รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์
2. **โครงการวิจัย** : สำรวจและศึกษาศักยภาพชีวภัณฑ์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาชนิดของแบคทีเรีย *Streptomyces* ที่มีศักยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Species, biology, and geographical distribution of aquatic pest snail *Physella*
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง :

   อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ผู้ร่วมงาน :

   ดาราพร รินทะรักษ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ไตรเดช ข่ายทอง สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
5. **บทคัดย่อ** :

ดำเนินการศึกษาชนิดของแบคทีเรีย *Streptomyces* ที่มีศักยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืชตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 ถึงเดือนกันยายน 2563 ได้ตัวอย่างหอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeas walkeri* 77 ตัวอย่าง หอยเจดีย์เล็ก *Allopeas gracile* 78 ตัวอย่าง และหอยทากสยาม *Cryptozona* sp. 47 ตัวอย่าง จังหวัดระยอง 1 ตัวอย่าง ชุมพร 1 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี 1 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ 1 ตัวอย่าง จันทบุรี 2 ตัวอย่าง นครปฐม 1 ตัวอย่าง และกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง เพื่อนำไปแยกเชื้อ *Streptomyces* ในห้องปฏิบัติการ ปรากฏว่าแยกสามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 93 ไอโซเลต โดยพบเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ FRY-04*, FRY-07, FRY-08 UN-03 และ UN-05 มีประสิทธิภาพทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมง

Screening and selection of potential *Streptomyces* isolates with molluscicidal activity was conducted during October 2017 to September 2020. 77 individuals of *Prosopeas walkeri* snails, 78 individuals of *Allopeas gracile* snails

กรมวิชาการเกษตร

and 47 individuals of *Cryptozona* snails were collected. One soil sample was collected from each province: Rayong, Chumphon, Prachuap Khiri Khan, Nakhon Pathom and Kanchanaburi. Two soil samples were additionally obtained from Chanthaburi Province. All soil samples were further processed for *Streptomyces* isolation. In summary, 93 isolates of *Streptomyces* were found from all soil samples. Five isolates (FRY-04*, FRY-07, FRY-08 UN-03 and UN-05) possess good molluscicidal activity with 100% snail mortality within 24 hours.

6. คำนำ :

การเกษตรกรรมเป็นหนึ่งในอาชีพหลักที่สำคัญของประเทศไทย ผลผลิตเกษตรสร้างรายได้ให้กับประเทศมากกว่าพันล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามผลผลิตเกษตรเกิดความเสียหายเนื่องจากการเข้าทำลายของศัตรูพืช หนึ่งในศัตรูพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตเกษตรได้แก่กลุ่มหอยศัตรูพืช ทั้งนี้หอยศัตรูพืชหลายชนิดดังเช่นหอยดักดาน (*Cryptozona*) หอยซัคซีเนีย (*Succinea*) หอยทากยักษ์แอฟริกา (*Lissachatina fulica*) ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผักและไม้ดอกไม้ประดับ หอยเชอรี่ (*Pomacea*) ก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชปลูกเช่น ข้าวและพืชน้ำหลายชนิด หอยคัน (*Radix*) ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ไม้น้ำประดับ

กรมวิชาการเกษตรทำการวิจัยด้านการอารักขาพืชเพื่อป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืช ได้คำแนะนำให้ใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืช อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดที่สำคัญคือการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศเกษตรซึ่งไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย และอาจมีผลกระทบต่อพืชปลูกทำให้ไม่เจริญเติบโตและตายลง อีกทั้งยังไม่เอื้อต่อระบบเกษตรอินทรีย์ซึ่งปลอดจากสารเคมี ทั้งนี้เพื่อให้กำจัดหอยศัตรูพืชในแปลงปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นต้องวิจัยการกำจัดหอยศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมี โดยทางเลือกที่เป็นไปได้คือการจัดการหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี

การจัดการหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี จะใช้สิ่งมีชีวิตหรือผลผลิตจากสิ่งมีชีวิตอื่นในการป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืช สิ่งมีชีวิตหลายชนิดมีศักยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืชโดยเฉพาะกลุ่มของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์กลุ่มที่น่าสนใจคือแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* เนื่องจากมีความหลากหลายระดับสปีชีส์สูง อีกทั้งยังสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิหลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น การต้านเชื้อจุลินทรีย์ (anti-biotic) การต้านปรสิต (anti-parasite) และการฆ่าหอย (molluscicide) ดังนั้นการศึกษานี้จะทำการค้นหาและคัดเลือกชนิดแบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* ที่มีศักยภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ได้แบคทีเรียกลุ่ม *Streptomyces* ที่มีประสิทธิภาพนำไปพัฒนาต่อ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ และนำไปใช้ควบคุมหอยศัตรูพืชในระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไป

กรมวิชาการเกษตร

7. วิธีดำเนินการ :

<u>อุปกรณ์</u>

- กล่องพลาสติกขนาดต่าง ๆ
- กระดาษอเนกประสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- อาหารปลาชนิดเม็ด
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
- ผักสด
- เครื่อง UV transilluminator
- เครื่อง autoclave
- เครื่อง PCR
- เครื่องอบลมร้อน
- เครื่องแก้ว
- สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ตู้เย็น
- หลอด microcentrifuge
- หลอดพลาสติก
- หลอดทดลอง
- Loop และ needle
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- Pipette
- ตู้เขี่ยเชื้อหรือตู้ปลอดเชื้อ
- Incubator
- เครื่องชั่ง
- พาราฟิล์ม
- ถุงพลาสติกและหนังยาง
- ตู้กระจก
- ต้นกล้วยไม้และกล้าไม้เลี้ยงหอย

<u>วิธีการ</u>

1) เก็บตัวอย่างดินและหอย

กรมวิชาการเกษตร

เก็บตัวอย่างดิน และวัสดุอินทรีย์ดังเช่นเปลือกไม้ เศษใบไม้ จากระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมที่หอยอาศัยอยู่ในธรรมชาติและแปลงปลูกกล้วยไม้ เพื่อให้ได้เชื้อ และสารเมตาโบไลท์ที่มีความหลากหลายจากสภาพดินประเภทต่าง ๆ กัน จากจังหวัดนนทบุรี สมุทรสาคร นครปฐม นครราชสีมา และกาญจนบุรี บันทึกลักษณะของระบบนิเวศและชนิดหอยที่พบบริเวณนั้น เก็บตัวอย่างหอยศัตรูพืชที่ใช้ในการทดสอบคือหอยเจดีย์เล็ก *Allopeas gracile* เนื่องจากเป็นหอยศัตรูกล้วยไม้ที่มีความสำคัญ สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและเก็บตัวอย่างได้เกือบตลอดปี

2) การคัดแยกเชื้อและทดสอบประสิทธิภาพ

2.1 การคัดแยกเชื้อ

เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดในการศึกษานี้ ได้แก่ Actinomycete isolation agar ซึ่งถือเป็นอาหารคัดเลือก (selective medium) จุลินทรีย์กลุ่ม *Streptomycete* Glycerol asparagine agar base และ Potato dextrose broth ซึ่งถือเป็นอาหารเพิ่มจำนวน (cultivation medium) (Downes and Ito, 2001; Eaton et al., 2005) ทั้งนี้ จะดำเนินการคัดแยกเชื้อเฉพาะในกลุ่ม *Streptomyces griseolus* และกลุ่มอื่น ๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชและมนุษย์เท่านั้น

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycete isolation agar

Sodium caseinate	2	กรัม
L-Asparagine	0.1	กรัม
Sodium propionate	4	กรัม
Dipotassium phosphate	0.5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Ferrous sulphate	0.01	กรัม
Agar	15	กรัม

นำสารมาชั่งและลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ที่เติม Glycerol ลงไป 5มิลลิลิตร นำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glycerol asparagine agar base

