การจำแนกสายพันธุ์ Nucleopolyhedrovirus ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิค PCR

The Isolation of Nucleopolyhedrovirus Strains in Thailand by PCR Identification

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี อิศเรส เทียนทัด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจและเก็บตัวอย่างหนอนที่มีอาการผิดปกติ เป็นโรคจากแปลงปลูกผัก แปลงไม้ดอกของเกษตรกรในภาคเหนือ และภาคตะวันตก พบหนอนตายจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบหนอนที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส และทดสอบการเกิดโรคกับหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าทำให้หนอนตายน้อยกว่า 50% จึงไม่สามารถนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ได้

การเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม และทดสอบเชื้อไวรัสกับหนอนกับหนอนทั้ง 3 ชนิด พบว่าไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 93.33% ไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้หอม ความเข้มข้น $1x10^7$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 93.33% และไวรัสเอ็นพีวีหนอนเจาะสมอฝ้าย ความเข้มข้น $1x10^6$ ผลึก ทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย 96.67% เมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส และหนอนกระทู้ผักใช้เวลามากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ ในการทำให้หนอนตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-03-02-56

คำนำ

ในปัจจุบันทุกฝ่ายมีความตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีผลต่อสุขภาพของประชากร สภาพแวดล้อม และผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อนำจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง ไวรัสชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่พบในประเทศไทย เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย ปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติ แมลงที่มีประโยชน์ มนุษย์ สัตว์ และสิ่งแวดล้อม โดยได้ผ่านการทดสอบจาก US Environmental Protection Agency ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นที่ยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าไวรัส NPV เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดอื่นๆ ที่เหมาะสมในระบบการจัดการศัตรูพืช (Integrated pest management) กรมวิชาการเกษตรมีนโยบายที่จะลดความเสี่ยงของประชาชน และลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่สูงขึ้น จากการที่ไวรัส SeNPV HaNPV และ SlNPV สามารถนำไปใช้ทดแทนสารฆ่าแมลงได้ดีในหลายพืช ทำให้ความต้องการใช้เชื้อไวรัส NPV ของหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องตลอดจนเกษตรกรเพิ่มมากขึ้น ขณะเดียวกันภาคธุรกิจเอกชนก็สนใจที่จะนำเทคโนโลยีดังกล่าวไปผลิตและขยายผลต่อไป

ไวรัส เอ็นพีวี อยู่ในวงศ์ Baculoviridae ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคเฉพาะกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังใน Phylum Arthropoda เท่านั้น (Murphy et al., 1995; Frances et al., 1998) ลักษณะโดยทั่วไปของไวรัสเอ็นพีวี คือ มียีโนม (genome) เป็น ดีเอ็นเอ เส้นคู่ double stranded DNA ในลักษณะวงกลมปิดซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนที่เรียกว่า แคพสิดโปรตีน (capsid protein) ทั้ง ดีเอ็นเอ และแคพสิดโปรตีนประกอบกันเป็น นิวคลีโอแคพสิด (nucleocapsid) ซึ่งมีรูปร่างเป็นท่อนตรง (rod–shaped) มีผนังห่อหุ้ม (envelope) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิด triple layered lipoprotein หุ้มอยู่รวมเป็นอนุภาคไวรัสที่สมบูรณ์ เรียกว่าวิริออน (virion) โดยทั่วไปวิริออนมีขนาดกว้างประมาณ 30–50 นาโนเมตร และยาวประมาณ 250–400 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50-100x10^{6} กิโลดาลตัน (Burgess, 1977; Attathom, 1988) วิริออนฝังตัวอยู่ในผลึกโปรตีนมีรูปหลายเหลี่ยม ซึ่งเรียกผลึกเหล่านี้ว่า polyhedra หรือ polyhedrin inclusion bodies (PIBs) หรือ Occlusion bodies (OBs)

