คู่มือ
กระบวนการผลิต
ปัจจัยการผลิต

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

(ชื่อหน่วยงาน) กรมวิชาการเกษตร	ขั้นตอนการดำเนินงาน	หน้า
	หมายเลขเอกสาร	แก้ไขครั้งที่ ฉบับที่
เรื่อง กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต (สอพ.)	ผู้จัดทำ..... ตำแหน่ง.....	วันที่ออกเอกสาร ผู้ทบทวน

1. วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อให้ได้ปัจจัยการผลิตที่มีคุณภาพได้มาตรฐานสอดคล้องกับยุทธศาสตร์ พันธกิจของกรมวิชาการเกษตร

1.2 มีการผลิตอย่างเป็นระบบ ชัดเจน และสามารถตรวจสอบได้

1.3 ผู้ปฏิบัติงานทุกคนสามารถผลิตปัจจัยการผลิตได้ตามขั้นตอนที่กำหนดไว้ในคู่มือ

2. ขอบข่าย

ครอบคลุมการดำเนินงานของหน่วยงานสังกัดกรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่การเสนอโครงการ การอนุมัติโครงการ การผลิต ปัจจัยการผลิตแต่ละชนิด การตรวจสอบคุณภาพ การเผยแพร่และการนำไปใช้ประโยชน์

3. เอกสารอ้างอิง

3.1 เอกสารวิชาการ BT NPV ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง โปรตัวซัว แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. แตนเบียนหนอนหัวดำมะพร้าว แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง แมลงหางหนีบ GLIFT kit แบคทีเรีย (ปทุมมา/มันฝรั่ง/ขิง) แอนติซีรัม (ปทุมมา/มันฝรั่ง/ขิง/กล้วยไม้) ตาพันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

3.2 เอกสารแผนการผลิตและงบประมาณที่ได้รับจัดสรรประจำปีงบประมาณ

3.3 เอกสารงบประมาณรายจ่ายประจำปีงบประมาณ

4. คำนิยาม

ปัจจัยการผลิต หมายถึง BT NPV ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง เหยื่อโปรโตซัวใช้กำจัดหนู แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว แตนเบียนไข่ *Trichogramma* sp. แตนเบียนหนอนหัวดำมะพร้าว แตนเบียนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลัง แมลงหางหนีบ GLIFT kit แบคทีเรีย (ปทุมมา/มันฝรั่ง/ขิง) แอนติซีรัม (ปทุมมา/มันฝรั่ง/ขิง/กล้วยไม้) ตาพันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค

นวก.ผู้รับผิดชอบ หมายถึง นักวิชาการผู้รับผิดชอบการผลิตปัจจัยการผลิตแต่ละชนิดใน สอพ. ที่อยู่ในกลุ่มกีฏและสัตววิทยาและกลุ่มวิจัยโรคพืชของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

คณะกรรมการพิจารณากำกับดูแล การผลิต ขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต มีหน้าที่พิจารณางบประมาณและแผนผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิตของหน่วยงานในสังกัดกรมวิชาการเกษตร

สบ. หมายถึง ส่วนบริหารโครงการวิจัย

ฝบ. หมายถึง ฝ่ายบริหารทั่วไป

1. BT คือ แบคทีเรียบาซิลัส ทูริงเจนซีส (*Bacillus thuringiensis*) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพใช้ในการกำจัดหนอนผีเสื้อที่เข้าทำลายในผักตระกูลกะหล่ำ ได้แก่ หนอนคืบกะหล่ำในคะน้า ได้แก่ หนอนใยผัก, หน่อไม้ฝรั่ง ได้แก่ หนอนกระทู้หอม มะเขือเทศ ได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนผีเสื้อที่เข้าทำลายไม้ผลพวกส้มเขียวหวาน ได้แก่ หนอนเจาะสมอฝ้าย, องุ่น ได้แก่ หนอนแปะใบและหนอนกระทู้หอม หนอนผีเสื้อที่เข้าทำลายพืชไร่ ในยาสูบ ได้แก่ หนอนผีเสื้อยาสูบ, ข้าวโพด ได้แก่ หนอนเจาะต้นข้าวโพด และในปาล์มน้ำมัน ได้แก่ หนอนร่านและหนอนหน้าแมว

2. ไวรัส NPV เป็นไวรัสชนิด *Nuclear polyhedrosis virus* (NPV) เป็นไวรัสที่ทำให้หนอนของแมลงตายและเป็นไวรัสที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงเป้าหมายเท่านั้น เช่น ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้จะทำลายเฉพาะหนอนกระทู้หอม ในขณะนี้กรมวิชาการเกษตรได้ผลิตและขายไวรัส NPV ของหนอน 3 ชนิด

คือ ไวรัส NPV ของหนอนกระทู้หอม (SeNPV) ไวรัส NPV ของหนอนเจาะสมอฝ้าย (He NPV) และไวรัสของหนอนกระทู้ผัก (SI NPV)

3. ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง *Steinernema carpocapsae* เป็นไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายเฉพาะแมลง ไม่ทำอันตรายต่อคน สัตว์ และพืชทุกชนิด ลักษณะไส้เดือนฝอยคล้ายเส้นด้ายยาวประมาณ 0.2 มม. มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น ในธรรมชาติไส้เดือนฝอยจะเป็นฝ่ายเข้าหาแมลงอาศัยโดยทางปากทวารและรูหายใจ ไส้เดือนฝอยสามารถป้องกันกำจัดหนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง, ตัวอ่อนด้วงหมัดผักกาดแถบลาย, หนอนกระทู้ในดาวเรือง, หนอนผีเสื้อกินก้อนเชื้อเห็ด, ด้างขนสัตว์ในหญ้าสนาม และหนอนด้วงกินรากสตอเบอรี่

4. เหยื่อโปรตัวซัวกำจัดหนู เป็นปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เพื่อกำจัดหนู เป็นสารชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนู ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ชนิดอื่น ๆ ไม่มีพิษตกค้างในสภาพแวดล้อม และเป็นปรสิตที่พบและมีอยู่ในธรรมชาติระหว่างหนูและงูเหลือมพบในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น

5. แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว เป็นแตนเบียน *Asecodes hispinarum* มีขนาดเล็กใช้สำหรับป้องกันกำจัดแมลงดำหนามมะพร้าวในพืชตระกูลปาล์ม โดยตัวเมียแตนเบียนที่ผสมพันธุ์แล้ว จะวางไข่ในตัวหนอนของแมลงดำหนามมะพร้าว ทำให้แมลงดำหนามตาย

6. แตนเบียนไข่ *Trichogramma sp.* เป็นแมลงเบียนไข่จะเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชเฉพาะระยะไข่ โดยไข่ของแมลงศัตรูพืชจะไม่ฟักออกเป็นหนอนของศัตรูพืชนั้น ๆ แต่จะมีตัวเต็มวัยของแตนเบียนไข่ฟักออกมาแทน แตนเบียนไข่สามารถนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดในระยะไข่อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ ไข่หนอนเจาะสมอฝ้าย, ไข่หนอนกออ้อย, ไข่หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด, ไข่หนอนใยผัก, ไข่หนอนคืบกะหล่ำปลี, ไข่หนอนคืบละหุ่ง, ไข่หนอนแก้วส้ม และไข่หนอนกอแถบลาย

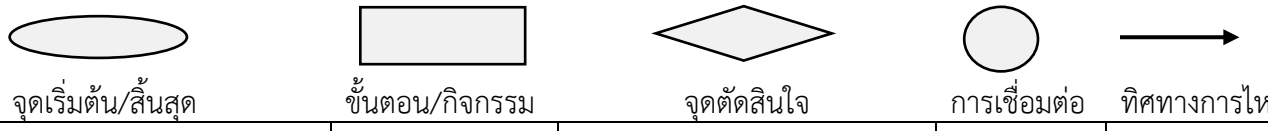
7. ชุดตรวจสอบ GLIFT kit แบคทีเรีย (ปทุมมา/มันฝรั่ง/ขิง) เป็นชุดตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย โรคเหี่ยวในปทุมมา มันฝรั่ง และขิง สามารถตรวจสอบอ่านผลของปฏิกิริยาได้ภายใน 3-5 นาที

8. แอนติซีรัม CyMV ORSV ของกล้วยไม้ PVX PVY ของมันฝรั่ง และแอนติซีรัม Rs ของขิง และปทุมมา Burk และ Aacat ของกล้วยไม้

9. ตาพันธุ์พืชตระกูลส้มปลอดโรค เป็นตาพันธุ์ของพืชตระกูลส้ม โดยเป็นตาพันธุ์ที่ปลอดภัยจากเชื้อโรคไวรัสทริสเตซ่า และโรคกรีนนิ่ง

10. แมลงหางหนีบ เป็นแมลงศัตรูธรรมชาติ ใช้ควบคุมไข่ และตัวหนอนของผีเสื้อชนิดต่าง ๆ เช่น หนอนกออ้อย รวมถึงเพลี้ยอ่อน และแมลงศัตรูพืชขนาดเล็กที่มีลำตัวอ่อนนิ่ม

5.1 ผังกระบวนการผลิตเชื้อ Bt. (*Bacillus thuringiensis*)



ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต		Y		
3. กระบวนการผลิต				
3.1 เตรียมและเก็บรักษาเชื้อ Bt. เป็น stock				
3.2 เพิ่มปริมาณและเตรียมหัวเชื้อใน stake flask				
3.3 ผลิตขยายในถังหมัก				
3.4 การหมัก				
3.5 การเก็บเชื้อ Bt.	Y			
3.6 ตรวจสอบคุณภาพ		N		
3.7 ทำสูตรสำเร็จ (formulation)				
3.8 บรรจุหีบห่อ				
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

การผลิตเชื้อ Bt

1. การเตรียมและเก็บรักษาเชื้อ Bt เพื่อเป็น stock culture

เนื่องจาก Bt มีหลาย subspecies และหลายสายพันธุ์ (strain) จึงต้องแยก Bt ให้บริสุทธิ์ก่อน เพราะถ้าหากมีการเลี้ยง Bt 2 ชนิด ไว้ด้วยกันจะปรากฏว่าพลาสมิด (plasmid) ของ Bt ทั้ง 2 ชนิด สามารถถ่ายโอนไปหากันได้ โดยวิธีที่เรียกว่า conjugation ดังนั้น การเตรียมสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์จึงมีความจำเป็น

กระบวนการเตรียมเชื้อ Bt ให้บริสุทธิ์ มีขั้นตอนดังนี้

(1) แยกเชื้อ Bt จากที่เก็บจากการสำรวจซึ่งเก็บรักษาไว้ใน Slant agar มาใส่ใน Nutrient agar (NA) หรือ Tryptose-phosphate agar (TPA) ซึ่งบรรจุใน petri dish จะต้องทำการแยก colony ซ้ำ 1-2 ครั้ง จนแน่ใจว่าเชื้อบริสุทธิ์

(2) นำเชื้อบริสุทธิ์เขี่ยใส่ NA ที่บรรจุในหลอดแก้ว (test tube) ปิดด้วยแผ่น parafilm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จดบันทึกวันที่เก็บตัวอย่าง และใส่รหัสของตัวอย่าง Bt

(3) นำเชื้อบริสุทธิ์ไปเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง

2. การเพิ่มปริมาณและเตรียมหัวเชื้อ (starter หรือ seed inoculum) ใน shake flask

เป็นการเพิ่มปริมาณ Bt ให้เพิ่มมากขึ้น การผลิตในสภาพห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้ในงานทดลองหรือการผลิตกล้าเชื้อ สามารถทำการผลิตในขบวนการข้อ 2 นี้ โดยตรวจนับสปอร์ และ toxin แต่หากเป็นการผลิตในถังหมักเชื้อขบวนการข้อ 2 จะเป็นการเตรียมหัวเชื้อ เพื่อนำไปผลิตต่อไป มีขั้นตอนดังนี้

(1) เตรียม Nutrient broth (NB) หรือ Tryptose-phosphate broth (TPB) 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้ว (Erlenmeyer flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่ง (autocave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 120 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็น

(2) นำเชื้อบริสุทธิ์ที่เก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ มาเขี่ยลงใน flask

(3) เขย่า flask 200-250 รอบ/นาที นาน 20-24 ชั่วโมง จนได้จำนวนเซลล์ $1x10^7$ -$1x10^8$ cfu/มิลลิลิตร เก็บไว้เพื่อเป็น starter ในการผลิตขยายในถังหมักต่อไป

3. การผลิตขยายในถังหมัก (Production fermenter)

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

3.1) สูตรอาหารที่ใช้ในการผลิต

อาหารที่สำคัญของ Bt คือ คาร์บอน ไนโตรเจน และแร่ธาตุ รวมถึงออกซิเจน (Wuhan, 2002) ซึ่ง Bt เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) ออกซิเจนไม่นับรวมในสูตรอาหารแต่จะเข้ามาในกระบวนการผลิตโดยการอัดอากาศ ในถังหมักระหว่างการผลิต อยู่ในขบวนการหมักในข้อ 3.2