L-Asparagine	1	กรัม
Dipotassium Phosphate	1	กรัม
Ferrous sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Manganese chloride tetrahydrate	0.001	กรัม
Zinc sulphate heptahydrate	0.001	กรัม
Agar	20	กรัม

นำสารมาชั่งและลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ที่เติม Glycerol ลงไป 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการคัดแยกเชื้อดัดแปลงจาก Xing et al. (2015) โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บได้มา 10 กรัม ใส่ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร (หลอดนี้ถือว่ามีความเข้มข้น 10-1) เจือจางทีละ 10 เท่า โดยนำสารจากหลอดความเข้มข้น 10-1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดดล

กรมวิชาการเกษตร

องที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้จนได้ความเข้มข้น 10-2 10-3 10-4 10-5 และ 10-6 จากนั้นนำสารไปเคลือบบนผิวของหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานเพาะเชื้อโดยนำสารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10-2 10-3 10-4 ไปเคลือบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Actinomycete isolation agar

หลังจากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเส้นใยของเชื้อที่เจริญขึ้นมาถ่ายไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Glycerol asparagine agar base จนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่บริสุทธิ์ และนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบตาประกอบ สังเกตขนาด พื้นผิวของโคโลนี และลักษณะอื่นๆ

นำเชื้อที่คัดแยกมาได้มาบ่มต่อใน Potato dextose broth ซึ่งมีวิธีการเตรียมดังนี้

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextose broth

Potatoes, infusion from	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม

นำสารมาชั่งและลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

จากนั้นนำไปกรองผ่านเยื่อหุ้ม (microporous membrane filter) ขนาด 0.22 ไมโครเมตรเพื่อแยกเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M HCl หลังจากนั้นนำไปเจือจางความเข้มข้น 100% 50% และ 25% และนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป ทั้งนี้ทำการทดสอบในส่วนของการทำให้เซลล์แตกและนำสารละลายเซลล์ (lysate) มาทดสอบร่วมด้วย

2.2 การทดสอบศักยภาพของเชื้อที่แยกได้

ดำเนินการทดสอบศักยภาพของเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างดินและธรรมชาติโดยนำมาทดสอบครั้งละ 5 ไอโซเลต โดยเตรียมสารละลายสปอร์แต่ละไอโซเลตให้ได้ความเข้มข้น 107 สปอร์/มิลลิลิตร

นำหอยที่ได้จากในข้อ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ภายในบรรจุดินหนา 5 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD 7 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารละลายจากเชื้อไอโซเลตที่ 1

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารละลายจากเชื้อไอโซเลตที่ 2

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารละลายจากเชื้อไอโซเลตที่ 3

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารละลายจากเชื้อไอโซเลตที่ 4

กรรมวิธีที่ 5 พ่นสารละลายจากเชื้อไอโซเลตที่ 5

กรรมวิธีที่ 6 พ่นสารละลาย 80% WP metaldehyde เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 7 พ่นน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม)

นำเชื้อที่มีศักยภาพ คือทำให้หอยตาย 100% ภายใน 48 ชั่วโมงมาทำการทดสอบประสิทธิภาพต่อไปในข้อ 2.2

กรมวิชาการเกษตร

2.3 ทดสอบประสิทธิภาพ

นำหอยที่ได้จากในข้อ 1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ภายในบรรจุดินหนา 5 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารละลายจากเชื้อ เข้มข้น 100%

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารละลายจากเชื้อ เข้มข้น 50%

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารละลายจากเชื้อ เข้มข้น 25%

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารละลาย 80% WP metaldehyde เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม)

สังเกตและนับจำนวนหอยที่ตายหลังเวลาผ่านไป 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบจำนวนหอยที่ตายด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม IRRISTAT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

นำเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง (สารละลายทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมง) มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจานใหม่ รอจนเชื้อเจริญเต็มที่ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการเตรียมเชื้อเพื่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวตามวิธีการของ ATCC โดยนำหลอดพลาสติกขนาดเล็กบรรจุสารละลาย glycerol 10% นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และหลอดพลาสติกขนาดเล็กบรรจุสารละลาย skim milk 20% นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ให้นำสปอร์มาเก็บรักษาในหลอดที่บรรจุ skim milk ส่วนเส้นใยเก็บรักษาในหลอดที่บรรจุ glycerol และนำเก็บในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการผลิตขยายต่อไป

