ศึกษาชีววิทยาของโปรโตซัวที่เข้าทำลายระบบการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัส Nucleopolyhedrovirus และการควบคุม

Study Biology of Protozoa in *Spodoptera litura* (Fabricius) Mass Rearing for Nucleopolyhedrovirus Production and Its Control

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรส เทียนทัด

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี นางรัตนา นชะพงศ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่ติดเชื้อโปรโตซัว โดยจะมีลำตัวสีซีดมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาต่างๆ จากนั้นทำ sucrose gradient centrifugation สามารถแยกเศษซากหนอน และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ทำให้เชื้อโปรโตซัวบริสุทธิ์ ทำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 $x10^7$ PIBs/ml การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวน้อยที่สุด คือ 38.75 $x10^7$ PIBs/ml แต่กรรมวิธีอื่นๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก การใช้ความเร็วรอบ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด และจากการศึกษาพบว่าเชื้อโปรโตซัวสามารถถ่ายทอดจากหนอนรุ่นพ่อแม่ สู่รุ่นลูก (F1) ได้ โดยหนอนที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหนอนปกติ แต่จะมีสีซีดกว่า และจะทำการศึกษาผลของโปรโตซัวต่อหนอนในรุ่นต่อๆ ไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-01-06-54

คำนำ

ไวรัส nuclear polyhedrosis virus ของหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* (SeNPV) จัดเป็นไวรัส NPV ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสูง ที่สามารถนำไปใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในการควบคุมหนอนกระทู้หอมในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หอมแดง หอมหัวใหญ่ หน่อไม้ฝรั่ง กระเจี๊ยบเขียว ฝ้ายองุ่น และผักตระกูลกะหล่ำ เป็นต้น จากปัญหาของการดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงของหนอนกระทู้หอมและสารเคมีทีราคาสูงขึ้น การนำไวรัส SeNPV ไปใช้ควบคุมหนอนกระทู้หอมจะเป็นการช่วยแก้ปัญหาให้แก่เกษตรกรได้ จากกระแสความต้องการผลิตผลทางการเกษตรที่ปลอดภัยจากสารพิษตกค้างของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้ไวรัส SeNPV จึงเป็นทางเลือกในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอมที่ช่วยเพิ่มคุณภาพของผลผลิตพืชผักและผลไม้ให้แก่เกษตรกรได้ ดังนั้นการพัฒนาเพื่อผลิต SeNPV ในเชิงพาณิชย์ จะเป็นการช่วยให้เกษตรกรได้นำไปใช้กว้างขวางขึ้น จากนโยบายของรัฐบาลที่จะช่วยสร้างความเข้มแข็งให้แก่เกษตรกร เช่นช่วยตัวเองในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชและลดต้นทุนการผลิต ไวรัส SeNPV จึงมีบทบาทสำคัญ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวที่เกษตรกรสามารถทำการต่อเชื้อไวรัสใช้เองในแปลงเกษตรกรได้ โดยมีวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก การพัฒนาเพิ่มขีดความสามารถในการผลิตไวรัส SeNPV ในเชิงพาณิชย์ ยังประสบปัญหาของการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัว (*Nosema* sp.) ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญต่อระบบการผลิตหนอนกระทู้หอม เพื่อนำไปใช้ผลิตขยายเชื้อไวรัส SeNPV ที่ไม่สามารถทำการผลิตหนอนกระทู้หอมได้อย่างต่อเนื่อง การหาวิธีการควบคุมไม่ให้เกิดการระบาดของเชื้อโปรโตซัว จึงมีความสำคัญยิ่งต่อระบบการผลิตเชื้อไวรัส SeNPV ของหนอนกระทู้หอม

โดยหลักการแล้วไวรัส NPV จะทำให้ตัวอ่อนของแมลงในตระกูลผีเสื้อตายจากการเกิดโรคและเกิดการแพร่ระบาดไปสู่ประชากรของหนอน โดยการถ่ายทอดไปทางไข่ของแม่ผีเสื้อ ดังนั้นการผลิตไวรัสต้องแยกอาคารที่ผลิตแมลงอาศัยออกจากอาคารที่ผลิตขยายเชื้อไวรัส แต่เนื่องจากมีพื้นที่จำกัดทำให้ต้องเลี้ยงแมลงอาศัยและผลิตขยายเชื้อไวรัสในอาคารเดียวกันแต่แยกชั้น ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตขยายเชื้อไวรัสจึงมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวซึ่งสามารถถ่ายทอดโรคโดยผ่านทางไข่ เริ่มแสดงอาการในหนอนรุ่นที่ 2 และเกิดการระบาดรุนแรงในหนอนรุ่นที่ 3 ทำให้ผลผลิตไวรัส NPV ที่ได้มีการปนเปื้อนสปอร์ของโปรโตซัว ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของไวรัสที่ผลิตได้ (อุทัยและคณะ, 2543)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์ สารเคมี