การเลือกสรรวัตถุดิบที่ผลิต Bt มีปัจจัย 3 ประการ คือ

(1) หาง่ายได้

(2) ราคาถูก

(3) เป็นอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของเชื้อ Bt

ดังนั้น ในถังหมักจะใช้อาหารที่สำคัญ ซึ่งประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน (carbon source) ซึ่งได้จากพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ กลูโคส (gluclose), แป้ง (starch), โมลาส (Molasses) เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) ซึ่งได้จากพวกโปรตีน อาทิเช่น ปลาป่น, ปลาน้ำ, ยีสต์, ถั่วเหลือง, เมล็ดฝ้ายป่น ฯลฯ ซึ่งอาหารเหล่านี้ เป็นแหล่งโปรตีนที่มีธาตุอาหารไนโตรเจนที่ดี

แร่ธาตุอื่น ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ แมกนีเซียม (Mg), แมงกานีส (Mn) เหล็ก (Fe), สังกะสี (Zn), แคลเซียม (Ca) และฟอสฟอรัส (P) เป็นต้น เป็นเกลือแร่ ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ Bt

3.2) ขบวนการหมัก (fermentation)

เป็นขบวนการให้เชื้อ Bt เจริญเติบโตในถังหมักเชื้อ เพื่อสามารถให้ได้จำนวนสปอร์และสารพิษที่สูงสุด ซึ่งมีกระบวนการดังนี้

(1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ใช้ในการผลิตตามสูตรที่กำหนดลงในถังหมัก โดยใช้น้ำกรองที่ผสมสูตรอาหาร โปรตีน + คาร์โบไฮเดรต + เกลือแร่ กวนด้วยพายให้อาหารผสมกัน ปรับ pH ในถังหมัก ให้ pH 7.2 เปิดฝาช่องเท อาหาร เทอาหารสู่ถังหมักแล้วปิดฝา

(2) ใช้ไอน้ำนึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่เตรียมในถังหมักที่อุณภูมิ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 20 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30 นาที ปล่อยให้ถังหมักเย็นลง 30 นาที แล้วผ่านน้ำเย็นที่ได้จากเครื่อง chiller เข้าไปในช่องว่างระหว่างถังเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อลดอุณหภูมิของถังหมักเชื้อ หลังจากนั้นทิ้งไว้ 18 ชั่วโมง

(3) ปลูกเชื้อ Bt ในถังหมักเชื้อ โดยเท starter ใน flask ในข้อ 2(3) ลงในถังหมักเชื้อ (ระหว่างเท starter ต้องดำเนินการอยู่ในขบวนการปลอดเชื้อ : aseptic technique) เดินเครื่องกวนที่ความเร็ว 270 รอบ/นาที อัดอากาศ 0.75 กิโลกรัม/ตารางเซนติเมตร เป็นการกวนให้เซลล์ของ Bt อาหารและอากาศผสมคลุกเคล้ากัน

(4) เมื่อเกิดฟอง ใส่สารควบคุมการเกิดฟอง และลดปริมาณอากาศที่อัดลงในถังหมักเชื้อ

(5) เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อตรวจดูการเจริญเติบโตของเซลล์ Bt และการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ด้วยการนำ wet mount บนแผ่นสไลด์ และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

(6) ใช้เวลาขยายเซลล์ Bt ในถังหมักเชื้อ ประมาณ 20 – 24 ชั่วโมง จึงยุติกระบวนการในถังหมักเชื้อ หรือสิ้นสุดขบวนการในถังหมักเชื้อเซลล์ Bt แตกตัวประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์

4. การเก็บเชื้อ Bt

หลังขบวนการผลิต ถ่าย Bt จากถังหมัก เก็บในถังพักและหยุดขบวนการเจริญเติบโตด้วยสารกันบูด เชื้อที่ได้จะแขวนลอยในอาหาร นำไปตกตะกอนหรือนำไปเข้าเครื่อง centrifuge เพื่อแยกสปอร์ และสาร toxin ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยลดปริมาณน้ำ จาก Bt ที่ผลิตได้ ขณะเดียวกันก็เพิ่มความเข้มข้นของสปอร์ของ Bt

5. การตรวจสอบคุณภาพ (Quality control)

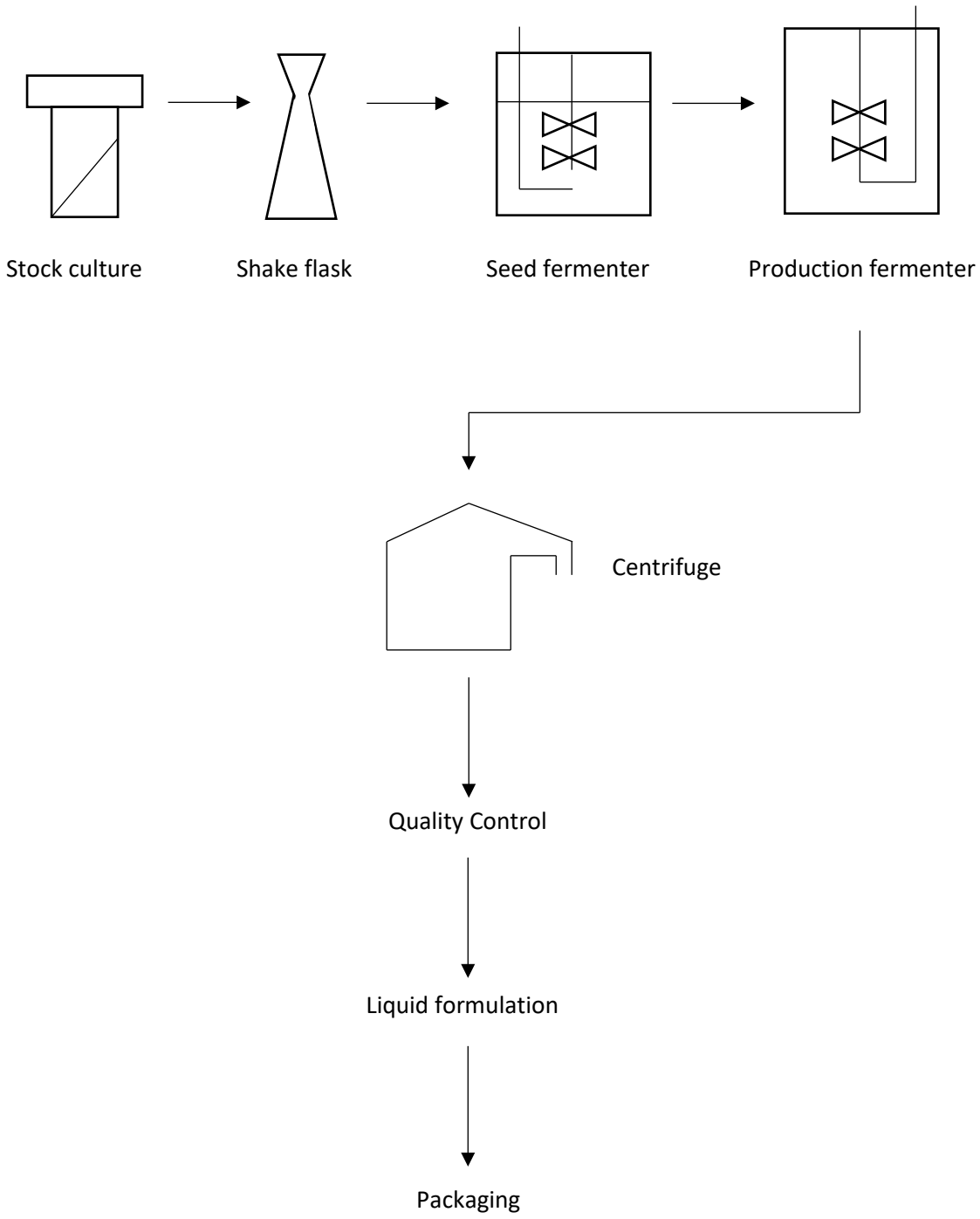
ตรวจสอบควบคุมคุณภาพ Bt ที่ผลิตได้ว่ามีจำนวนสปอร์เท่าใด และมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นปะปนหรือไม่ โดยนำตัวอย่าง Bt มาแช่น้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อทำลาย vegetative cell แล้วตรวจนับสปอร์ของเชื้อ Bt โดยนับจำนวน colony แล้วจึงนำไปทดสอบคุณภาพโดยทดสอบการตายของหนอนว่าได้ค่ามาตรฐานที่กำหนดหรือไม่

6. การทำสูตรสำเร็จ (formulation)

โดยทำการเติมสารป้องกันรังสี UV สารช่วยแขวนลอย สารช่วยจับใบและสารป้องกันการอุดตันของหัวฉีด มีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษา Bt ให้คงประสิทธิภาพอยู่ในสภาพแวดล้อมนานที่สุด อีกทั้งสามารถนำ Bt ไปใช้ได้สะดวก เหมือนสารฆ่าแมลง ทำให้การพ่น Bt ในสภาพไร่รวดเร็วขึ้น และสามารถพ่นครอบคุลมส่วนต่าง ๆ ของพืชได้

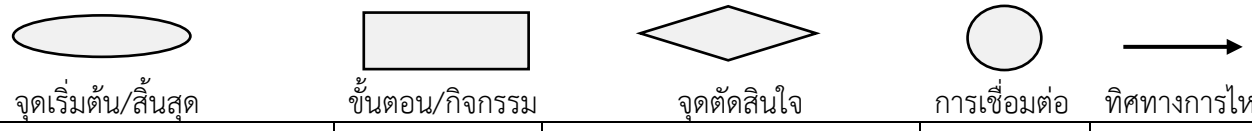
7. การบรรจุหีบห่อ (packaging)

บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิทป้องกันความชื้น กรณีสูตรผง ต้องป้องกันการหกให้ห่อหุ้มมิดชิด หากเป็นสูตรน้ำ ขวดควรป้องกันแสงแดดโดยใช้พลาสติกทึบ เพื่อป้องกันรังสี UV จากแสงอาทิตย์



แผนภูมิขั้นตอนในการผลิตขยายเชื้อ Bt ในเชิงพาณิชย์

5.1 ผังกระบวนการผลิตไวรัส NPV (Neclear Polyhedrosis Virus)



ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต		Y		
3. กระบวนการผลิต				
3.1 เลี้ยงขยายพันธุ์แมลงอาศัยเพื่อนำไปผลิต NPV				
3.2 ขยายพันธุ์ NPV และเก็บเชื้อไวรัส NPV บนแมลงอาศัย				
3.3 เก็บหนอนที่ตายจากเชื้อไวรัส				
3.4 ตรวจสอบคุณภาพ		N		
3.5 บรรจุหีบห่อ	Y			
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

การผลิตขยายไวรัส NPV

การเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงอาศัยเพื่อนำไปใช้ผลิตเชื้อไวรัส

การเลี้ยงขยายพันธุ์แมลงอาศัย จำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการผลิตเชื้อไวรัสเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ทั้งนี้เนื่องจากไวรัสต้องอาศัยแมลงในการดำรงชีวิตและแพร่พันธุ์ (obligate parasite) ไวรัส NPV มีความเฉพาะเจาะจงสูง ที่จะเข้าไปเจริญและทวีจำนวนอยู่ในเซลล์ของแมลงอาศัยเท่านั้น เราไม่สามารถผลิตขยายไวรัสบนอาหารได้เหมือนเชื้อรา แบคทีเรีย หรือไส้เดือนฝอย

การเพาะเลี้ยงแมลงอาศัยเพื่อนำมาใช้ขยายพันธุ์ไวรัส NPV นับว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในปัจจุบัน เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายถูกกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงบนเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาวิธีการผลิตขยายแมลงอาศัยให้ได้ปริมาณมาก โดยการใช้อาหารเทียมมาทดแทนอาหารธรรมชาติจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมเนื่องจาก

1. ประหยัดแรงงานในการเลี้ยงแมลง เนื่องจากไม่ต้องปลูกพืชอาหารเพื่อนำมาใช้เลี้ยงแมลง

2. สามารถลดเนื้อที่ในการเลี้ยงแมลงได้มากกว่าวิธีการเลี้ยงแมลงด้วยพืชอาหารตามธรรมชาติ

3. สามารถเลี้ยงแมลงอาศัยได้จำนวนมากตามความต้องการ โดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องของอาหารที่จะนำมาเลี้ยง

4. สามารถควบคุมคุณภาพของอาหารเทียมได้ตลอดเวลา เป็นผลดีต่อคุณภาพของแมลงอาศัยที่จะนำมาใช้ผลิตขยายไวรัส NPV

5. การเลี้ยงด้วยอาหารเทียมสามารถวางแผนการผลิตหนอนได้ติดต่อกันตลอดปี

6. การเลี้ยงแมลงอาศัยด้วยอาหารเทียมจะประหยัดแรงงาน เวลา ในเรื่องของการดูแลและการเปลี่ยนอาหาร ความสะอาดของภาชนะเลี้ยง

7. สามารถที่จะควบคุมขนาดของหนอนให้ได้ขนาดตามต้องการและมีความสม่ำเสมอสูง

วิธีการขยายพันธุ์และเก็บเชื้อไวรัส NPV บนแมลงอาศัย

การเพาะเชื้อไวรัสบนแมลงอาศัยมีอยู่ 2 วิธีการ คือ

1. นำไวรัสมาเคลือบบนผิวหน้าของอาหารเทียมแล้วนำไปเลี้ยงแมลง
2. ผสมไวรัสลงไปโดยตรงในขณะที่เตรียมอาหารเทียมแล้วนำมาเลี้ยงแมลง