3. การระบุชนิดและยืนยันผล

นอกจากศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีเพื่อทำการระบุชนิดแล้ว ยังยืนยันผลด้วยวิธีทางอณูชีววิทยา โดยเพิ่มปริมาณยีน 16s rDNA, atpD, gyrB, recA, rpoB และ trpB อ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ หลังจากนั้นทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank และยืนยันผลด้วยการสร้าง phylogenetic tree แบบ multilocus analysis

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยเชื้อมาสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป ตรวจวัดคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟริซิส โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16s rDNA, atpD, gyrB, recA, rpoB และ trpB ด้วยพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16s rDNA , atpD, gyrB, recA, rpoB และ trpB ซึ่งนิยมใช้เพื่อการระบุสกุลและชนิดของเชื้อด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ตามวิธีการของ Higginbotham and Murphy (2010) และ Rong and Huang (2010) แต่ละไพร์เมอร์มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน 16s rDNA ได้แก่

16SF50 (5´ AAC ACA TGC AAG TCG AAC G 3´) และ 16SR1392 (5´ ACG GGC GGT GTG TAC 3´)

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน atpD ได้แก่

atpDPF (5´ GTC GGC GAC TTC ACC AAG GGC AAG GTG TTC AAC ACC 3´) และ atpDPR (5´ GTG AAC TGC TTG GCG ACG TGG GTG TTC TGG GAC AGG AA 3´)

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน gyrB ได้แก่

gyrBPF (5’ GAG GTC GTG CTG ACC GTG CTG CAC GCG GGC GGC AAG TTC GGC 3’) และ gyrBPR (5’ GTT GAT GTG CTG GCC GTC GAC GTC GGC GTC CGC CAT 3’)

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน recA ได้แก่

recAPF (5’ CCG CRC TCG CAC AGA TTG AAC GSC AAT TC 3’) และ recAPR (5’ GCS AGG TCG GGG TTG TCC TTS AGG AAG TTG CG 3’)

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน rpoB ได้แก่

rpoBPF (5’ GAG CGC ATG ACC ACC CAG GAC GTC GAG GC 3’) และ rpoBPR (5’ CCT CGT AGT TGT GAC CCT CCC ACG GCA TGA 3’)

คู่ไพรเมอร์สำหรับยีน trpB ได้แก่

trpBPF (5’ GCG CGA GGA CCT GAA CCA CAC CGG CTC ACA CAA GAT CAA CA 3’) และ trpBPR (5’ TCG ATG GCC GGG ATG ATG CCC TCG GTG CGC GAC AGC AGG C 3’)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตร 50 µl ประกอบด้วยสารเคมีต่อไปนี้

10x buffer	5	µl
10 mM dNTP mix	1	µl
10 µM forward primer	1.5	µl
10 µM reverse primer	1.5	µl
2 U/µl Taq polymerase	0.5	µl
template DNA (ดีเอ็นเอของเชื้อ)	1	µl
น้ำกลั่นปลอดประจุปลอดเชื้อ	39.5	µl

นำสารทั้งหมดใส่ในหลอดพีซีอาร์และผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง thermocycler ภายใต้อุณหภูมิดังนี้