Caballero et al. (1992) ได้รายงานถึงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไวรัส *Spodoptera exigua* NPV จำนวน 4 isolations จากประเทศ เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา สเปน และประเทศไทย พบว่า *Spodoptera exigua* NPV จากประเทศไทยมีประสิทธิภาพสูงกว่าสายพันธุ์อื่น จากการศึกษาโครงสร้างของ DNA ของทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าลักษณะโครงสร้างของ genotype ใกล้เคียงกันมาก การคัดเลือกสายพันธุ์ของไวรัส NPV จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย นอกจากจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นข้อมูลของความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว อาจได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นและสามารถทำลายแมลงได้มากชนิดขึ้นอีกด้วย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างหนอนผีเสื้อศัตรูพืช
2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง ได้แก่ ขวดดอง ถุงพลาสติก ปากคีบ ตะกร้า กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 19x28x11 เซนติเมตร
3. อุปกรณ์ทำสไลด์ ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ น้ำกลั่น
4. อุปกรณ์จำแนกสัณฐานวิทยาของผลึกไวรัส ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดบันทึกภาพ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กล้องบันทึกภาพ
5. อุปกรณ์เพาะเลี้ยงหนอนศัตรูพืช ได้แก่ กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 22x15x5 เซนติเมตร โถแก้ว ขัน ผ้าขาวบาง ยางรัด ปากคีบ น้ำผึ้ง น้ำกลั่น พู่กัน
6. อุปกรณ์ทำอาหารเทียม ได้แก่ เครื่องปั่นผสมอาหาร กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 22x15x5 เซนติเมตร วุ้น ถั่วเขียว วิตามิน สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างเชื้อไวรัสจากหนอนหนอนผีเสื้อศัตรูพืช หรือแมลงที่มีอาการติดเชื้อไวรัสจากแหล่งปลูกผัก แปลงไม้ดอกไม้ประดับ ในภาคเหนือได้แก่ จังหวัดตาก กำแพงเพชร ภาคอีสานได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น เลย ภาคกลางได้แก่ จังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เพชรบุรี ลพบุรี สระบุรี ภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี นครศรีธรรมราช สงขลา

2. เก็บตัวอย่างหนอนผีเสื้อศัตรูพืชใส่ในขวดดองแมลงที่มีน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิดพืชอาศัย อาการของหนอนที่เป็นโรค

<u>การจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผลึกไวรัส</u>

1. นำขวดตัวอย่างเชื้อที่เก็บได้มาทำสไลด์ โดยเขย่าให้ตัวอย่างหนอนแตกออกด้วยเครื่องเขย่า

2. เตรียมสไลด์โดยใช้น้ำกลั่นเจือจางตัวอย่างเชื้อปริมาณ 1 loop ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

3. นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า ตรวจดูผลึกเชื้อไวรัสซึ่งจะมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม บันทึกข้อมูล

4. เตรียมตัวอย่างผลึกไวรัสเพื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพ

<u>การเพาะเลี้ยงแมลงอาศัยของเชื้อไวรัส</u>

1. เก็บหนอนศัตรูพืชจากแปลงปลูกพืชมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมสูตรของกรมวิชาการเกษตร จนครบวงจรชีวิต

2. เพาะเลี้ยงหนอนศัตรูพืช ให้อยู่ในวัย 3 (อายุประมาณ 5 วัน) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแมลงของเชื้อไวรัส

<u>การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง</u>

1. นำเชื้อไวรัสหนอนกระทู้ผักใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยน้ำตาลซูโครส ที่ 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยตะแกรงขนาด 0.5 ไมครอน เพื่อทำให้เชื้อบริสุทธิ์

2. เตรียมตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้น $1x10^9$ ด้วยน้ำกลั่น

3. หยดเชื้อไวรัส 30 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเทียมขนาด 4 กรัม ในถ้วยขนาด 2 ออนซ์ จำนวน 30 ถ้วย

4. ใส่หนอนที่อดอาหาร 2 ชั่วโมง 1 ตัวต่อถ้วย

4. บันทึกการข้อมูลอาการหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน

5. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนของเชื้อไวรัส และทดสอบเชื้อไวรัสเอ็นพีวีหนอนเจาะสมอฝ้าย เชื้อไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้หอม และเชื้อที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ตามขั้นตอน1-5

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลสถานที่เก็บตัวอย่างท้องที่ ตำบล อำเภอ จังหวัด อาการของหนอนที่เป็นโรค ชนิดพืชอาศัย

2. บันทึกข้อมูลสัณฐานวิทยาผลึกไวรัสจากหนอนแต่ละตัวอย่าง ที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. บันทึกข้อมูลอาการหนอนที่ได้รับเชื้อไวรัส ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 10 วัน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2555 – กันยายน 2556

สถานที่ : แปลงเกษตรกร และห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

สำรวจและเก็บตัวอย่างหนอนที่มีอาการผิดปกติ เป็นโรคจากแปลงปลูกผัก แปลงไม้ดอก เช่น ดาวเรือง กุหลาบ ผักตระกูลกะหล่ำ เผือก ของเกษตรกรในภาคเหนือได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ ตาก และภาคตะวันตก ได้แก่ จังหวัดราชบุรี นครปฐม กาญจนบุรี พบหนอนตายจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบหนอนที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส และทดสอบการเกิดโรคกับหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อทุกตัวอย่างทำให้หนอนตายน้อยกว่า 50%