การเก็บหนอนที่ตายจากเชื้อไวรัส

1. เลี้ยงหนอนที่ได้รับเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 27 – 28 องศาเซลเซียส โดยทั่ว ๆ ไป จะเก็บหนอน ไว้ 7 วัน หลังจากที่ได้รับเชื้อ จากนั้นทำการเก็บรวบรวมหนอนตายโดยใช้เครื่องดูดหนอนซึ่งดัดแปลงจาก vacuum pump ซึ่งทำงานได้รวดเร็วกว่าการใช้ปากคีบเก็บหนอนออกจากภาชนะเลี้ยง โดยทั่ว ๆ ไปหนอนจะเริ่มตายในวันที่ 5 การเก็บหนอนตายอาจใช้ปากคีบๆ ตัวหนอนจากภาชนะเลี้ยง นำมารวบรวมในภาชนะเก็บ เช่น ขวดหรือบีกเกอร์ ถ้าตัวหนอนแตกเละอาจใช้ Pasteur pipette หยดน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยแล้วดูดซากหนอนตายขึ้นมา

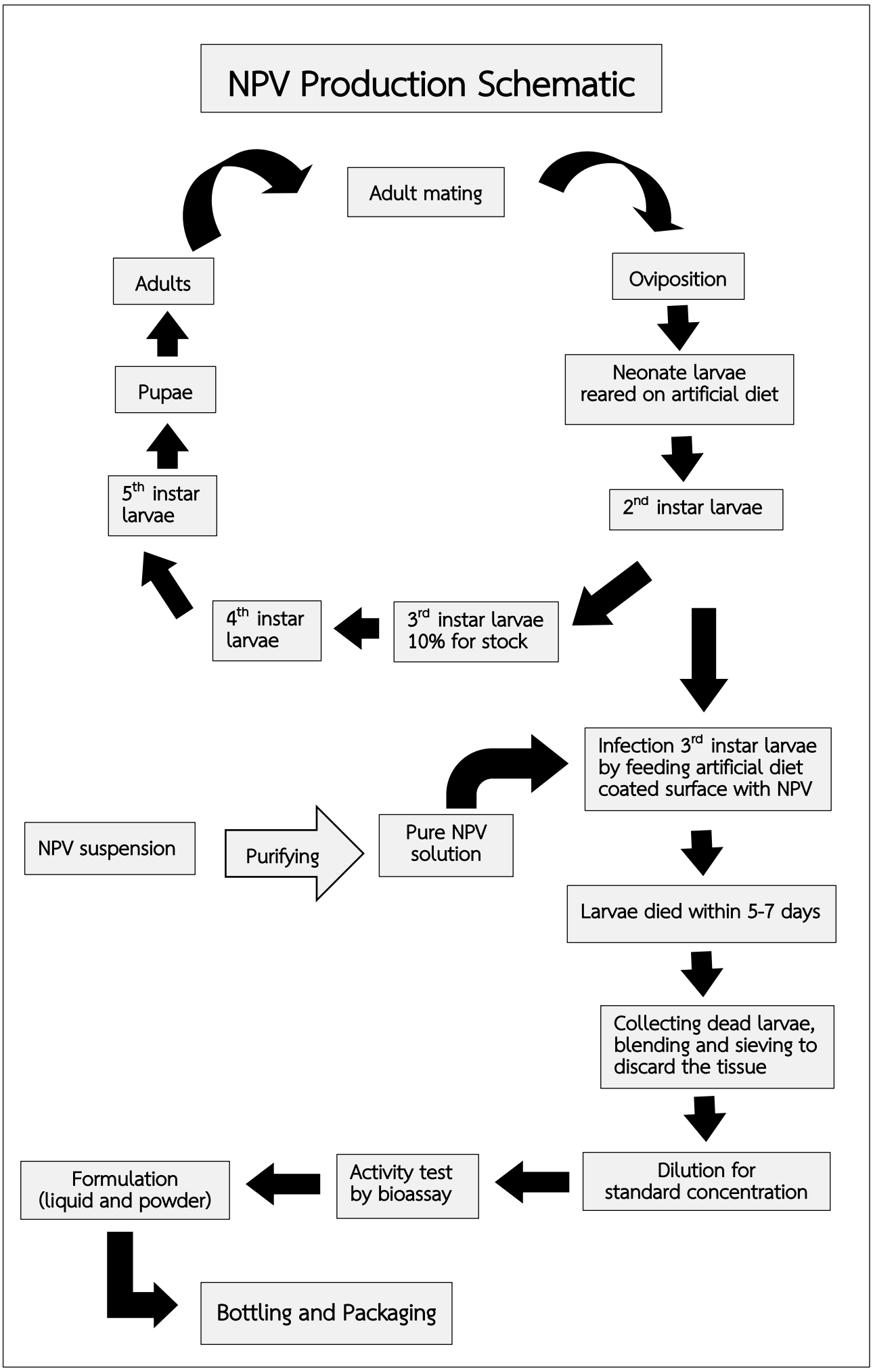
2. เมื่อเก็บรวบรวมหนอนตายได้แล้ว ถ้าต้องการเก็บเชื้อเอาไว้ควรรวบรวมเก็บใส่ภาชนะ ที่ไม่แตกง่าย เช่น ขวดพลาสติกหนา แล้วเก็บไว้ในช่องแข็งทันทีที่ระดับอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนอยู่ในซากหนอนตาย การเก็บวิธีนี้จะเก็บรักษาเชื้อไวรัส NPV ให้คงประสิทธิภาพอยู่ได้นานเป็นปี

3. ถ้าหากต้องการนำเชื้อไปใช้ทันที จะต้องนำหนอนตายที่เก็บรวบรวมได้มาเข้าเครื่องปั่น (blender) เพื่อปั่นให้ลำตัวหนอนแตกเละ จากนั้นนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางซ้อนกัน 2 ชั้น หรือตะแกรงทองเหลือง (sieve) เพื่อแยกส่วนเนื้อเยื่อหนอนตายและเศษอาหารเทียมทิ้งไป จากนั้นนำน้ำที่ได้จากการกรองซึ่งมีผลึกไวรัสแขวนลอยอยู่มาตรวจนับจำนวนผลึก

4. การปรับความเข้มข้นของสารแขวนลอยไวรัส เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่กำหนด โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เครื่องนับเม็ดเลือด (hemacytometer) ที่ใช้ตามโรงพยาบาล โดยนำตัวอย่างไวรัสมาเจือจาง

โดยทราบอัตราเจือจางที่แน่นอน เช่น 1 ต่อ 1,000 หรือ 1 ต่อ 2,000 โดยใช้น้ำกลั่นมาเจือจาง จากนั้นนำมาตรวจนับด้วยเครื่องนับเม็ดเลือดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ ทำการตรวจนับจำนวน 10 ครั้ง ตัวเลขที่ได้นำมาเฉลี่ยและคำนวณกลับเป็นจำนวนผลึกต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการปรับความเข้มข้นให้ได้ความเข้มข้นมาตรฐาน กรณีที่ไวรัสที่ผลิตได้เจือจางกว่าความเข้มข้นมาตรฐาน สามารถแก้ไขโดยการนำเข้าเครื่องปั่น (centrifuge) แยกเอาน้ำออกไปหรือปล่อยให้ไวรัสตกตะกอนไว้ 2 วัน ในตู้เย็นที่อุณภูมิ 10 – 15 องศาเซลเซียส เทน้ำส่วนบนทิ้งไปจนได้ความเข้มข้นตามต้องการ ความเข้มข้นมาตรฐานของไวรัส NPV หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนคืบกะหล่ำ อยู่ที่ $1x\ 10^9$ ผลึกต่อมิลลิลิตร และของหนอนเจาะสมอฝ้าย 2×10^9 ผลึกต่อมิลลิลิตร

5. การนำไปใช้ในไร่ ไวรัส NPV เมื่อปรับอัตราความเข้มข้นแล้ว ก่อนนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ควรนำไปทดสอบประสิทธิภาพไวรัสกับหนอนในห้องปฏิบัติการ เพื่อดูว่าประสิทธิภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน คือ อัตราที่ใช้สามารถทำให้หนอนทดลองในวัยที่ 3 ตายเกิน 80 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 7 วัน เมื่อเปอร์เซ็นต์หนอนตายผ่านเกณฑ์ที่กำหนดไว้จึงนำไปใช้ในไร่ต่อไป การใช้ในไร่ ไวรัส NPV สามารถนำไปใช้ผสมน้ำเช่นเดียวกับสารฆ่าแมลงทั่ว ๆ ไป และพ่นได้กับเครื่องพ่นสารทุกชนิด

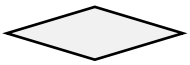

NPV Production Schematic
Adult mating
Oviposition
Neonate larvae reared on artificial diet
2nd instar larvae
3rd instar larvae 10% for stock
4th instar larvae
5th instar larvae
Pupae
Adults
Infection 3rd instar larvae by feeding artificial diet coated surface with NPV
Larvae died within 5-7 days
Collecting dead larvae, blending and sieving to discard the tissue
Dilution for standard concentration
Activity test by bioassay
Formulation (liquid and powder)
Bottling and Packaging
Pure NPV solution
Purifying
NPV suspension

5. ขั้นตอนการดำเนินงาน

5.1 ผังกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอย

จุดเริ่มต้น/สิ้นสุด

ขั้นตอน/กิจกรรม


จุดตัดสินใจ

การเชื่อมต่อ

ทิศทางการไหล

ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต		Y		
3.1 เตรียมต้นเชื้อ/พ่อแม่พันธุ์				
3.2 เลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ				
3.3 เก็บผลผลิต				
3.4 ตรวจสอบคุณภาพ		N		
3.5 บรรจุหีบห่อ	Y			
4. จำหน่าย จ่ายแจก (การนำไปใช้ประโยชน์)				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตไส้เดือนฝอย

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการเกษตร	การจัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการเกษตรในปีงบประมาณนั้น ๆ	ผลิตให้ตรงตามแผน และงบประมาณที่ได้รับ	แผนการผลิตงบประมาณ
2. พิจารณาแผนการผลิต	พิจารณาจัดสรร/ปรับงบประมาณ ให้แต่ละปัจจัยการผลิต		
3. กระบวนการผลิต ปัจจัยการผลิต			
3.1 เตรียมต้นเชื้อ/พ่อแม่พันธุ์	จัดเตรียม จัดหา ต้นเชื้อ/พ่อแม่พันธุ์ที่มีความแข็งแรง สม่ำเสมอ เหมาะสมในการเป็นพ่อแม่พันธุ์		
3.2 เลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ	เพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ปัจจัยการผลิตให้ได้ปริมาณมาก		
3.3 เก็บผลผลิต	เก็บผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ		
3.4 ตรวจสอบคุณภาพ	ตรวจสอบคุณภาพของปัจจัยการผลิต		ปัจจัยการผลิตที่มีคุณภาพ ไม่น้อยกว่า 80%
3.5 บรรจุหีบห่อ	นำผลผลิตที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพมาทำการบรรจุหีบห่อ		ตรงตามจำนวนที่วางแผนการผลิต
4. จำหน่าย จ่ายแจก การนำไปใช้ประโยชน์	เกษตรกร หน่วยงานราชการ เอกชน และประชาชนผู้สนใจ		ตรงตามจำนวนที่วางแผนการใช้ประโยชน์

6. เอกสารและแบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง

การผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง

ชื่อผลิตภัณฑ์ ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผง

คุณสมบัติ ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก ตัวอ่อนด้วงหมัด ผัก หนอนชอนผิวเปลือกลองกอง ด้วงงวงมันเทศ

ปริมาณบรรจุ 50 ล้านตัว/กระป๋อง

การนำไปใช้ ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมี

รายละเอียด 1. เป็นชีวภัณฑ์ที่เก็บในรูปผงดิน บรรจุในกระป๋องพลาสติก

2. เก็บรักษาในตู้เย็น (ห้ามแช่แข็ง)

3. ชีวภัณฑ์มีอายุ 6 เดือน หลังจากวันผลิต

ราคาต่อหน่วย (กระป๋อง) : 200 บาท

ขั้นตอนการผลิต

1. เตรียมต้นเชื้อ inoculum

ทำการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย โดยหยดไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงบนกระดาษฟางแล้วปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 5 เก็บที่อุณภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยในหนอนกินรังผึ้งที่ตาย จนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง

2. เตรียมอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย

เตรียมเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย (inoculum bacteria) ของ *Steinernema carpocapsae* โดยแยกได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย ลงบนอาหาร NBTA เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือก colony ที่สมบูรณ์ ลงเลี้ยงในอาหาร Ys broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28° เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผสมแบคทีเรียที่ได้ในอาหารเหลวที่ ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. กระบวนการเลี้ยง

ใส่ไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ เลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเขย่าตลอดเวลา เป็นเวลา 14 วัน จนไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 100%

4. Harvest yield

จึงทำการแยกล้างไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ จากอาหารให้สะอาด โดยการกรอง และตกตะกอน 3 – 4 ครั้ง จนได้ไส้เดือนฝอยที่สะอาด

