ไว้

เนื่องด้วยนักวิจัยค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย โดยพบทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เป็นชนิดใหม่ๆ และเป็นชนิดเดียวกันกับที่ได้เคยมีการศึกษามาแล้ว ซึ่งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมดนี้ยังเก็บรักษาในรูปแบบที่ไม่เหมาะสมนัก คือสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาสั้นเพียง 1-2 เดือน จำเป็นต้องนำออกมาต่อเชื้อขยายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ให้ได้เป็นระยะเวลานาน 2-3 ปี โดยไม่จำเป็นต้องเสียเวลาในการต่อเชื้อ อีกทั้งยังไม่เป็นการลดประสิทธิภาพของต้นเชื้อเนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการต่อเชื้อหลายๆ ครั้ง

การเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตให้อยู่ได้อย่างมีชีวิตเป็นระยะเวลายาวนานคือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า –130°ซ (White and Wharton, 1984) และวิธีการ Cryopreservation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เพื่อการรักษาสภาพเนื้อเยื่อ และองค์ประกอบสำคัญของการมีชีวิต อีกทั้งอุณหภูมิที่คงที่ตลอดเวลาควบคุมการเก็บรักษามีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้การควบคุมอัตราการละลายขณะนำสิ่งมีชีวิตออกจากการควบคุมอุณหภูมิก็คงความสำคัญเช่นกัน (Triantaphyllou and McCabe, 1989) รายงานของ Popiel and Vasquez (1991) ศึกษาวิธีการ Cryopreservation สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายชนิด *Steinernema carpocapsae* และ *Heterorhabditis bacteriophora* ต่อมา Curran *et al* (1992) ทำการศึกษาเพิ่มเติมในกระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยชนิดนี้เช่นกัน

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้อ การเก็บรักษายังคงเก็บรักษาในรูปแบบเดียวกันกับการนำไปใช้ประโยชน์ คือเก็บในรูปของ suspension nematode ในชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ หรือเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ (Short-term) คือเก็บในขวดพลาสติกเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 6-10°ซ ซึ่งระยะเวลาในการเก็บรักษาประมาณ 6-9 เดือน สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* แต่สำหรับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* ระยะเวลาในการเก็บรักษาจะสั้นกว่าคือประมาณ 3-4 เดือน (Kaya and Stock, 1997) ในส่วนของแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้น การเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ จะเก็บรักษาบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA และเก็บที่อุณหภูมิ 12-25°ซ ซึ่งจำเป็นต้องทำการต่อเชื้อแบคทีเรียทุกๆ เดือนกรณีเก็บที่ 12°ซ หรือ 2 ครั้งต่อเดือนเมื่อเก็บที่ 25°ซ (Kaya and Stock, 1997) สำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นระยะเวลานาน จำเป็นต้องเก็บรักษาแบคทีเรียเมื่อแบคทีเรียอยู่ในระยะ Phase I โดยการคัดเลือกโคโลนีและนำลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นจึงนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica*
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA, YS broth, อาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง
4. สารเคมี glycerin, แอลกอฮอล์
5. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ จานแก้ว, แท่งแก้วสามเหลี่ยม, ออโตไปเปท, eppendopf, ขวดแก้ว
6. วัสดุอื่นๆ สำลี, แท่งเหล็กสำหรับเขี่ยเชื้อ

แผนการทดลอง ได้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* และ *Heterorhabditis indica* ได้แก่ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens*

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี

1. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 33%
2. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 50%
3. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 66%

- เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหนอนที่ตายมาตัดขา ใช้ loop แตะ haemolymph แล้ว streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว นำเก็บที่อุณหภูมิ 28°ซ จากนั้นคัดเลือก 1 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth ปริมาตร 150 มล. ในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกลีเซอรีนลงไปในขวดแบคทีเรียตามปริมาตรในแต่ละกรรมวิธี นำเก็บรักษาตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจและเก็บบันทึกข้อมูลผลการทดสอบ ทุกๆ 1 เดือน วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัย)

การบันทึกข้อมูล

- นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate

เวลาและสถานที่ดำเนินการ

ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2556

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ขั้นตอนที่ 2. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

ทดสอบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica* โดยวางแผนการทดลองแบบมี 2 ปัจจัย 4x4 factorial in CRD 3 ซ้ำ 16 กรรมวิธี

ปัจจัยที่ 1 อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ระดับต่างๆ 4 ระดับ คือ

1. 5,000 ตัว/หลอด
2. 10,000 ตัว/หลอด
3. 50,000 ตัว/หลอด
4. 100,000 ตัว/หลอด

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรีนสำหรับเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 4 ระดับ คือ

1. 10%
2. 14%
3. 18%
4. 22%

เลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective Juvenile) หลังออกจากซากแมลงอาศัย 1-3 วัน จากนั้นกรองไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อกำจัดเศษซากหนอนและสิ่งสกปรกออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วย0.1% ฟอร์มาลีน และสาร 0.1% ไฮยามีน ในครั้งสุดท้ายเพื่อลดการสะสมและการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบในแต่ละปัจจัย ในสารละลายกลีเซอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามปัจจัยที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ 72 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* ก่อนนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไปตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจผลการทดสอบโดยสุ่มตัวอย่างทุก 1 เดือน บันทึกข้อมูลผลการทดสอบ วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง)

บันทึกผลการทดลอง

- นับจำนวนและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
- ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในปี 2556 สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* และ *Heterorhabditis indica* ได้แก่ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* ได้แล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว โดยโคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีน้ำเงินเข้มตรงกลาง และขอบโคโลนีไม่เรียบมีสีอ่อนลง ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า clear zone สำหรับโคโลนีของแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีเขียวเข้มตรงกลาง และขอบไม่เรียบมีสีอ่อนลง จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทดลองนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth (แยกขวด) ทำการตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี slide smear พบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น สามารถนำเก็บในสารละลายกลีเซอรีนตามระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้ แต่เนื่องจากมีอุปสรรคต่างๆ ในงานทดลองทำให้ต้องเริ่มดำเนินการใหม่ซึ่งขณะนี้กำลังอยู่ในระหว่างการทดสอบวิธีการนำเก็บเชื้อแบคทีเรียอีกครั้ง

สำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ยังคงอยู่ในขั้นตอนการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) สำหรับใช้ในงานทดสอบโดยนำผลผลิตที่ได้เก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งคาดว่าจะเริ่มดำเนินการทดสอบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยหลังจากได้ผลการเก็บรักษาแบคทีเรียในตู้ควบคุมอุณหภูมิแล้ว

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการดำเนินงานในปี 2556 สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จาก *Heterorhabditis indica* ได้แล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว โดยตรวจไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นสามารถนำเก็บในอุณหภูมิต่ำเพื่อศึกษาในขั้นตอนลำดับต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Curran J. and J. Heng. 1992. Comparison of three methodes for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. *J. Nematol*. 24: 170-176.

Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology, pp. 281-324. *In*: *Manual of Techniques in Insect Pathology* L.A. Lacey, (ed). Biological Techniques Series, Academic Press, San Diego.

Popiel I. and E.M. Vasquez. 1991. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Nematol*. 23: 432-437.

Triantaphyllou A.C. and E. McCabe. 1989. Efficient preservation of root-knot and cyst nematode in liquid nitrogen. *J. Nematol*. 21: 423-426.

White W. and K.L. Wharton. 1984. Development of a cryogenic preservation system. *Am. Lab*. June: 65-76.