- ช่วงเริ่มต้น

95°C เป็นเวลา 5 นาที 1 รอบ

- ช่วงเพิ่มปริมาณ

a) 95°C เป็นเวลา 1 นาที

b) 50°C เป็นเวลา 1 นาที

c) 72°C เป็นเวลา 1 นาที

ศรีนครินทร์

ทำซ้ำเรียงตามลำดับจาก a) ถึง c) 35 รอบ

- ช่วงสุดท้าย

72°C เป็นเวลา 10 นาที 1 รอบ

หลังจากนั้นนำสารผสมดีเอ็นเอที่ผ่านการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ไปตรวจสอบว่ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการเกิดขึ้นหรือไม่ โดยเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1.8% และนำไปใส่ในกล่องที่บรรจุทีบีอีบัฟเฟอร์ ผสมสารผสมดีเอ็นเอกับสีย้อมในอัตราส่วน 1:5 และนำไปหยอดลงในหลุมของอะกาโรสเจล เปิดให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที นำอะกาโรสเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์และนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี เทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาร์กเกอร์ ถ้ามีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการขนาดประมาณ 1300 คู่เบสเกิดขึ้นให้นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสรอการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.3 การอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer ที่มีให้บริการโดยบริษัทเอกชนที่รับจ้างอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำไปวิเคราะห์และสร้างสร้างแผนภูมิต้นไม้ต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และสร้างแผนภูมิต้นไม้

นำไฟล์ที่ได้จากการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated sequencer มาวิเคราะห์ และตัดบริเวณสัญญาณรบกวนออก เพื่อให้ได้ไฟล์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rDNA , atpD, gyrB, recA, rpoB และ trpB ทุกตัวอย่าง หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม MAFFT version 7 (Katoh and Standley, 2013) ทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST หลังจากนั้นนำมาสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ 3 วิธี ดังนี้

3.4.1 วิธี neighbor-joining

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ด้วยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA version 7 (Kumar et al., 2016) โดยใช้โมเดล Kimura-2 parameter และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

3.4.2 วิธี maximum likelihood

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปทดสอบหาโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม jModeltest version 2 (Darriba et al., 2012) และนำไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม PhyML version 3 (Guindon et al., 2010) และทดสอบความเชื่อมั่นของกิ่งด้วยวิธีบูทสแทร็ป 1,000 ซ้ำ

3.4.3 วิธี Bayesian inference

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปสร้างแผนภูมิต้นไม้ตามโมเดลที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) โดยตั้งค่า MCMC chain เท่ากับ 10,000,000 รอบ และตัด burn-in ออก 25% ก่อนสร้างแผนภูมิ

และสุดท้ายนำแผนภูมิที่ได้จากทั้ง 3 วิธีมารวมให้เป็นแผนภูมิเดียวกัน

ศรีนครินทรวิโรฒ

- การบันทึกข้อมูล

1) ตัวอย่างดิน บันทึกลักษณะดิน ระบบนิเวศ พืชและหอยที่อาศัยอยู่บริเวณนั้น อุณหภูมิ สภาพแวดล้อมอื่น ๆ

2) *Streptomyces* ให้บันทึกลักษณะของโคโลนี การสร้างเส้นใยและสปอร์บนเพลท ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะการติดสีย้อม

3) การทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหอยศัตรูพืช บันทึกเวลาที่ทำให้หอยศัตรูพืชตาย (ชั่วโมง) ลักษณะของหอยที่ตายไป

<u>เวลาและสถานที่</u>

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2561 – กันยายน 2563 โดยเก็บตัวอย่างดินและหอยหอยเจดีย์เล็ก *Allopeas gracile* ตามธรรมชาติและแปลงปลูกทั่วประเทศไทย นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสกุล *Streptomyces* สกัดดีเอ็นเอและทำพีซีอาร์ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ได้อุปกรณ์เก็บตัวอย่างดินและอุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ และตัวอย่างหอยศัตรูพืชสำหรับทดสอบ ได้แก่ หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeas walkeri* 77 ตัวอย่าง หอยเจดีย์เล็ก *Allopeas gracile* 78 ตัวอย่าง และหอยทากสยาม *Cryptozona* sp. 47 ตัวอย่างจากจังหวัดนครราชสีมา สุราษฎร์ธานี และชุมพร ได้ตัวอย่างดินจากจังหวัดระยอง 1 ตัวอย่าง ชุมพร 1 ตัวอย่าง สุราษฎร์ธานี 1 ตัวอย่าง ประจวบคีรีขันธ์ 1 ตัวอย่าง จันทบุรี 2 ตัวอย่าง นครปฐม 1 ตัวอย่าง และกาญจนบุรี 1 ตัวอย่าง เพื่อนำไปแยกเชื้อ *Streptomyces* ในห้องปฏิบัติการ ปรากฏว่าแยกเชื้อจากดินจังหวัดระยองได้ 33 ไอโซเลต จังหวัดชุมพร 10 ไอโซเลต จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 7 ไอโซเลต จังหวัดจันทบุรี 31 ไอโซเลต จังหวัดนครปฐม 2 ไอโซเลต และจังหวัดกาญจนบุรีได้ 10 ไอโซเลต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Starch Casein Agar และ Actinomycetes Isolation Agar