1. เครื่องผสมอาหารเทียม
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
4. เครื่อง ultra centrifuge
5. หลอดเก็บตัวอย่างหนอน
6. แผ่นสไลด์
7. sieve ขนาด 150 micrometer
8. haemacytometer
9. สารเคมีผลิตอาหารเทียม
10. sucrose

วิธีการ

คัดเลือกตัวอย่างหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในห้องปฏิบัติการ นำหนอนที่ได้มาบดในน้ำกลั่น นำสารแขวนลอยที่ได้มากรองด้วย sieve ขนาด 150 micrometer เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อหนอนออก นำของเหลวส่วนบนที่ได้มาแบ่งเป็นส่วนๆ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบต่างๆ ดังนี้

1 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที

2 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที

3 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที

4 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที

5 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 10 นาที

6 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 20 นาที

7 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 5,000 RPM 10 นาที

8 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 5,000 RPM 20 นาที

จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเครื่อง ultra centrifuge โดยวิธี sucrose gradient centrifugation นำเชื้อโปรโตซัวที่ปั่นแยกได้มาตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อโปรโตซัวในแต่กรรมวิธีด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 1,000

เท่า กรรมวิธีละ 10 ครั้ง บันทึกข้อมูลปริมาณสปอร์เชื้อโปรโตซัวที่นับได้ ลักษณะของตะกอนเชื้อโปรโตซัวที่ได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เวลา สถานที่ ตุลาคม 2554-กันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการติดเชื้อโปรโตซัว โดยลำตัวมีสีผิดปกติ ขาวซีด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาต่างๆ เพื่อทำเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ และใช้น้ำตาลซูโครส ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์และเศษซากหนอนที่เหลืออยู่ ทำให้ได้เชื้อโปรโตซัวที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมานับจำนวนโปรโตซัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังตาราง

ตาราง ผลการปั่นเหวี่ยงเชื้อโปรโตซัว ที่ความเร็วรอบและระยะเวลาต่างๆ

อัตราความเร็วและระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยง	ปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่ได้ (PIBs/ml)
1. 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที	57.09×10^7
2. 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 20 นาที	53.75×10^7
3. 1,500 rpm 5 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที	56.11×10^7
4. 1,500 rpm 5 นาที และ 2,000 rpm 20 นาที	54.86×10^7
5. 1,500 rpm 5 นาที และ 3,000 rpm 10 นาที	58.47×10^7
6. 1,500 rpm 5 นาที และ 3,000 rpm 20 นาที	54.86×10^7
7. 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที	61.11×10^7
8. 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที	38.75×10^7

จากตารางจะพบว่าการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11×10^7 PIBs/ml การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวน้อยที่สุด คือ 38.75×10^7 PIBs/ml ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ได้ แต่กรรมวิธีอื่นๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันมากนัก การใช้ความเร็วรอบ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เชื้อโปรโตซัวสามารถถ่ายทอดจากหนอนรุ่นพ่อแม่ สู่รุ่นลูก (F1) ได้ โดยหนอนที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหนอนปกติ แต่จะมีสีซีดกว่า และจะทำการศึกษาผลของโปรโตซัวต่อหนอนในรุ่นต่อๆ ไป การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเหมาะสม และวิธี sucrose gradient centrifugation สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัวบริสุทธิ์ได้ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 $x10^7$ PIBs/ml แต่การปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด เหมาะกับการนำไปใช้งานต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พีเอ็ม. *ใน* รายงานผลการดำเนินงานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 4 วันที่ 29-31 สิงหาคม 2544. โรงแรมรีเจนท์ ชะอำ เพชรบุรี. 309 หน้า.

อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก, จารุวัตถ์ แต้กุล และพิมลพร นันทะ, 2543. การพัฒนาการผลิตไวรัส NPV ปัญหาและแนวทางแก้ไข. การประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลงและสัตว์ศัตรูพืชประจำปี 2543. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 543-559.

อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดก, สถิตย์ ปฐมรัตน์, กอบเกียรติ์ บันสิทธิ์, ไพศาล รัตนเสถียร, สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต, กนกพร อุ่นใจชน, พิมลพร นันทะ และโอชา ประจวบเหมาะ, 2541. การผลิตไวรัส NPV เชิงพาณิชย์ในประเทศไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ. รายงานผลการวิจัยโรค ไวรัส NPV ปี พ.ศ. 2541 กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร 86 หน้า.