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ 5 กรรมวิธี เตรียมเชื้อไวรัสของกรมวิชาการเกษตรของหนอนทั้งสามชนิดที่อัตรา 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} และ 10^{-9} ทดสอบกับหนอนทั้ง 3 ชนิด โดยใช้หนอนวัย 3 กินอาหารเทียมที่เคลือบด้วยเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส SlNPV SeNPV และ HaNPV ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ชนิดหนอน	ความเข้มข้นของเชื้อไวรัส (ผลึก)				
	$1x10^6$	$1x10^7$	$1x10^8$	$1x10^9$	control
หนอนกระทู้ผัก	20	50	76.67	93.33	0
หนอนกระทู้หอม	76.67	93.33	90	100	0
หนอนเจาะสมอฝ้าย	96.67	100	96.67	96.67	0

หมายเหตุ หนอนกระทู้ผักทดสอบ 10 วัน หนอนกระทู้หอมและหนอนเจาะสมอฝ้ายทดสอบ 7 วัน

จากตารางพบว่าไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 93.33% ไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้หอม ความเข้มข้น $1x10^7$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 93.33% และไวรัสเอ็นพีวีหนอนเจาะสมอฝ้าย ความเข้มข้น $1x10^6$ ผลึก ทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย 96.67% เมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส และหนอนกระทู้ผักใช้เวลาในการทำให้หนอนตายมากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ ดังนั้นควรใช้ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในการทำให้หนอนตาย ที่ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึก หนอนกระทู้หอมใช้ความเข้มข้น $1x10^7$ ผลึก และหนอนเจาะสมอฝ้ายใช้ความเข้มข้น $1x10^6$ ผลึก ในการทำให้หนอนตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างหนอนที่มีอาการผิดปกติ เป็นโรคจากแปลงปลูกผัก แปลงไม้ดอก ของเกษตรกรในภาคเหนือ และภาคตะวันตก พบหนอนตายจำนวน 12 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่พบหนอนที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส และทดสอบการเกิดโรคกับหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ พบว่าทำให้หนอนตายน้อยกว่า 50% จึงไม่สามารถนำมาผลิตเป็นสารชีวภัณฑ์ได้

เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม และทดสอบเชื้อไวรัสกับหนอนกับหนอนทั้ง 3 ชนิด ที่อัตรา 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} และ 10^{-9} พบว่าไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 93.33% ไวรัสเอ็นพีวีหนอนกระทู้หอม ความเข้มข้น $1x10^7$ ผลึก ทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 93.33% และไวรัสเอ็นพีวีหนอนเจาะสมอฝ้าย ความเข้มข้น $1x10^6$ ผลึก ทำให้หนอนเจาะสมอฝ้ายตาย 96.67% เมื่อเปรียบเทียบกับหนอนที่ไม่ได้รับเชื้อไวรัส และหนอนกระทู้ผักใช้เวลามากกว่าไวรัสชนิดอื่นๆ ในการทำให้หนอนตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในการนำไปใช้ในแปลงปลูกพืชจะมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการตายของหนอน เช่น วัยของหนอน ปริมาณเชื้อที่หนอนกิน ซึ่งอาจมีผลต่อความสามารถในการควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูพืชได้

เอกสารอ้างอิง

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

กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข, สมศักดิ์ ศิริผลตั้งมั่น, อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก และลักษณา วรรณภีร์. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูหอมแดงโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 85-91.

นิภา จันท์ศรีสมหมาย, ไพศาล รัตนเสถียร, จาตุรงค์ ฤกษ์สังเกต, สุปราณี อิ่มพิทักษ์, อัจฉรา ตันติโชดก, อุทัย เกตุนุติ, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ปิยรัตน์ เขียนมีสุข และ มานิตา คงชื่นสิน. 2543. การป้องกันแมลงศัตรูถั่วฝักยาวโดยวิธีผสมผสาน. หน้า 175–197. *ใน* : รายงานผลการดำเนินงานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 3. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วิทย์ นามเรืองศรี และบุษบง มนัสมั่นคง. 2540. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูองุ่นโดยวิธีผสมผสาน. เอกสารทางวิชาการ การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 122-134.

Burgs, H.D. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland.

Caballero, P., Zuidema, D., Santiago-Alvares, C. and Vlak, J.M. 1992. Biochemical and biological characterization of four isolates of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus. Biocontrol Science and Technology 2, 145-157.