5. Quality control

ตรวจสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในแต่ละชุด โดยการทดสอบกับหนอนกินรังผึ้ง ในอัตราไส้เดือนฝอย 1 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้งวัย 4 - 5 จำนวน 1 ตัว ที่ 48 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนต้องไม่ต่ำกว่า 40% ผลิตภัณฑ์นั้นจึงจะถือว่าได้มาตรฐานมีคุณภาพที่จะนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้

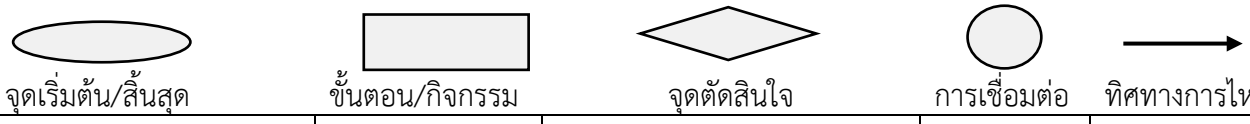
6. Fomulation

ตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอย ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพแล้ว บรรจุเป็นชีวภัณฑ์อัตรา 50 ล้านตัว

รายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติงานการผลิตไส้เดือนฝอยสูตรผง

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. เตรียมต้นเชื้อ inoculum	เพาะไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้งซึ่งเป็นแมลงอาศัยของไส้เดือนฝอย จนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่แข็งแรง		
2. เตรียมอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย	เตรียมเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียของ *Steinernema carpocapsae* โดยแยกได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย ลงบนอาหาร NBTA เมื่อครบ 48 ชั่วโมงคัดเลือก colony ที่สมบูรณ์นำลงเลี้ยงในอาหาร ys broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28° เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผสมแบคทีเรียที่ได้ในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง		
3. กระบวนการเลี้ยง	เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ เลี้ยงในห้องอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน	ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง	ได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง 100%
4. Harvest yield	จึงทำการแยกล้างไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้จากอาหารให้สะอาด โดยการกรอง และตกตะกอน		
5. Quality control	ตรวจสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ ในแต่ละชุดโดยการทดสอบกับหนอนกินรังผึ้งในอัตราไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหนอนกินรังผึ้งวัย 4-5 จำนวน 1 ตัว ที่ 48 ชั่วโมง	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนต้องไม่ต่ำกว่า 40% ผลิตภัณฑ์นั้นจึงจะถือว่าได้มาตรฐานมีคุณภาพที่จะนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้	จำนวนครั้งของการผลิตที่ได้ไส้เดือนฝอยที่มีมาตรฐานไม่น้อยกว่า 90%
7. Fomulation	ตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอย ที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพแล้ว ผสมในดินผงอบแห้งฆ่าเชื้อ แล้วบรรจุในกระป๋อง โดยบรรจุในอัตรา 50 ล้านตัว ติดฉลาก	ได้ไส้เดือนฝอยปริมาณ 50 ล้านตัว ทุกกระป๋อง	จำนวนกระป๋องที่มีไส้เดือนระยะเข้าทำลายแมลงไส้เดือนฝอยปริมาณ 50 ล้านตัวต่อกระป๋อง 100%
8. จำหน่ายจ่ายแจก	ติดต่อหน่วยงานและนักวิจัยโดยตรง		

5.1 ผังกระบวนการผลิตหัวเชื้อไส้เดือนฝอย



ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต				- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตหัวเชื้อไส้เดือนฝอย				
3.1 เตรียมแมลงอาศัยระยะตัวหนอน				
3.2 เลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย				
3.3 เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอย				
3.4 ตรวจสอบคุณภาพ				
3.5 บรรจุหีบห่อ				
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตหัวเชื้อไส้เดือนฝอย

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. การจัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของหัวเชื้อไส้เดือนฝอย	จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของหัวเชื้อไส้เดือนฝอย	ผลิตให้ตรงตามแผนและงบประมาณที่ได้รับ	แผนการผลิต งบประมาณ
2. การพิจารณาแผนการผลิต	พิจารณาจัดสรร/ปรับงบประมาณ	ตามความต้องการของผู้ใช้ประโยชน์	งบประมาณ
3. กระบวนการผลิตหัวเชื้อไส้เดือนฝอย			ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยตามแผนการผลิต มีศักยภาพในการฆ่าแมลงไม่น้อยกว่า 80% และมีปริมาณตรงตามที่ระบุต่อหน่วย (1 ล้านตัว/ซอง)
3.1 การเตรียมแมลงอาศัยระยะตัวหนอน	- นำแมลงเพศผู้-เมียของหนอนกินไขผึ้งผสมพันธุ์และตัวเมียวางไข่บนกระดาษ - นำไข่แมลงไปเลี้ยงในอาหารเทียมได้เป็นตัวหนอนจนถึงระยะก่อนเข้าดักแด้		
3.2 การเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย	- นำไส้เดือนฝอยปลูกเชื้อในตัวหนอนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง หนอนตาย - นำหนอนตายวางในจานหล่อน้ำเป็นเวลา 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยในน้ำใส		
3.3 การเก็บผลผลิตไส้เดือนฝอย	- เก็บรวบรวมผลผลิตไส้เดือนฝอยในภาชนะ		
3.4 การตรวจสอบคุณภาพ	- นำไส้เดือนฝอยตรวจสอบคุณภาพ (QC) โดยใช้วิธีทดสอบที่อัตราหัวเชื้อไส้เดือนฝอย 10 ตัว :หนอนทดสอบ 1 ตัว ในถาดหลุม 24 ช่อง (culture cell well) ตรวจนับการตายของหนอนที่ 80 % ในเวลา 48 ชม.		
3.5 การบรรจุผลิตภัณฑ์	- นำไส้เดือนฝอยฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อและน้ำกลั่น - ตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยใต้กล้องจุลทรรศน์ - บรรจุเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ล้านตัว/ซอง ในสารโพลิเมอร์ให้ความชื้น		
4. การจำหน่าย จ่ายแจกเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์	- เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใช้เอง - ภาคเอกชนที่ผลิตไส้เดือนฝอยจำหน่ายเป็นการค้า - หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ สวพ.1 สวพ.5 และโครงการฟาร์มตัวอย่าง จ.สกลนคร - หน่วยงานอื่น ๆ ได้แก่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรมส่งเสริมการเกษตร และโครงการหลวงฯ - ประชาชนและผู้สนใจ (ใช้กำจัดปลวกในอาคารสิ่งปลูกสร้าง กำจัดแมลงในสนามกลอฟท์)	การนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง	ตรงตามจำนวนที่วางแผนการใช้ประโยชน์

หัวเชื้อไส้เดือนฝอย

ชื่อผลิตพันธุ์ : หัวเชื้อไส้เดือนฝอย

ปริมาณการผลิต : 5,000 ซอง/ปี

คุณสมบัติ : 1. ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate)

2. มีความทนทานอุณหภูมิได้สูง 30-35° ซ

3. มีศักยภาพในการกำจัดแมลงได้หลายชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนด้วงหมัดผัก หนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง ปลวก และแมลงสาบ

ปริมาณบรรจุ : 1 ล้านตัว/ซอง

การนำไปใช้ : ใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวตามกระบวนการผลิตอย่างง่ายที่ถ่ายทอดโดยกรมวิชาการเกษตร สามารถเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยได้เท่ากับ 300-500 ล้านตัว นำไปใช้ฉีดพ่นกำจัดแมลงในพื้นที่ 0.5-1 ไร่

รายละเอียดอื่น ๆ :

1. เป็นชีวภัณฑ์เก็บในรูปของสารโพลิเมอร์ชนิดสีใส บรรจุในถุงพลาสติกรูปทรงสามเหลี่ยม

2. ชีวภัณฑ์เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิห้อง (25-30° ซ) **ห้ามแช่เย็น**

3. ชีวภัณฑ์มีอายุ 3 เดือน หลังจากวันผลิต

ราคาต่อหน่วย (ซอง) : 40 บาท

กระบวนการผลิต :

1. เตรียมหนอนกินไขผึ้ง {Wax month (Galleria mellonella L.)} ระยะตัวเต็มวัย

โดยนำรังผึ้งเก่าจากธรรมชาติที่มีหนอนกินไขผึ้งอยู่ภายในมาใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 13x17x7 เซนติเมตร เมื่อตัวหนอนเข้าดักแด้และเจริญเป็นผีเสื้อตัวเต็มวัย ทำการจับคู่ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 13x17x7 เซนติเมตร จำนวน 5 กล่อง ที่มีฝาปิดกล่องละ 10 คู่ โดยวางกระดาษสีขาวภายในกล่องและบริเวณขอบกล่อง เป็นเวลา 1 วัน เมื่อแม่ผีเสื้อวางไข่บนกระดาษ นับจำนวนไข่บนกระดาษต่อกล่องภายใต้จุลทรรศน์ จากนั้นนำไข่บนกระดาษจำนวน 1,000 ฟองใส่ในอาหารเทียมสูตรดัดแปลง (ส่วนประกอบของข้าวบด 500 กรัม ถั่วเขียวบด 400 กรัม แป้งข้าวโพด 400 กรัม นมผง 300กรัม ซีรีแล็ค 250 กรัม น้ำผึ้ง 150 มิลลิลิตร วิตามินรวม 60 มิลลิลิตร กลีเซอรีน 100 มิลลิลิตร รังผึ้ง 200 กรัม และน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในกล่องพลาสติกขนาด 32.5 x 17.6 x 10 เซนติเมตร มีฝาครอบเป็นลวดตาข่ายให้อากาศถ่ายเท จำนวน 4 กล่อง ตั้งวางที่อุณหภูมิ 25-28° ซ ไข่ฟักเป็นตัวหนอนในเวลา 15 วัน หลังจากนั้นหนอนเจริญเติบโตตามลำดับ โดยมีการเปลี่ยนถ่ายและให้ อาหารตลอดการเจริญเติบโต เป็นเวลาประมาณ 14 วัน และได้หนอนวัยสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ (late instar larvae) ซึ่งเป็นวัยที่ใช้ในการขยายปริมาณไส้เดือนฝอย

2. การผลิตหัวเชื้อไส้เดือนฝอย

2.1 ใช้จานเพาะเลี้ยงชนิดพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. วางกระดาษฟางในจานเพาะเลี้ยงและใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 $\pm$ 100 ตัว ที่อยู่ในน้ำ 1 มล. หยดลงไปบนกระดาษ จากนั้นนำหนอนที่เลี้ยงได้จากข้อ 1 ใส่ลงไป 20 ตัว/จาน ตั้งวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชม.

2.2 นำตัวหนอนที่ตาย วางในจานเฉพาะในกล่องพลาสติก ขนาด 5 x 7 นิ้ว ที่มีน้ำหล่อไว้เล็กน้อย ปิดฝากล่องพลาสติก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 วัน หลังจากนั้นตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยระยะที่ 3 หรือเป็น

ระยะที่ต้องการจะเคลื่อนที่มาอยู่ในน้ำหล่อไว้ เทน้ำที่มีไส้เดือนฝอยเก็บไว้ในขวดพลาสติกชนิด culture flask ตั้งวางในแนวนอนเพื่อไม่ให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนและทับถมกันตาย

2.3 หล่อน้ำใหม่ในกล่องพลาสติก เพื่อเก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยได้อีก 3-4 ครั้ง

2.4 นำไส้เดือนฝอยที่ได้ในแต่ละชุดมาตรวจสอบคุณภาพ (QC) โดยใช้วิธีทดสอบที่อัตราหัวเชื้อไส้เดือนฝอย 10 ตัว : หนอนทดสอบ 1 ตัว ในถาดหลุม 24 ช่อง (culture cell well) ตรวจนับการตายของหนอนทดสอบที่ 48 ชม. ตาย 80% ผ่าน QC

3. การบรรจุผลิตพันธุ์เพื่อการจำหน่าย/จ่ายแจก

นำหัวเชื้อไส้เดือนฝอยที่ได้ ผ่านกระบวนการทำความสะอาดโดยการฆ่าเชื้อด้วยสารฆ่าเชื้อ (0.1 Hyamine) เป็นเวลา 15 นาที และผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง จากนั้นทำการตรวจนับปริมาณหัวเชื้อไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำมาบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์ 1 ล้านตัว/ซอง ในสารโพลิเมอร์ ให้ความชื้นเพื่อการจำหน่าย/จ่ายแจก

ผู้ใช้ประโยชน์หัวเชื้อไส้เดือนฝอย :

1. เกษตรกรผู้ผ่านการอบรมฯ การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใช้เอง
2. ภาคเอกชน 1 ราย ที่ผลิตไส้เดือนฝอยจำหน่ายเป็นการค้า
3. หน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร ได้แก่ สวพ.1 สวพ.5 และโครงการฟาร์มตัวอย่าง จ.สกลนคร
4. หน่วยงานอื่น ๆ ได้แก่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรมส่งเสริมการเกษตร และโครงการหลวงฯ
5. ประชาชนและผู้สนใจ (ใช้กำจัดปลวกในอาคารสิ่งปลูกสร้าง กำจัดแมลงในสนามกลอฟท์)

5.1 ผังกระบวนการผลิตแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา

จุดเริ่มต้น/สิ้นสุด	ขั้นตอน/กิจกรรม	จุดตัดสินใจ	การเชื่อมต่อ	ทิศทางการไหล

ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต		Y		
3.1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์แตนเบียนไตรโคแกรมมา				
3.2 เลี้ยงขยายผีเสื้อข้าวสาร				
3.3 ผลิตขยายแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา				
3.4 ทดสอบคุณภาพ		N		
3.5 ล้างทำความสะอาด	Y			
3.6 บรรจุหีบห่อ				
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต			
2. การพิจารณาแผนการผลิต			
3. กระบวนการผลิตผีเสื้อข้าวสาร	3.1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์ 3.2 เลี้ยงขยายผีเสื้อข้าวสาร - ทดสอบอัตราการฟักไข่ - เตรียมอาหาร - ดูดผีเสื้อข้าวสาร - รวบรวมไข่ผีเสื้อข้าวสาร		
4. ผลิตขยายแตนเบียนไข่	- โรยไข่และทำลายเฟรม - เก็บเกี่ยวและบรรจุ		
5. ทดสอบคุณภาพ	- ล้างทำความสะอาดและนำไปทดสอบประสิทธิภาพการเบียนของแตนเบียนไข่ในห้องปฏิบัติการ		
6. บรรจุหีบห่อ			
7. จำหน่ายและนำไปใช้ประโยชน์	ติดต่อหน่วยงานและนักวิจัยโดยตรง		

6. เอกสารและแบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา

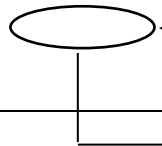
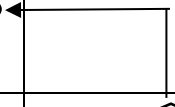
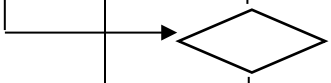
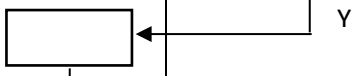
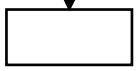
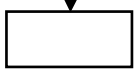
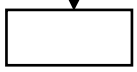
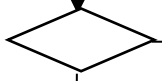
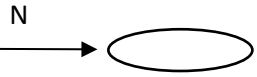
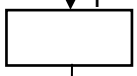
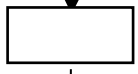
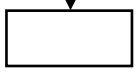
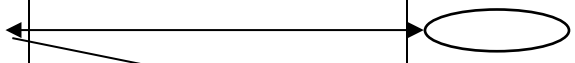
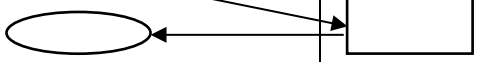
ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต	- วางแผนการใช้โดยดูจากช่วงเวลาที่จะพบแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย	- วางแผนการผลิตก่อนนำไปใช้ประโยชน์ 8-10 สัปดาห์ เพื่อเพิ่มปริมาณการเตรียมอาหารและเลี้ยงหนอนผีเสื้อข้าวสาร	
2. การพิจารณาแผนการผลิต			ได้แผนการผลิต
3. กระบวนการผลิต			ได้แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา
3.1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์แตนเบียน	นำแผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารที่มีดักแด้ของแตนเบียนอยู่ภายในออกจากตู้เย็น ก่อนวันผลิต 1 วัน จำนวน 13-15 แผ่น ต่อ 1 เฟรม	- ได้พ่อแม่พันธุ์จับคู่ผสมพันธุ์กัน	ได้พ่อแม่พันธุ์
3.2 เลี้ยงขยายผีเสื้อข้าวสาร			ได้ไข่ผีเสื้อข้าวสารใหม่
- ทดสอบอัตราการฟักไข่	เขี่ยไข่ผีเสื้อข้าวสารที่จะทดสอบ ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก หลอดละ 1 ฟอง อุดจุกด้วยสำลี ทิ้งไว้จนไข่ฟักตรวจนับจำนวนหนอนที่ฟักออกมาหาอัตราการฟักไข่		ไข่มีอัตราการฟักมากกว่า 80%
- เตรียมอาหาร	- เตรียมรำข้าวละเอียด 60 กิโลกรัม ปลายข้าว 3 กิโลกรัม และน้ำตาลทราย 1 กิโลกรัม ผสมให้เข้ากัน - แบ่งใส่ถาดอลูมิเนียม นำมาอบในตู้อุณหภูมิ 70° เซลเซียส ระยะเวลา 7 ชั่วโมง เพื่อฆ่าแมลงต่าง ๆ ที่ติดมากับรำข้าว แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น - นำมาชั่งใส่ในกล่องพลาสติก กล่องละ 1 กิโลกรัม โดยเกลี่ยรำข้าวให้ผิวหน้าสม่ำเสมอกัน - โรยไข่ของผีเสื้อข้าวสารกล่องละ 0.1 กรัม (ประมาณ 2,000 ฟอง) ให้ทั่ว ปิดฝาครอบนำไปใส่ในชั้นในห้องเลี้ยงแมลง	- มีความหนาจากพื้นไม่เกิน 4-5 ซม. - มีความหนาจากพื้นไม่เกิน 3 ซม. - ในห้องเลี้ยงควรควบคุมอุณภูมิที่ 26-30° เซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-80%	
- ดูดผีเสื้อ	- ใช้เครื่องดูดตัวผีเสื้อเก็บใส่ในตะกร้าพลาสติกบุด้วยตาข่ายไนลอน ปิดฝาด้วยถุงตาข่ายไนลอนรัดด้วยยางยืด นำไปวางเรียงบนชั้นในห้องมืด ด้านล่างวางถาดอะลูมิเนียมไว้รองรับไข่ผีเสื้อข้าวสารที่ร่วงหล่น		ได้ผีเสื้อข้าวสารที่สามารถผลิตไข่

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
	มา เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แปรงไข่ออกด้วยแปรงลงในถาดอะลูมิเนียม		
- รวบรวมไข่ผีเสื้อข้าวสาร	- นำไข่ที่ได้มา ร่อนด้วยตะแกรงลวด เพื่อทำความสะอาดให้เหลือแต่ไข่ผีเสื้อ เอาเศษอวัยวะ และเกล็ดของผีเสื้อออก นำมาชั่งน้ำหนัก แบ่งไข่ 20% ไว้สำหรับการเลี้ยงขยายผีเสื้อข้าวสารต่อไป ส่วนไข่อีก 80% นำมาใช้ในการขยายแตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมา หรือเก็บไว้เป็น stock โดยใส่ไว้ในตู้เย็นที่มีอุณภูมิ 10-13° เซลเซียส		ได้ไข่ผีเสื้อข้าวสารใหม่
3.3 ผลิตขยายแตนเบียนไข่			ได้แผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารที่มีดักแด้แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมามาอยู่ภายใน พร้อมนำไปปล่อยในแปลง โดยจะออกเป็นตัวเต็มวัยในวันถัดไปหลังจากเอาออกจากตู้เย็น
- โรยไข่และทำเฟรมผลิตขยาย	- นำกระดาษมาขีดตารางเป็นช่องขนาด 1x 1.5 นิ้ว กระดาษ 1 แผ่น จะได้ 42 ช่อง (6x7 ช่อง) ทากาวน้ำให้ทั่วจากนั้นนำไข่ของผีเสื้อข้าวสารใส่ในตะแกรงโรยลงบนกระดาษให้ทั่วและสม่ำเสมอ (1 ช่อง จะมีไข่ประมาณ 2,000 ฟอง) - นำแผ่นไข่ไปผ่านแสง ultraviolet นาน 15 นาที เพื่อไม่ให้ไข่ฟักเป็นตัวหนอนได้ - นำแผ่นไข่ที่ได้มาขยายแตนเบียนไข่ *Trichogramma* spp. โดยนำเฟรมไม้มาทากาวที่บริเวณขอบ ติดเฟรมด้วยแผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสาร ใช้สำลีชุบน้ำผึ้ง 70% ใส่ไว้เพื่อเป็นอาหารของพ่อแม่พันธุ์ - นำพ่อแม่พันธุ์ที่เตรียมไว้มาใส่ในเฟรมดังกล่าวแล้ว นำแผ่นไข่ผีเสื้อข้าวสารปิดทับอีกด้าน บันทึกชนิดของแตนเบียนและวันที่ที่ผลิตและวันที่ที่จะทำการตัดเฟรมเพื่อเก็บเกี่ยวแตนเบียนไข่ (วันที่ 6 นับตั้งแต่วันที่เริ่ม - นำเฟรมไม้ไปตั้งไว้ที่มีแสงสว่างส่องถึง และพลิกเข้าหาแสงทุก 6 ชั่วโมง	ไข่ผีเสื้ออายุไม่เกิน 1-2 วัน	ได้เฟรมให้แตนเบียนขยายพันธุ์
- เก็บเกี่ยวและเก็บรักษา	- เมื่อครบกำหนด 6 วัน นำเฟรมขยายแตนเบียนไข่มากรีดกระดาษออก ตัดแบ่งเป็นช่อง ๆ เพื่อเก็บไว้นำไปใช้ประโยชน์	- ไข่ผีเสื้อข้าวสารที่ถูกเบียนจะเป็นสีดำ	ได้แตนเบียนไข่ไตรโคแกรมมาที่มีคุณภาพ

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
	- นำแผ่นดักแด้แตนเบียนไข่ เก็บไว้ในกล่องพลาสติก เก็บเข้าตู้เย็นหรือตู้ควบคุมอุณหภูมิ	ภายในมีดักแด้ของแตนเบียนไข่ - ที่อุณหภูมิ ประมาณ 10-13^{o} เซลเซียส จะชะลอการออกเป็นแตนเบียนได้ 2 สัปดาห์	
3.4 ทดสอบคุณภาพ	- ตัดแผ่นดักแด้เป็นชิ้นเล็กให้มีไข่ประมาณ 100 ฟอง ใส่หลอดทดลองแต่ละหลอด จำนวน 4 หลอด ปิดหลอดด้วยผ้าขาวบาง ทิ้งไว้ให้ออกเป็นตัวเต็มวัย - นับจำนวนไข่ทั้งหมด ไข่ที่ถูกเบียน จำนวนแตนทั้งหมด และจำนวนแตนเพศเมีย	- อัตราการเบียนของไข่มากกว่า 80% - อัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยของแตนเบียนอยู่ที่ ระดับ 80-90% และเพศเมียอย่างน้อย 50%	ได้แตนเบียนที่มีคุณภาพดี
3.5 ล้างทำความสะอาด	- เก็บรวบรวมรำข้าวที่ใช้แล้ว นำไปทิ้ง - ล้างทำความสะอาด อุปกรณ์ที่ใช้ เช่น กล่องพลาสติก หลอดทดลองตะกร้าผีเสื้อ เป็นต้น		ได้อุปกรณ์ที่สะอาดพร้อมใช้
4. บรรจุหีบห่อ	- แบ่งใส่ในถุงพลาสติกเย็บด้วยลวดเย็บกระดาษ		ได้แตนเบียนไข่พร้อมนำไปปล่อย
5. จำหน่ายและนำไปใช้ประโยชน์	- แจกจ่ายให้เกษตรกร หรือหน่วยงานที่ขอ นำไปปล่อยควบคุมหนอนกออ้อย และหนอนหัวดำ	- นำไปปล่อยในแปลงอ้อย หากใกล้ครบกำหนด 2 สัปดาห์	ได้ปล่อยแตนเบียนไข่ในแปลงที่มีการระบาดของแมลงศัตรู

5.1 ผังกระบวนการผลิตตาส้มปลอดโรค

จุดเริ่มต้น/สิ้นสุด	ขั้นตอน/กิจกรรม	จุดตัดสินใจ	การเชื่อมต่อ	ทิศทางการไหล

ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต				- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตตาพันธุ์ส้มปลอดโรค				
3.1 การขยายพันธุ์แม่พันธุ์รอง				
3.2 การดูแลรักษา				
3.3 การตรวจสอบโรค				
3.4 การตัดตาส้มปลอดโรคเพื่อจำหน่าย/จ่ายแจก				
3.5 ตัดแต่งกิ่งแม่พันธุ์				
3.6 ผลิตเมล็ดพันธุ์จำหน่าย				
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผลการผลิต/การใช้ประโยชน์				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตตาส้มปลอดโรค

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
3. กระบวนการผลิตตาส้มปลอดโรค		ผลิตได้ตรงตามแผนและงบประมาณที่ได้รับ	
3.1 การขยายแม่พันธุ์รอง	โดยขยายจากแม่พันธุ์หลัก S-O รวม 10 โรงเรือน ประกอบด้วยพันธุ์การค้าต่าง ๆ เช่น ส้มเขียวหวาน โชกุน ส้มโอ มะนาว โดยการติดตาบนต้นตอส้มพันธุ์ต่าง ๆ		
3.2 การดูแลรักษา	- รดน้ำทุกวัน - ฉีดยากำจัดศัตรูพืชและให้ปุ๋ยทางใบทุก 7 วัน - ตรวจสภาพโรงเรือนพร้อมทำความสะอาดรอบโรงเรือน - ผสมวัสดุปลูกตามสูตร IPM (ไทย-เยอรมัน) สำหรับปลูกส้มและเติมกระถางที่ยุบทุก 15 วัน - เพาะและย้ายกล้าส้ม ทุก 7 วัน เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ทดแทนต้นที่ตายและใช้สำหรับทดสอบโรค - ตัดแต่งกิ่งที่ไม่สมบูรณ์ทิ้ง ปกติ 1 กิ่ง จะเหลือไว้เพียง 3 ยอดเท่านั้นจึงจะได้ตามสมบูรณ์ - ซ่อมและเย็บมุ้งโรงเรือน อันเนื่องมาจากฝนและลมแรง		
3.3 การตรวจสอบโรค	- ตรวจสอบโรคกรีนนิ่ง และโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา ทางอณูชีววิทยา และการให้พืชทดสอบ โดยสุ่ม 10% ของต้นทั้งหมด ทุก 6 เดือน		
3.4 การตัดตาส้มปลอดโรคเพื่อจำหน่าย/จ่ายแจก	โดยเลือกตัดเฉพาะตาจากกิ่งที่ค่อนข้างกลมและสมบูรณ์แล้วฆ่าเชื้อด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 1% และบรรจุถุงอย่างดีและสะอาดเพื่อป้องกันเชื้อราเกิดขึ้น		
3.5 การตัดแต่งกิ่งแม่พันธุ์หลังจากตัดตาส้มปลอดโรคแล้ว	ทำการตัดแต่งกิ่งให้เหลือเฉพาะกิ่งที่สมบูรณ์เพื่อผลิตตาพันธุ์ชุดใหม่ต่อไป		
3.6 การผลิตเมล็ดพันธุ์ ทำการปลูกต้นตอชนิดต่าง ๆ	รวม 16 สายพันธุ์ ในพื้นที่ 2.5 ไร่ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย เพื่อนำเมล็ดมาเป็นต้นตอขยายพันธุ์และเป็นพืชทดสอบ		

การผลิตตาส้มปลอดโรค

ชื่อผลิตภัณฑ์ : ตาส้มปลอดโรค

ปริมาณการผลิต : 30,000 ตา/ปี

คุณสมบัติ : 1. คือต้นส้มหรือพันธุ์ส้มที่ปราศจากเชื้อโรคทั้งภายในและภายนอกในเนื้อเยื่อส้ม เช่น โรคแคงเกอร์, โรครากเน่าโคนเน่า, โรคทริสเตซ่า, โรคกรีนนิ่ง ฯลฯ

2. เป็นการผลิตจากเทคนิควิชาการทางด้านเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและวิชาการด้านโรคพืชโดยวิธีการใช้ความร้อน (Heat Therapy) ควบคู่กับการติดตาต้นอ่อน (Shoot tip Grafting)

การนำไปใช้ : 1. เป็นแม่พันธุ์ส้มปลอดโรค สำหรับขยายตาพันธุ์เพื่อสนับสนุนภาครัฐ, เอกชน และเกษตรกรที่ขยายพันธุ์ส้มปลอดโรค

2. ใช้เป็นแม่พันธุ์ที่เนอรสเซอรี่ส้ม ทำการขยายพันธุ์เอง เพื่อผลิตตาพันธุ์ให้พอใช้ในธุรกิจการผลิตพันธุ์ส้มปลอดโรคเป็นการค้า

ราคาต่อหน่วย (ตา) : 7 บาท

กระบวนการผลิต :

1. การรักษาแม่พันธุ์หลักส้มปลอดโรค S-O (Original mother or nuclear stocks) จำนวน 5 โรงเรือน

1.1 รดน้ำทุกวัน

1.2 พ่นยาป้องกันกำจัดแมลงและโรคทุก 7 วัน

1.3 ใส่ปุ๋ยบำรุงต้นทุก 30 วัน

1.4 ตรวจความปลอดโรค โรคแคงเกอร์, โรครากเน่าโคนเน่า, โรคทริสเตซ่า, โรคกรีนนิ่ง ทุก 6 เดือน โดย ELISA และ PCR

1.5 นำตาพันธุ์ส้มขยายต่อไป

1.6 เปลี่ยนต้นแม่พันธุ์หลักทุก 4-5 ปี

2. การรักษาแม่พันธุ์รองส้มปลอดโรค S-1 (Certified mother tree block) จำนวน 10 โรงเรือน

2.1 รดน้ำทุกวัน

2.2 พ่นยาป้องกันกำจัดแมลงและโรคทุก 7 วัน

2.3 ใส่ปุ๋ยทางใบทุก 7 วัน

2.4 ใส่ปุ๋ยบำรุงต้นทุก 30 วัน

2.5 ตัดแต่งกิ่งทุก 3 เดือน

2.6 ตรวจความปลอดโรค โรคแคงเกอร์, โรครากเน่าโคนเน่า, โรคทริสเตซ่า, โรคกรีนนิ่ง ทุก 6 เดือน โดย ELISA และ PCR

2.7 ขยายตาพันธุ์ส้มปลอดโรค

2.8 เพาะและย้ายต้นตอ

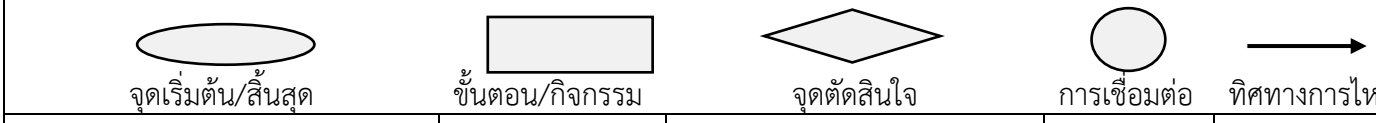
2.9 ติดตาส้มปลอดโรคบนต้นตอ อายุ 3 เดือน เพื่อขยายตา

2.10 สามารถผลิตตาพันธุ์ส้มการต่าง ๆ เช่น ส้มเขียวหวาน โชกุน ส้มโอ ฯลฯ รวมประมาณ 60,000 ตา/ปี

ผู้ใช้ประโยชน์ตาส้มปลอดโรค

1. เกษตรกรผู้ปลูกสวนส้ม
2. บริษัทเอกชนที่ต้องการผลิตต้นส้มปลอดโรคเป็นการค้า
3. นักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

5.1 ผังกระบวนการผลิตชุดตรวจสอบ



ขั้นตอน	นวก. ผู้รับผิดชอบ	คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต	สบ./ฝบ.	เอกสารอ้างอิง
1. จัดทำแผนการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตชุดตรวจสอบ		Y		
3.1 การสกัดโปรตีนจากเชื้อไวรัส/แบคทีเรีย สกัดจากเชื้อบริสุทธิ์				
3.2 เตรียมแอนติเจน (อิมูลโนโกลบูลินจี) และเตรียมสารละลาย				
4. จัดทำชุดตรวจสอบขนาดพกพา				
5. ทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบ		N		
6. จำหน่ายจ่ายแจก (การนำไปใช้ประโยชน์)	Y			พป.56
7. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตชุดตรวจสอบ

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการดำเนินงานผลิตชุดตรวจสอบ	**ขั้นตอนการทำ GLIFT kit** 1. สกัด lgG ปรับเป็น 1 mg / ml 2. Colliodol gold 5 ml + lgG 50 µl (กวน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง) 3. เติม BSA 10% 500 µl (กวนต่ออีก 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง) 4. ตกตะกอนที่ 9,000 rpm / 40 นาที หรือ 12,000 rpm / 15 นาที ดูดน้ำใสออก 5. ละลายตะกอนด้วย Buffer-gold conjugate pH 7.4 ประมาณ 150 µl 6. วัด Spectrophotometer ที่ OD540 =0.49-0.50 7. เติม Sucrose 20% = 0.03 g เติม trehalose 0.1% = 0.0025 g 8. lining บนแผ่นใยแก้ว แล้วอบที่ 37°C นาน 2 ชม. 9. ทำ Test line + Control line บน membrane แต่ละเส้นห่างกัน 0.5 ซม. แล้วอบพร้อมกันที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง 10. ประกอบชุดตรวจ test และทดสอบคุณภาพ **วิธีการใช้ GLIFT kit ตรวจไวรัสบนกล้วยไม้** 1. เขียนชื่อของตัวอย่างพืชลงบนตลับ GLIFT kit ไวรัส 2 ชนิดที่ตรวจได้บนตลับเดียวกัน คือ CyMV และ ORSV บดตัวอย่างใบกล้วย ขนาด 2x2 เซนติเมตร ในถุงพลาสติก กับสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมน้ำคั้นพืช (ใช้หลอดพลาสติกดูดสารละลายบัฟเฟอร์) 2. ใช้หลอดดูดน้ำคั้นพืช หยอดลงหลุมของ GLIFT 3 หยด ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาใน 3-5 นาที 3. ตรวจผลของปฏิกิริยา ภายหลังการเกิดปฏิกิริยาโดย เส้นบนสุดเป็น Control line ต้องเกิดทุกครั้ง เป็นการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา เส้นที่ 2 เกิดสีแดงเมื่อ ตัวอย่างกล้วยไม้มีเชื้อ CyMV เส้นที่ 3 เกิดสีแดงเมื่อ ตัวอย่างกล้วยไม้มีเชื้อ ORSV		

ชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ (GLIFT kit)

ชื่อผลิตภัณฑ์ : ชุดตรวจไวรัสกล้วยไม้อย่างรวดเร็ว (GLIFT kit)

คุณสมบัติ : 1. ตรวจไวรัสได้ 2 ชนิดในตลับเดียวกัน (CyMV และ ORSV)

2. อ่านผลการตรวจได้ภายในเวลา 5 นาที

3. พกพาง่าย นำไปใช้ในแปลงปลูกกล้วยไม้ได้

4. ใช้ง่าย เกษตรกรสามารถใช้เองได้ ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลได้ง่าย

5. ราคาไม่แพง

ปริมาณบรรจุ : จำหน่ายเป็นตลับ สามารถบรรจุกล่องได้ตามความต้องการสั่งซื้อ 50 หรือ 100 ตลับ

การนำไปใช้ : 1. ใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกต้นพันธุ์กล้วยไม้ปลอดเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ก่อนนำไปขยายพันธุ์เพื่อผลิตกล้วยไม้ปลอดโรค

2. นำไปใช้ตรวจสอบกล้วยไม้เพื่อออกใบรับรองการส่งออก

3. ตรวจสอบต้นกล้วยไม้เพื่อควบคุมการระบาดของโรคและการเลือกซื้อต้นปลอดเชื้อ

รายละเอียดอื่น ๆ : 1. ชุดตรวจสอบไวรัสของกล้วยไม้ ต้องเก็บในที่แห้งและในอุณหภูมิ 20-25 °C

2. มีอายุการใช้งานได้ 1 ปี ตามรายละเอียดที่ระบุข้างซอง

3. ใช้ตรวจสอบได้เฉพาะชนิดของไวรัสที่ระบุข้างซอง

4. ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เฉพาะที่เตรียมมากับชุดตรวจ

กระบวนการผลิต :

ขั้นตอนที่ 1 การติดสลาก lgG ของ CyMV และ ORSV ด้วยอนุภาคทอง

นำ lgG ของ CyMV และ ORSV จำนวนอย่างละ 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย ที่เตรียมได้จำนวน 200 มิลลิลิตร มากวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10% จำนวน 200 ไมโครลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน lgG ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled lgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 นำไปพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) แยกกันในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C นาน 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 การทำเส้นตรวจสอบ (test line) และ เส้นควบคุม (control line)

โดยทำการพ่น lgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เป็น control line ใช้ lgG ของ CyMV และ ORSV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร และ 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ตามลำดับ ด้วยเครื่องมือพ่นสารละลายควบคุมปริมาณลงบนแผ่นเมมเบรน S&S AE 99 โดยเส้นทั้ง 3 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร เส้นทั้ง 3 เส้นถูกพ่นพร้อมกันและจัด

ให้อยู่กึ่งกลางของ NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น lgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบว่าการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบมีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ Goat-anti Rabbit (GAR) กับ lgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง

ขั้นตอนที่ 3 การประกอบ และทดสอบปฏิกิริยา GLIFT

มีขั้นตอนตามลำดับ คือ

3.1 วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น (Plastic Backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร

3.2 วางแผ่นใยแก้วพ่น lgG ของ CyMV และ ORSV ที่ติดสลากอนุภาคทอง ทั้ง 2 แผ่นซ้อนเกยกันเล็กน้อยทางช่องด้านล่างถัดลงมาจากเมมเบรน

3.3 วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้น (sample pad) เกยที่ปลายของแผ่น lgG ของ CyMV และ ORSV ที่ติดสลากอนุภาคทอง ลงไปจนถึงปลายของแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น

3.4 วางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (Wicking paper) เพื่อดูดซับของเหลวไว้ด้านบนของตลับ โดยพาดเกยจากปลายด้านบนของแผ่นเมมเบรนไปจนสุดปลายของแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น

3.5 ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วนี้ออกเป็นเส้นที่มีความกว้างของชุดเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก นำไปทดลองตรวจตัวอย่างกล้วยไม้เป็นโรค การเก็บชุดตรวจไว้ใช้ในระยะยาว ต้องเก็บในถุงอลูมินัมฟอยด์ ซีลปิดให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้น

ผู้ใช้ประโยชน์ชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ :

1. บริษัทผลิตกล้วยไม้ส่งออกต้นกล้วยไม้ไปต่างประเทศ
2. เกษตรกรผู้ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้จำหน่ายต้น
3. ฝ่ายวิทยาการกักกันพืชนำเข้าและออกใบรับรองเพื่อการส่งออก
4. นักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตชุดตรวจสอบ

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการดำเนินงานผลิตชุดตรวจสอบ	**ขั้นตอนการทำ GLIFT kit** 1. สกัด IgG ปรับเป็น 1 mg / ml 2. Colliodol gold 5 ml + IgG 50 µl (กวน 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง) 3. เติม BSA 10% 500 µl (กวนต่ออีก 1 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง) 4. ตกตะกอนที่ 9,000 rpm / 40 นาที หรือ 12,000 rpm / 15 นาที ดูดน้ำใสออก 5. ละลายตะกอนด้วย Buffer-gold conjugate pH 7.4 ประมาณ 150 µl 6. วัด Spectrophotometer ที่ OD540 =0.49-0.50 7. เติม Sucrose 20% = 0.03 g เติม trehalose 0.1% = 0.0025 g 8. lining บนแผ่นใยแก้ว แล้วอบที่ 37°C นาน 2 ชม. 9. ทำ Test line + Control line บน membrane แต่ละเส้นห่างกัน 0.5 ซม. แล้วอบพร้อมกันที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง 10. ประกอบชุดตรวจ test และทดสอบคุณภาพ **วิธีการใช้ GLIFT kit ตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา** 1. เขียนชื่อของตัวอย่างพืชลงบนตลับ GLIFT kit แบคทีเรีย สาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา บดตัวอย่างหัวมันฝรั่ง/ปทุมมา ขนาด 2x2 ซม. ในถุงพลาสติก กับสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมน้ำคั้นพืช (ใช้หลอดพลาสติกดูดสารละลายบัฟเฟอร์) 2. ใช้หลอดดูดน้ำคั้นพืช หยอดลงหลุมของ GLIFT 3 หยด ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาใน 3-5 นาที 3. ตรวจผลของปฏิกิริยา ภายหลังการเกิดปฏิกิริยา โดยเส้นบนสุดเป็น Control line ต้องเกิดทุกครั้ง เป็นการตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยา เส้นที่ 2 เกิดสีแดงเมื่อ ตัวอย่างหัวมันฝรั่ง/ปทุมมามีเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว เส้นที่ 3 เกิดสีแดงเมื่อ ตัวอย่างหัวมันฝรั่ง/ปทุมมา มีเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว		

ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวปทุมมา/มันฝรั่ง (GLIFT kit)

ชื่อผลิตภัณฑ์ : ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวปทุมมา/มันฝรั่ง (GLIFT kit)

คุณสมบัติ : 1. ตรวจเชื้อแบคทีเรีย สาเหตุโรคเหี่ยว

2. อ่านผลการตรวจได้ภายในเวลา 5 นาที

3. พกพาง่าย นำไปใช้ในแปลงปลูกมันฝรั่ง/ปทุมมาได้

4. ใช้ง่าย เกษตรกรสามารถใช้เองได้ ตรวจสอบและวิเคราะห์ผลได้ง่าย

5. ราคาไม่แพง

ปริมาณบรรจุ : จำหน่ายเป็นตลับ สามารถบรรจุกล่องได้ตามความต้องการสั่งซื้อ 50 หรือ 100 ตลับ

การนำไปใช้ : 1. ใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกหัวพันธุ์มันฝรั่ง/ปทุมมา ปลอดเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยว ก่อนนำไปขยายพันธุ์เพื่อผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง/ปทุมมาปลอดโรคเหี่ยว

2. นำไปใช้ตรวจสอบหัวพันธุ์มันฝรั่ง/ปทุมมา เพื่อออกใบรับรองการส่งออก

3. ตรวจสอบหัวพันธุ์มันฝรั่ง/ปทุมมา เพื่อควบคุมการระบาดของโรคและการเลือกซื้อต้นปลอดโรค

รายละเอียดอื่น ๆ : 1. ชุดตรวจสอบโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมาต้องเก็บในที่แห้งและในอุณหภูมิ 20-25°C

2. มีอายุการใช้งานได้ 1 ปี ตามรายละเอียดที่ระบุข้างซอง

3. ใช้ตรวจสอบได้เฉพาะชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวที่ระบุข้างซอง

4. ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เฉพาะที่เตรียมมากับชุดตรวจ

กระบวนการผลิต :

ขั้นตอนที่ 1 การติดสลาก lgG ของ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา

นำ lgG ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา จำนวนอย่างละ 2 มิลลิลิตร เติมลงในสารละลายทองแขวนลอย ที่เตรียมได้จำนวน 200 มิลลิลิตร มากวนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (magnetic stirrer) นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่เข้มข้น 10% จำนวน 200 ไมโครลิตร กวนเบา ๆ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน lgG ติดสลากด้วยอนุภาคทอง (gold particle labeled lgG) แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นของสารละลายเป็น 0.5 ที่ OD 540 นำไปพ่นลงบนแผ่นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) แยกกันในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C นาน 2 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 การทำเส้นตรวจสอบ (test line) และ เส้นควบคุม (control line)

โดยทำการพ่น lgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เป็น control line ใช้ lgG ของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ด้วยเครื่องมือพ่นสารละลายควบคุมปริมาณลงบนแผ่นเมมเบรน S&S AE 99 โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร เส้นทั้ง 2 เส้นถูกพ่นพร้อมกันและจัดให้อยู่กึ่งกลางของ NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น lgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบว่า การไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบมีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ Goat-anti Rabbit (GAR) กับ lgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลากอนุภาคทอง

ขั้นตอนที่ 3 การประกอบ และทดสอบปฏิกิริยา GLIFT

มีขั้นตอนตามลำดับ คือ

3.1 วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น (Plastic Backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร

3.2 วางแผ่นใยแก้วพ่น lgG ของมันฝรั่ง/ปทุมมา ที่ติดสลากอนุภาคทอง ทั้ง 2 แผ่นซ้อนเกยกันเล็กน้อยทางช่องด้านล่างถัดลงมาจากเมมเบรน

3.3 วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้น (sample pad) เกยที่ปลายของแผ่น lgG ของ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของมันฝรั่ง/ปทุมมา ที่ติดสลากอนุภาคทอง ลงไปจนถึงปลายของแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น

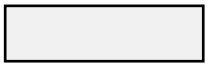
3.4 วางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (Wicking paper) เพื่อดูดซับของเหลวไว้ด้านบนของตลับ โดยพาดเกยจากปลายด้านบนของแผ่นเมมเบรนไปจนสุดปลายของแผ่นพลาสติกกาวรองพื้น

3.5 ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วนี้ออกเป็นเส้นที่มีความกว้างของชุดเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในตลับพลาสติก นำไปทดลองตรวจตัวอย่างมันฝรั่ง/ปทุมมาเป็นโรค การเก็บชุดตรวจไว้ใช้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมินัมฟอยด์ ซีลปิดให้สนิทเพื่อป้องกันความชื้น

ผู้ใช้ประโยชน์ชุดตรวจสอบไวรัสกล้วยไม้ :

1. บริษัทผลิตมันฝรั่ง/ปทุมมาส่งออกไปต่างประเทศ
2. เกษตรกรผู้ปลูกหัวมันฝรั่ง/ปทุมมาจำหน่ายหัวพันธุ์
3. ฝ่ายวิทยาการกักกันพืชนำเข้าและออกใบรับรองเพื่อการส่งออก
4. นักวิชาการที่เกี่ยวข้อง

5.1 ผังกระบวนการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

จุดเริ่มต้น/สิ้นสุด	 ขั้นตอน/กิจกรรม	จุดตัดสินใจ	การเชื่อมต่อ	ทิศทางการไหล
ขั้นตอน	**นวก. ผู้รับผิดชอบ**	**คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต**	**สบ./ฝบ.**	**เอกสารอ้างอิง**
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต		Y		
3.1 เตรียมการติดเชื้อโปรตัวซัว S.singaporensisทั้งในหนูและงูเหลือม				
3.2 เตรียมเหยื่อแป้งนุ่มเพื่อเป็นอาหารหนู				
3.3 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว				
3.4 ตรวจสอบคุณภาพและความรุนแรงของเชื้อ		N Y		
3.5 เตรียมเหยื่อโปรตัวซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป				
3.6 จำหน่ายจ่ายแจกการนำไปใช้ประโยชน์				
4. จำหน่าย จ่ายแจก (การนำไปใช้ประโยชน์)				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตเหยื่อโปรตัวซัวกำจัดหนู

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการเกษตร	การจัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการเกษตรในปีงบประมาณนั้น ๆ	ผลิตให้ตรงตามแผนและงบประมาณที่ได้รับ	แผนการผลิตงบประมาณ
2. พิจารณาแผนการผลิต	พิจารณาจัดสรร/ปรับงบประมาณให้แต่ละปัจจัยการผลิต		
3. กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต			
3.1 เตรียมการติดเชื้อโปรตัวซัว S.singaporensis ทั้งในหนูและงูเหลือม	- ติดเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ในหนูท้องขาว ครั้งละ 20 ตัว - ติดเชื้อโปรตัวซัวระยะซาร์โคซีสต์ในงูเหลือมครั้งละ 10 ตัว		- พบซาร์โคซีสต์ในกล้ามเนื้อลำตัวหนู - พบสปอร์โรซีสต์ในมูลงูเหลือม
3.2 เตรียมเหยื่อแป้งนุ่มเพื่อเป็นอาหารหนู	เหยื่อก้อนแป้งนุ่มขนาด 1 กรัม ประกอบด้วยแป้งสาลี น้ำมันพืช เมล็ดข้าวโพดบดหยาบ น้ำตาล ฯลฯ		เหยื่อแป้งนุ่มเป็นอาหารหนู
3.3 เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว	จากมูลงูเหลือมที่มีสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวปนเปื้อน โดยการทำความสะอาดและตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นตกตะกอน 2-3 ครั้ง และตรวจนับสปอร์โรซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง บันทึกปริมาณสปอร์โรซีสต์ต่อไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4-10°C)		- สารชีวินทรีย์กำจัดหนู
3.4 ตรวจสอบคุณภาพและความรุนแรงของเชื้อ	- ตรวจสอบคุณภาพและความรุนแรงของเชื้อ โดยวิธี Bioassay กับหนูท้องขาวโดยตรงในอัตรา lethal dose จำนวน 6 ครั้ง		สารชีวินทรีย์กำจัดหนูที่คุณภาพสูงไม่ต่ำ 80%
3.5 เตรียมเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป	ตามใบสั่งซื้อ : โดยการไปเปิดสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่มีโปรโตซัว 200,000 ซีสต์ (~20-30µl) ลงในรูที่เจาะเตรียมไว้ของก้อนเหยื่อ 1 ก้อน แต่ละก้อนนำไปบรรจุในซองกระดาษแก้ว แล้วปิดปากถุงให้สนิท		ปริมาณเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปตรงตามจำนวนที่วางแผนการผลิต
3.6 จำหน่าย จ่ายแจกการนำไปใช้ประโยชน์	ให้กับเกษตรกร และผู้สนใจ		ตรงตามจำนวนที่วางแผนการใช้ประโยชน์

6. เอกสารอ้างอิง

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. 2552, สารชีวินทรีย์กำจัดหนูศัตรูพืชและมนุษย์. 12 หน้า

การผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

เชื้อสาเหตุที่ทำให้หนูป่วยตาย : ค๊อคซิเดียนโปรโตซัว, Sarcocystis singaporensis Zamen and Colley,1976
จำนวน 200,000 สปอร์โรซีสต์/เหยื่อก้อนขนาด 1 กรัม (lethal dose)

กระบวนการผลิต

1. การติดเชื้อโปรโตซัวในหนู และงูเหลือม โดยใช้ feeding tube ที่มีสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S.singaporensis* จำนวน 300 สปอร์โรซีสต์ ให้โดยตรงทางปากผ่านกับหนูท้องขาวจำนวน 20 ตัว และเลี้ยงหนูเป็นเวลา 2 เดือน ในกรงเลี้ยงเดี่ยว เพื่อให้โปรโตซัวขยายพันธุ์และเจริญเติบโตในกล้ามเนื้อลำตัวหนู หลังจากนั้น สลบหนู และตรวจนับปริมาณซาร์โคซีสต์ที่พบในกล้ามเนื้อ ก่อนนำไปให้งูเหลือมที่ยังไม่ได้ทำการติดเชื้อโปรโตซัว (1-2 ตัวต่องูเหลือม 1 ตัว) ภายหลังงูเหลือมติดเชื้อแล้ว 14-30 วัน เก็บมูลงูเหลือมที่ได้มาตรวจหาสปอร์โรซีสตที่ปนเปื้อน

2. การเตรียมเหยื่ออาหารหนู ทำการผสมเหยื่ออาหารในเครื่องตีผสม ซึ่งประกอบด้วยน้ำมันพืช 20 ส่วน แป้งสาลี 60 ส่วน เมล็ดข้าวโพดแห้งบดหยาบ 7 ส่วน น้ำตาล 8 ส่วน แป้งทาลคัม 5 ส่วน กลิ่นมะพร้าว 1 ส่วน ไวตามินอี 0.1 ส่วน ให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำเข้านวดต่อในเครื่องผลิตเส้นเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่มเรียงในถาด แล้วตัดเป็นก้อนขนาดประมาณ 1 กรัม และเจาะรูตรงกลางเหยื่อ ห้ามเจาะทะลุพื้นถาด โดยให้แต่ละถาดมีเหยื่อประมาณ 300-400 ก้อน

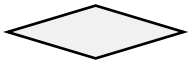
3. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว, S.singaporensis จากมูลงูเหลือม ใส่มูลงูเหลือมที่ปนเปื้อนโปรโตซัว ลงในครก และบดละลายด้วยน้ำเกลือ PBS 1% หรือน้ำกลั่น แล้วกรองกากมูลงูด้วยที่กรองที่มีความละเอียด 60# นำสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิด แล้วปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่มีความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปฏิบัติเช่นนี้ 2-3 ครั้ง จนน้ำเหนือตะกอนใสสะอาด รินน้ำออกทิ้ง ระวังการไหลของตะกอนสปอร์โรซีสต์ออกมาด้วย จากนั้นเติมน้ำกลั่น หรือน้ำเกลือ PBS 1% ลงไปแทน เขย่าตะกอนนี้ให้ละลายเข้ากันดี ใช้ micropipette ขนาด 100 µl ดูดสารแขวนลอย 20 µl ใส่ใน blood counting chamber ที่ปิดด้วยกระจก (cover glass) จนสนิทแล้ว ข้างละ 10 µl ตรวจนับสปอร์โรซีสต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงที่ 400 เท่า บันทึกปริมาณของสปอร์โรซีสต์ในสารละลายต่อ 1 µl เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสารละลายที่มีจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ต้องการใช้ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4°-10°เซลเซียส) ได้นาน 1 ปี โดยยังคงมีความรุนแรงในการทำให้หนูป่วยตายสูง

4. การผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ดูดสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้เตรียมไว้ในข้อ 3 ด้วย multiple pipette ตามอัตราที่ได้คำนวณไว้ เช่น 30 µl มีสปอร์โรซีสต์ 200,000 ซีสต์ จากนั้นไปเปิดลงในก้อนเหยื่อที่ได้เตรียมไว้ดังข้อ 1 หลังจากนั้นปิดปากรูโดยการหนีบด้วยโฟร์เซ็บ แล้วบรรจุลงซองกระดาษแก้วขาวขุ่น ปิดปากถุงด้วยที่เย็บกระดาษ (1 คน ผลิตได้ประมาณ 300 ก้อนต่อ 1 ชั่วโมง)

5. การตรวจสอบความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัว เป็นขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพและหรือความรุนแรงของเชื้อโปรโตซัวจากข้อ 3 ก่อนการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป โดยวิธี Bioassay คือ นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวของแต่ละครั้งที่ได้มาทดสอบการเกิดโรคกับหนูท้องขาวโดยตรง ในอัตรา lethal dose / หนู 1 ตัว จำนวน 6 ตัว (เพศเมีย 3 ตัว, เพศผู้ 3 ตัว) บันทึกจำนวนหนูตายภายหลังรับเชื้อแล้ว 10-15 วัน

เหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ชนิดสำเร็จรูป มีปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นเชื้อสาเหตุทำให้หนูป่วยตาย ($2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ / ก้อนเหยื่อแป้งนุ่มขนาด 1 กรัม) โปรโตซัวชนิดนี้มีวงจรชีวิตเฉพาะระหว่างหนูและงูเหลือมในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เท่านั้น และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม

5.1 ผังกระบวนการผลิตแตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว

จุดเริ่มต้น/สิ้นสุด	ขั้นตอน/กิจกรรม	 จุดตัดสินใจ	การเชื่อมต่อ	ทิศทางการไหล
ขั้นตอน	**นวก. ผู้รับผิดชอบ**	**คณะกรรมการกำกับดูแลการผลิตขยายพันธุ์และปัจจัยการผลิต**	**สบ./ฝบ.**	**เอกสารอ้างอิง**
1. จัดทำแผนการผลิตและแผนการนำไปใช้ประโยชน์ของปัจจัยการผลิต		N		- แผนการผลิตและแผนการใช้เงิน
2. พิจารณาแผนการผลิต				
3. กระบวนการผลิตปัจจัยการผลิต		Y		
3.1 เก็บรวบรวมและเตรียมพืชอาหารสำหรับเลี้ยงแมลงอาศัย				
3.2 ผลิตแมลงอาศัยสำหรับผลิตหนอนแมลงดำหนามมะพร้าววัย 4-5				
3.3 ผลิตแตนเบียน Adecodes hispinarum				
3.4 ควบคุมคุณภาพ	Y	N		
3.5 บรรจุหีบห่อ				
4. การนำไปใช้ประโยชน์				พป.56
5. ติดตามและรายงานผล				- สงป.301/302 - รายงานผลการตรวจติดตามของคณะทำงานฯ - ทะเบียนคุม

แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว

ชื่อผลิตภัณฑ์ : แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว Asecodes hispinarum

คุณสมบัติ : 1. แตนเบียนชนิด Asecodes hispinarum

2. ลงทำลายหนอนแมลงดำหนามมะพร้าว

ปริมาณบรรจุ : -

การนำไปใช้ : เป็นการผลิตแตนเบียนคุณภาพส่งให้กรมส่งเสริมการเกษตร ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ใช้ในการผลิตขยายแตนเบียน A. hispinarum เป็นปริมาณมาก และนำไปปล่อยควบคุมแมลงดำหนามมะพร้าว

รายละเอียดอื่น ๆ : ไม่มี

กระบวนการผลิต :

1. การเก็บรวบรวม และเก็บรวบรวมแมลงดำหนามมะพร้าว ทั้งระยะไข่ ดักแด้ และตัวเต็มวัย จากใบมะพร้าวที่มีแมลงดำหนามลงทำลายออกจากกัน
2. การเลี้ยงตัวเต็มวัยแมลงดำหนามมะพร้าว :
   นำใบมะพร้าวที่มัดรวมกันไว้แล้ว วางบนขดลวดที่ใส่ไว้ในกล่องเลี้ยงตัวเต็มวัยแมลงดำหนาม คัดแยกตัวเต็มวัยแมลงดำหนามมะพร้าว ประมาณ 1,000 ตัว ที่ออกจากดักแด้ในระยะเวลาใกล้เคียงกัน หรือมีอายุใกล้เคียงกัน นำมาเลี้ยงในกล่องเลี้ยงแมลง ปิดฝาให้สนิท นำไปวางไว้บนชั้นเลี้ยงแมลง ตรวจเช็คและคัดแยกไข่แมลงดำหนามมะพร้าวทุก 2 วัน เพื่อนำมาเก็บรอให้หนอนฟักออกจากไข่ เปลี่ยนใบมะพร้าวทุก 4-5 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นใบมะพร้าวเหี่ยวหรือมีสีน้ำตาล
3. การเลี้ยงหนอนแมลงดำหนามมะพร้าว : ตัดใบมะพร้าวแก่เป็นท่อนสั้น ๆ นำมาเรียงซ้อนกัน และมัดด้วยยางวง นำใบมะพร้าวที่เตรียมไว้ ใส่กล่องเลี้ยงแมลง เขี่ยตัวหนอนขนาดใกล้เคียงกัน 500 ตัว ใส่บนใบมะพร้าว เปลี่ยนอาหารทุก 4-5 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นใบมะพร้าวแห้ง หรือเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล คัดแยกและเก็บรวบรวมดักแด้แมลงดำหนามมะพร้าวใส่ไว้ในกล่องเดียวกัน ภายในกล่องใส่ใบมะพร้าว 7-10 ใบ เพื่อเป็นอาหารของตัวเต็มวัยแมลงดำหนามที่ออกจากดักแด้ ส่วนตัวหนอนให้คัดเลือกหนอนวัย 4-5 ที่มีความยาวประมาณ 1 ซม. เพื่อใช้สำหรับเลี้ยงแตนเบียน
4. การเพาะเลี้ยงแตนเบียน Asecodes hispinarum : นำใบมะพร้าวที่ตัดเป็นชิ้นสั้น ๆ 4-5 ชิ้น ใส่กล่องเลี้ยงแมลง เขี่ยหนอนวัย 4-5 จำนวน 40 ตัว ใส่บนใบมะพร้าวที่เตรียมไว้ ใส่แตนเบียนที่ออกจากมัมมี่ (ซากหนอนที่ถูกเบียนและดักแด้แตนเบียนอยู่ภายใน) 1 ตัว ในกล่องเบียน ปิดฝาให้สนิท และนำไปวางไว้ในชั้นวางกล่องเลี้ยงแมลง ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 วัน จึงเปลี่ยนอาหาร ให้เขี่ยหนอนที่ถูกเบียนแล้วจากกล่องที่เบียน จำนวน 300 ตัว ใส่ลงบนใบมะพร้าวที่มัดรวมกันไว้ ปิดฝาและนำไปวางที่ชั้นเลี้ยงแมลง 7-10 วัน หลังจากการเบียนหนอนที่ถูกเบียนและตายกลายเป็นมัมมี่ เก็บรวบรวมมัมมี่ออกจากกล่องเลี้ยงแมลง
5. แบ่งมัมมี่ที่ได้ประมาณ 10% เก็บไว้สำหรับเลี้ยงขยายพันธุ์ ส่วนมัมมี่ที่เหลือประมาณ 90% นำไปปล่อยในสวนมะพร้าว

หมายเหตุ : การเลี้ยงแตนเบียนในช่วงหน้าฝน หรือช่วงที่มีความชื้นสูง อาจพบเชื้อราลงทำลายมัมมี่ ให้ป้องกันเชื้อรา โดยชุบมัมมี่ในสารละลายคลอร็อค 10% (คลอร็อค 1 ส่วน + น้ำสะอาด 9 ส่วน) และผึ่งให้แห้งก่อนนำไปเก็บรักษาเพื่อรอการนำไปปล่อย

การตรวจสอบคุณภาพ : ให้สุ่มเก็บตัวอย่างมัมมี่ที่ผลิตได้ 2% และนำมาตรวจคุณภาพ โดยการตรวจนับจำนวนแตนเบียนที่เจาะออกจากแต่ละมัมมี่ แตนเบียนที่มีคุณภาพต้องมีตัวเต็มวัยเพศเมียอย่างน้อย 25 ตัว/มัมมี่

ผู้ใช้ประโยชน์ : แตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว

1. หน่วยงานผลิตแตนเบียนในกรมส่งเสริมการเกษตร
2. กลุ่มเกษตรกรชาวสวนมะพร้าว

5.2 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานผลิตแตนเบียนแมลงดำหนามมะพร้าว

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน	รายละเอียด	ข้อกำหนด	ตัวชี้วัด
1. เก็บรวบรวมและเตรียมพืชอาหาร สำหรับเลี้ยงแมลงอาศัย	1.1 เก็บรวบรวมพืชอาหาร 1.2 เตรียมพืชอาหารสำหรับเลี้ยงตัวอ่อนและตัวเต็มวัยแมลงดำหนามมะพร้าว	- ใบอ่อนที่ใช้ต้องเป็นใบอ่อนที่ยังไม่คลี่ และใบแก่ต้องไม่มีสารฆ่าแมลงปนเปื้อน - ใบมะพร้าวต้องสดสำหรับใช้งานได้ 1 สัปดาห์	
2. การผลิตแมลงอาศัยเป็นขั้นตอนการผลิตหนอนแมลงดำหนามมะพร้าววัย 4-5	2.1 เปลี่ยนอาหาร ทุก 2 วัน 2.2 เก็บรวบรวมไข่แมลงดำหนามมะพร้าว ทุก 2 วัน 2.3 คัดแยกหนอนแมลงดำหนามมะพร้าววัย 4-5 เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงแตนเบียน	ผลิตหนอนแมลงดำหนามวัย 4-5 ที่เพาะเลี้ยงได้ต้องมีความยาว อย่างน้อย 1 ซม. แข็งแรง ไม่มีโรคแมลงรบกวน	
3. การผลิตแตนเบียน Adecodes hispinarum	1. ตรวจนับ และนำหนอนแมลงดำหนามวัย 4-5 จำนวน 40 ตัว ใส่กล่องเบียน 2. นำแตนเบียนที่เจาะออกจากมัมมี่ จำนวน 1 มัมมี่ ใส่ในกล่องเบียน 3. เก็บไว้ 7-10 วัน นำมาตรวจเช็ค หากพบมัมมี่ที่เกิดจากการเบียน ให้เก็บออกจากกล่อง 4. เก็บรักษามัมมี่แตนเบียน โดยเก็บรวบรวมมัมมี่ นำไปชุบในสารละลายคลอร็อค 10% ผึ่งให้แห้ง เพื่อป้องกันเชื้อรา	- แตนเบียนที่มีคุณภาพจะต้องมีตัวเต็มวัยที่เจาะออกจากมัมมี่ แล้วต้องมีเพศเมีย เฉลี่ยไม่น้อยกว่า 25 ตัว/มัมมี่	ผลิตแตนเบียน Adecodes hispinarum ที่มีคุณภาพอย่างน้อยเดือนละ 800 มัมมี่
4. การควบคุมคุณภาพ	ให้สุ่มเก็บตัวอย่างมัมมี่ที่ผลิตได้ 2% และนำมาตรวจคุณภาพ	แตนเบียนที่ดีต้องมีเพศเมียอย่างน้อย 25 ตัว/มัมมี่	