จากนั้นนำมาแยกให้ได้เชื้อเดี่ยวที่บริสุทธิ์บนอาหารแข็ง Glycerol Asparagine Agar, Nutrient Agar และ Yeast Extract Malt Extract Agar โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25±2°C เป็นเวลา 7 วัน และนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลว Starch Casein Broth (SCB) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกเฉพาะ culture filtrate ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอนำไปทดสอบกับหอยในห้องปฏิบัติการต่อไป

และนำเชื้อจาก Starch Casein Broth มาเขี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง Glycerol Asparagine Agar เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ลักษณะเด่นของจุลินทรีย์ในกลุ่ม

กรมวิชาการเกษตร

Streptomyces คือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งจะมีลักษณะโคโลนีด้าน เมื่อเวลาผ่านไปสักระยะหนึ่งจะมีการเจริญเติบโตคล้ายเชื้อรา กล่าวคือจะมีการสร้างเส้นใยที่เรียกว่า aerial mycelium และมีการสร้างสปอร์ในที่สุด และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเหลวจะมีลักษณะของกลุ่มเซลล์เป็นก้อนกลม (tablet) คล้ายกับการเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว

จากนั้นทำการเก็บรักษาเชื้อลง Slant Culture บนอาหารแข็ง Starch Casein Agar ที่อุณหภูมิ 4°C ได้เชื้อทั้งหมด 10 กลุ่ม 93 ไอโซเลต และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในอาหารเหลว SCB พบเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ FRY-04*, FRY-07, FRY-08 UN-03 และ UN-05 มีประสิทธิภาพทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมงได้ (Fig. 5)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการเก็บตัวอย่างดินจำนวน 9 ตัวอย่าง ตัวอย่างหอยศัตรูพืชสำหรับทดสอบ ได้แก่ หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeas walkeri* 77 ตัวอย่าง หอยเจดีย์เล็ก *Allopeas gracile* 78 ตัวอย่าง และหอยทากสยาม *Cryptozona* sp. 47 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 93 ไอโซเลต พบเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ FRY-04*, FRY-07, FRY-08 UN-03 และ UN-05 มีประสิทธิภาพทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมงได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

พัฒนาต่อ สามารถนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ เกษตรกร หน่วยงานของรัฐผู้มีหน้าที่รับผิดชอบ เช่น กรมวิชาการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร มหาวิทยาลัย นักวิชาการและผู้สนใจ

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) :

ขอขอบคุณ นางสาวทิพอัปสร รุ่งทวีมนัสชัย และนายวีระวุฒิ พรมสุวรรณ ผู้ช่วยวิจัย และเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือจนกระทั่งงานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง :

ATCC. Preservation and recovery of filamentous fungi. Tech bulletin no. 2.

Barker, G. M., editor. 2004. Natural Enemies of Terrestrial Molluscs. CABI publishing.

Chen, J., Han, B. X., Guo, S. B., Wang, Y., He, J., Zhou, X. K., Yang, X., and Han, F. A. 2009. Molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* of endophyte JJ18 from *Pseudolarix kaempferi* Gord. Pharmacognosy Research 1(6): 421-427.

กรมวิชาการเกษตร

Chobchuenchom, W., and Bhumiratana, A. 2003. Isolation and Characterization of Pathogens Attacking *Pomacea canaliculata*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 903–906.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.

Downes F. P. and Ito K., (Eds.), 2001, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th Ed., APHA, Washington, D.C.

Eaton A. D., Clesceri L. S. and Greenberg A. W., (Eds.), 2005, Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st Ed., APHA, Washington, D.C.

Gao, M., Li, R., Dai, S., Wu, Y., and Yi, D. 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Soil in China and Their Pesticidal Activities. Biological Control 44: 380–388.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3): 307-321.

Guo, D., Chen, J., Du, X., and Han. B. 2010. Screening Of Molluscicidal Strain Against *Oncomelania hupensis* From Rhizosphere Of Medicinal Plant *Phytolacca acinosa* Roxb. Pharmacognosy Magazine 6(23): 159-165.

Guo, D., Chen, J., Liu, Y., Yao, H., Han, F-A., and Pan, J. 2011. A high-performance molluscicidal ingredient against *Oncomelania hupensis* produced by a rhizospheric strain from *Phytolacca acinosa* Roxb. Pharmacognosy Magazine 7(28): 277–283.

Higginbotham, S. J. and Murphy, C. D. 2010. Identification and characterisation of a *Streptomyces* sp. isolate exhibiting activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiological research 65(1): 82-86.

Hwang, K-S., Kim H. U., Charusanti, P., Palsson, B. Ø. and Lee S. Y. 2014. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. Biotechnology Advances 32: 255–268.

Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution 30(4): 772-780.

Keller, C., Maillard, M., Keller J., and Hostettmann, K. 2002. Screening of European Fungi for Antibacterial, Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities and Subsequent Isolation of Bioactive Compounds. Pharmaceutical Biology 40(7): 518-525.

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870-1874.

Molloy, D. P., Mayer, D. A., Gaylo, M. J., Morse, J. T., Presti, K. T., Sawyko, P. M., Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Laruelle, F., Nishikawa, K. C., and Griffin, B. H. 2013. *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A – A Biopesticide for the Control of Zebra and Quagga Mussels (Bivalvia: Dreissenidae). Journal of Invertebrate Pathology 113: 104–114.

Rong, X. and Huang, Y. 2010. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA–DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60: 696–703.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19(12): 1572-1574.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.

Sallam, A., and El-Wakeil, N. 2012. Biological and Ecological Studies on Land Snails and Their Control, Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. Soloneski, S. Editor. InTech.

Stoessl, A., Cole, R. J., Abramowski, Z., Lester, H. H., and Towers, G. H. N. 1989. Some Biological Properties of Traversianal, a Strongly Molluscicidal Diterpenoid Aldehyde from *Cercospora traversiana*. Mycopathologia 106: 41-46.

Wilson, M. J. 2012. Chapter XIII Pathogens and Parasites of Terrestrial Molluscs. In Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Elsevier.

Xing, Y. T., Dai, J. R., Liang, Y. C., Qu, G. L., Wang, W., Xu., Y. and Chen, Y. 2015. Strain of *Streptomyces nigrogriseolus* capable of generating molluscicidal active substance and application of *Streptomyces nigrogriseolus*. **Patent no.** CN104388362A (in Chinese).

Xing, Y. T. and Dai, J. R. 2015. *Streptomyces subrutilus* capable of generating molluscicide active substance and application thereof. **Patent no.** CN104531557A (in Chinese).

Zhang, G-M., Wu, Y., Pi, Z-J., Zhuang Y-H. 2005. Isolation of molluscicide microorganisms and activity study on snail killing and bacteria inhibition. Environmental science and technology 2005-04 (in Chinese).

13. ภาคผนวก :

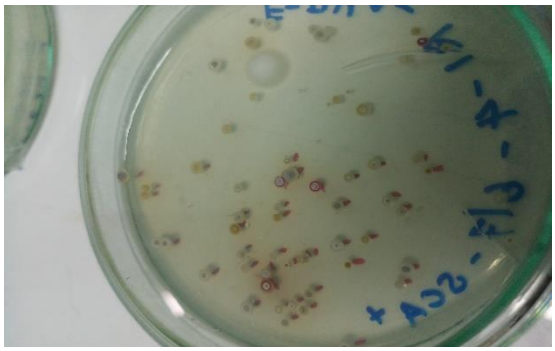

Figure 1: *Streptomyces* and actinomycetes colonies on starch casein agar (SCA) plate.

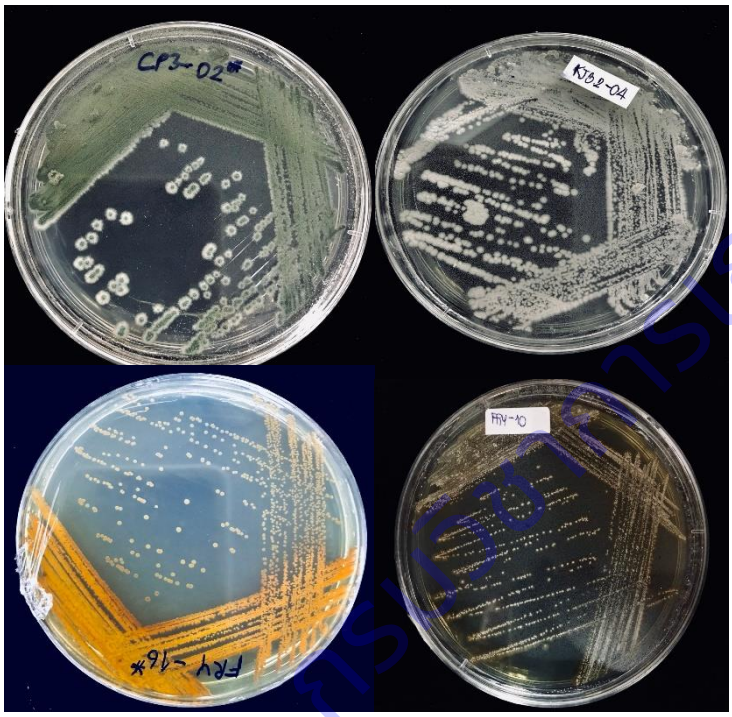

Figure 2: Pure cultures of *Streptomyces* colonies on SCA plates after 7 days of incubation.

Figure 3: *Streptomyces* isolates after incubation in starch casein broth (SCB) for 48 hours.

Figure 4: Mortality of *Allopeas gracile* snails after applying supernatant from *Streptomyces*-inoculated SCB.

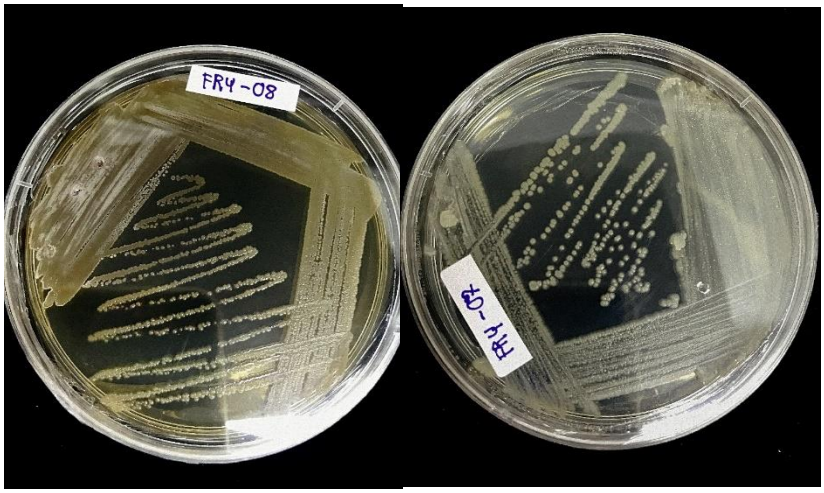

Figure 5: Two isolates of *Streptomyces* spp. (FRY-07 and FRY-08) with 100% snail mortality within 24 hours.

ศรีนวิชาการเกษตร