

การสำรวจและรวบรวมเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* และเชื้อไวรัส NPV
Survey, Collection and Identification of *Bacillus thuringiensis* and
Nuclear Polyhedrosis Virus

อิสเรศ เทียนทัต อัจฉรา ตันติโชติก สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน วัสดุทางการเกษตร และซากพืชจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ขอนแก่น นครราชสีมาและชัยภูมิ จำนวน 169 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 143 isolates นำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและทดสอบ insecticidal activity กับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักแล้วจำนวน 48 isolates มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อ Bt มีการสร้างเซลล์และสปอร์เป็นรูปแท่ง ซึ่งขนาดของเซลล์และสปอร์ของแต่ละ isolate ส่วนใหญ่จะมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนผลึกโปรตีน(parasporal inclusion body) ที่ Bt แต่ละ isolate สร้างขึ้นจะมีรูปร่างแบบ bipyramid เพียงรูปแบบเดียว และได้ทำการศึกษาขนาดของผลึกโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 เป็นเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116, 66.2, 45, และ 35 กิโลดาลตัน จากการศึกษาพบว่า ลักษณะของผลึกโปรตีนของ Bt isolate, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 130-138 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดน้ำหนักของโมเลกุลดังกล่าวจะเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีน Cry1 ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera

คำนำ

ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค ตลอดจนผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม จากการเข้าเป็นสมาชิกองค์การการค้าโลกประเทศไทยต้องปฏิบัติตามข้อตกลงที่ว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phyto-sanitary Measures (SPS) โดยใช้สุขอนามัยผู้บริโภคและปริมาณสารพิษตกค้างของพืชผักและผลไม้เป็นตัวกำหนดคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ประเทศไทยจึงได้รับผลกระทบโดยตรง เนื่องจากมีการใช้สารเคมีควบคุมศัตรูพืชมาก ปริมาณพิษตกค้างบนผลิตภัณฑ์ มักพบว่าสูงเกินค่าความปลอดภัยอยู่เสมอเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์ไม่ได้คุณภาพตามที่ต้องการ ทำให้ไม่สามารถส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศได้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ดำเนินการที่จะลดปัญหาดังกล่าวโดยการห้ามการจำหน่ายสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงและมีฤทธิ์ตกค้างนาน ให้มีการตรวจสอบและออกใบรับรองพืช 12 ชนิดที่พบว่ามีพิษตกค้างสูงก่อนที่จะส่งออกต่างประเทศ เพื่อลดปัญหาดังกล่าวการค้นคว้าวิจัยและพัฒนาเพื่อนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง จึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อให้เกษตรกรได้มีทางเลือกนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เชื้อ *Bacillus thuringiensis* เป็นจุลินทรีย์ที่พบในประเทศไทยมีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมายปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ แมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์และต่อสิ่งแวดล้อม ได้ผ่านการทดสอบจาก US Environmental Protection Agency ประเทศสหรัฐอเมริกาและเป็นที่ยอมรับและนำไปใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว การนำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะช่วยแก้ปัญหาลดผลกระทบของสารเคมีกำจัดแมลงต่อประชาชน ทำให้เกษตรกรสามารถนำไปใช้เพื่อผลิตพืชที่ได้คุณภาพผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่เพิ่มขึ้น

วิธีดำเนินการ

ขั้นตอนที่ 1 ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศ สำรวจและรวบรวมเชื้อไวรัส SeNPV, HaNPV และ SINPV ในแหล่งที่มีการระบาดของหนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้ผัก

ขั้นตอนที่ 2 ทำการแยกเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดินที่เก็บได้และนำตัวอย่างไวรัส SeNPV, HaNPV และไวรัส SINPV มาทำให้บริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมไว้

ขั้นตอนที่ 3 ตรวจจำแนกชนิดของ *Bacillus thuringiensis* โดยศึกษาโครงสร้างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติของของ crystal toxin ด้วยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ เทคนิค PCR และทำการศึกษารูปร่างลักษณะของผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (polyhedral inclusion bodies) และอนุภาคไวรัส

(nucleocapsid) ด้วยกล้อง light microscope และ scanning electron microscope ศึกษาโครงสร้างของ polypeptide ของผลึกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกข้อมูลแหล่งที่เก็บตัวอย่างแมลง ชนิดพืชที่แมลงทำลาย ท้องที่ตำบล อำเภอ จังหวัด
- บันทึกรูปร่างและลักษณะ และขนาดของไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้ายและหนอนกระทู้ผักที่พบจากตัวอย่างหนอนที่เก็บได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลของประสิทธิภาพของไวรัส NPV ที่แยกเชื้อบริสุทธิ์กับหนอนทดลองวิเคราะห์ประสิทธิภาพในรูปของ Median lethal dose
- บันทึกรูปแบบและน้ำหนักโมเลกุลของ crystal toxin ของ Bt แต่ละ isolate พร้อมบันทึกภาพของแถบโมเลกุลและโปรตีนที่แยกได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน วัสดุทางการเกษตร และซากพืชจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี เพชรบุรี ขอนแก่น นครราชสีมาและชัยภูมิ จำนวน 169 ตัวอย่าง ได้เชื้อ Bt isolate จำนวน 143 isolates นำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและทดสอบ insecticidal activity กับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักแล้วจำนวน 48 isolates มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า เชื้อ Bt มีการสร้างเซลล์และสปอร์เป็นรูปร่างซึ่งขนาดของเซลล์และสปอร์ของแต่ละ isolate ส่วนใหญ่จะมีขนาดใกล้เคียงกัน ส่วนผลึกโปรตีน(parasporal inclusion body) ที่ Bt แต่ละ isolate สร้างขึ้นจะมีรูปร่างแบบ bipyramid เพียงรูปแบบเดียว และได้ทำการศึกษารูปร่างของผลึกโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 เป็นชื่อมาตรฐานในการเปรียบเทียบ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116, 66.2, 45, และ 35 กิโลดาลตัน จากการศึกษาพบว่า ลักษณะของผลึกโปรตีนของ Bt isolate, *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* และ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 ประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 130-138 กิโลดาลตัน ซึ่งขนาดน้ำหนักของโมเลกุลดังกล่าวจะเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มโปรตีน Cry1 ซึ่งเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera