รูปแบบการผลิตขยายไวรัส NPV หนอนกระทู้ผักในระดับอุตสาหกรรม

Commercial Production of Common Cutworm *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus

อัจฉรา ตันติโชดก อิศเรส เทียนทัด สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาปริมาณเชื้อไวรัสที่ผลิตได้จากการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักในถาดเลี้ยงขนาด 98 ช่อง/ถาด โดยใช้ inoculum 3 อัตราที่ $3x10^6$, $6x10^6$และ $9x10^6$ PIB/ml ที่อัตรา 4 มล./ถาด พบว่าสามารถผลิตไวรัส SINPV ได้ $1.99x10^8$, $1.72x10^8$ และ $1.59x10^8$ PIB/ตัว ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อัตรา inoculum ต่ำที่ $3x10^6$ PIB/ml จะมีการตายของหนอนต่ำกว่าที่อัตรา $6x10^9$ และ $9x10^6$ PIB/ml แต่จะได้จำนวนผลึก NPV/หนอน 1 ตัวสูงกว่า

ทำการทดลองเลี้ยงขยายหนอนกระทู้ผัก เพื่อให้ได้ปริมาณมากโดยเลี้ยงเปรียบเทียบกันระหว่างภาชนะเลี้ยงแบบถาดขนาดช่องเลี้ยง 4x4 เซนติเมตร จำนวน 36 ช่อง/ถาด และขนาดช่องเลี้ยง 1.5x3.0 เซนติเมตร จำนวน 98 ช่อง/ถาด โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 3 วันที่ 1ในการเริ่มทดลองและเลี้ยงหนอนจำนวน 1 ตัวต่อ 1 ช่อง จากผลการทดลองพบว่า ภาชนะเลี้ยงขนาด 36 ช่อง/ถาด หนอนสามารถเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้ได้เฉลี่ย 88.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนภาชนะเลี้ยงขนาด 98 ช่อง/ถาด หนอนสามารถเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้ได้เฉลี่ย 90.8 เปอร์เซ็นต์

ได้ทำการทดลองผลิตขยายเชื้อไวรัส SINPV โดยใช้ภาชนะเลี้ยงแบบถาด ขนาดช่องเลี้ยง 1.5x3.0 เซนติเมตร จำนวน 98 ช่อง/ถาด โดยทำการทดลองหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อไวรัสอัตราต่างๆกัน จำนวน 3 อัตราความเข้มข้น ที่ $3x10^6$, $6x10^6$, $9x10^6$และ $1.2x10^7$ PIB/ml โดยหยดเชื้อจำนวน 3, 4 และ 5 มล./ถาด ลงบนผิวหน้าของอาหารเทียมแล้วใช้แปรงขนนกปัดให้เชื้อคลุมผิวหน้าอาหารเทียมทั่วทั้งถาดเลี้ยง ก่อนกดช่องเลี้ยงลงบนถาด โดยทดลองกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 หลังจากลอกคราบ 1 วัน และ 2 วัน ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อหนอนได้รับเชื้อไวรัส NPV จะเริ่มตายในวันที่ 6 ไปจนถึงวันที่ 14 ดังนั้นจึงวางแผนการทดลองตรวจนับผลการตายและตรวจนับปริมาณเชื้อไวรัสจากหนอนที่เป็นโรคตาย โดยใช้ระยะเวลา 10 วัน หลังจากปลูกเชื้อจากการทดลองใช้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 อายุ 1 วัน ใช้ inoculum ที่ $3x10^6$, $6x10^6$, $9x10^6$และ

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-04-02-02-51

$1.2x10^7$ PIB/ml ตรวจนับผลการตายของหนอนที่ทดลองระยะเวลา 10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ เมื่อใส่ inoculum 3 มล./ถาด พบหนอนตาย 62.24, 68.36, 82.65 และ 67.34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ใช้ inoculum 4มล./ถาด พบหนอนตาย 71.42, 78.59, 89.74 และ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้ inoculum 5 มล./ถาด พบหนอนตาย 81.63, 83.67, 94.89 และ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าในทุกอัตราความเข้มข้นของไวรัสที่นำมาปลูกเชื้อ การใช้ไวรัส SINPV ที่อัตรา 5 มล./ถาด จะให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนสูงกว่าที่อัตรา 3 และ 4 มล./ถาด

คำนำ

สืบเนื่องจากการก่อตั้งองค์การการค้าโลก (World Trade Organization) ระบบการค้าระหว่างประเทศได้เปลี่ยนแปลงไปในลักษณะระบบการค้าแบบเสรีภายใต้กรอบกติกาของ WTO และได้จัดทำความตกลงว่าด้วย การใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on the Application of Sanitary and Phyto-Sanitary Measures: SPS) ซึ่งหมายความว่าประเทศสมาชิกมีสิทธิที่จะใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชที่จำเป็นเพื่อคุ้มครองชีวิตและสุขภาพมนุษย์ สัตว์ หรือพืชที่ไม่ขัดกับบทบัญญัติทั่วไปของความตกลงและแนวปฏิบัติ ที่พัฒนาขึ้นมาโดยองค์การระหว่างประเทศที่เกี่ยวข้อง ทำให้ระบบการค้าระหว่างประเทศอยู่บนพื้นฐานของการแข่งขันที่เสรีและเป็นธรรมยิ่งขึ้นกว่าเดิม โดยมีการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชในรูปแบบของการกำหนดมาตรฐานคุณภาพสินค้า และกฎระเบียบต่างๆ ในด้านสุขอนามัยในการนำเข้าสินค้า โดยเฉพาะเรื่องสุขอนามัยที่มีผลกระทบโดยตรงต่อสุขภาพและชีวิตของผู้บริโภค มีการกำหนดปริมาณสารพิษตกค้าง สารปนเปื้อน ความสะอาดปลอดเชื้อโรคที่เป็นพิษภัยต่อผู้บริโภค อย่างไรก็ตามในขณะที่ประชาคมโลกกำลังตระหนักถึง อันตรายที่เกิดจากปริมาณสารพิษตกค้างในพืชผักและผลไม้ ตลอดถึงความปลอดภัยของผู้ใช้สารเคมีในการควบคุมศัตรูพืช ประเทศไทยซึ่งนับได้ว่าเป็นประเทศที่ผลิตอาหารเลี้ยงประชากรทั่วโลก มีปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรในระดับสูงขึ้นในแต่ละปี จากตัวเลขการนำเข้าของสารฆ่าแมลง ระยะเวลา 20 ปี พบว่ามีแนวโน้มสูงขึ้นตลอดมา ปัจจุบันมีปริมาณนำเข้าของสารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้นจากปี 2519 ถึง 5 เท่า ในปี 2541 มีการนำเข้าสารฆ่าแมลงเป็นจำนวน 7,745 ตัน มูลค่า 2,179 ล้านบาท การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเป็นส่วนสำคัญส่วนหนึ่งของการผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการเพิ่มผลผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก เกษตรกรได้คุ้นเคยกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงมานานมากกว่า 30 ปี เนื่องจากมีฤทธิ์รุนแรงและควบคุมความเสียหายจากแมลงศัตรูพืชได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ โดยไม่คิดถึงปัญหาที่ตามมา ปัจจุบันพบว่าแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจทุกชนิด สามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องพ่นสารฆ่าแมลงบ่อยครั้งขึ้น ใช้ชนิดของสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้นและใช้สารฆ่าแมลงหลายชนิด

พ่นพร้อมๆ กันในคราวเดียว เป็นสาเหตุทำให้เกษตรกรผู้ใช้สารฆ่าแมลงได้รับอันตราย เกิดพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงบนผลิตผล ตลอดถึงเกิดอันตรายต่อสุขภาพของผู้ใช้และผู้บริโภค และส่งผลกระทบต่อการส่งผลผลิตทางการเกษตรไปจำหน่ายต่างประเทศ ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของประชากร ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ ทั้งนี้งานค้นคว้าวิจัยจุลินทรีย์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้ค้นคว้าวิจัยเพื่อนำจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง โดยการค้นคว้าวิจัยเพื่อนำไวรัสชนิด Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV) ที่พบในประเทศไทยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อไป จุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย จึงปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมสูง โดยได้ผ่านการทดสอบจาก US Environmental Protection Agency ประเทศสหรัฐอเมริกาแล้ว ได้เป็นที่ยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าไวรัส NPV เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหลักร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดอื่นๆ ที่เหมาะสมในระบบการจัดการศัตรูพืช (Integrated Pest Management) กรมวิชาการเกษตรได้มีนโยบายที่จะลดความเสี่ยงของประชาชน และลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่สูงขึ้น จากการที่ไวรัส SeNPV, HaNPV และ SlNPV สามารถนำไปใช้ทดแทนสารฆ่าแมลงได้ดีในหลายพืช ทำให้ความต้องการใช้เชื้อไวรัส NPV ของหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตรและหน่วยงานราชการที่เกี่ยวข้องตลอดจนเกษตรกรเพิ่มมากขึ้น ขณะเดียวกันภาคธุรกิจเอกชนก็สนใจที่จะนำเทคโนโลยีดังกล่าวไปผลิตและขยายผลต่อไป

นอกจากนี้โครงการวิจัยเทคโนโลยีการผลิตขยายไวรัส NPV หนอนกระทู้ผักมุ่งวิจัยและพัฒนาประสิทธิภาพของสารชีวินทรีย์ชนิดนี้ให้ได้มาตรฐาน มีคุณภาพและมีระบบการผลิตเชิงอุตสาหกรรมที่สม่ำเสมอ เพื่อแข่งขันกับสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลายในท้องตลาด

วิธีดำเนินการ

ขั้นตอนที่ 1 การทดลองเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก โดยการใช้ภาชนะเลี้ยง 4 ขนาด คือ

1. ถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์
2. กล่องพลาสติกขนาด 15x22x4.5 เซนติเมตร
3. กล่องพลาสติกขนาด 19x28x10.5 เซนติเมตร
4. กล่องพลาสติกขนาด 27x26x8 เซนติเมตร

- เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก

- เปรียบเทียบผลผลิตของ%การเข้าดักแด้และดักแด้ที่สมบูรณ์ น้ำหนักดักแด้

ขั้นตอนที่ 2 การทดลองเปรียบเทียบอัตราการเลี้ยงหนอนต่อภาชนะเลี้ยง เพื่อได้ปริมาณหนอนที่เหมาะสมที่ได้ผลผลิตดักแด้ที่สมบูรณ์และมีน้ำหนักดี

- นำผลการทดลองจากขั้นตอนที่ 1 โดยนำภาชนะขนาดที่เหมาะสมมาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก

- เปรียบเทียบปริมาณอาหารเทียมต่อภาชนะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอน

- เปรียบเทียบปริมาณหนอนที่เหมาะสมต่อหน่วยพื้นที่ เช่น 1 ตัว/3 ตร.ซม., 1ตัว/6 ตร.ซม. 1ตัว/8 ตร.ซม. และ 1 ตัว/10 ตร.ซม.

ขั้นตอนที่ 3 ปรับสูตรอาหารเทียมเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงหนอน เพื่อลดต้นทุนการผลิตหนอน

ขั้นตอนที่ 4 เพิ่มขีดความสามารถในการผลิตไวรัส SINPV จากหนอนกระทู้ผัก

- ศึกษาอัตราความเข้มข้นของไวรัส SINPV ให้สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายในระยะเวลา 12-15 วัน ซึ่งหนอนมีขนาดตัวโตจะให้ผลึกไวรัสได้มาก

- ศึกษาขนาด (อายุ) ของหนอนที่เหมาะสมต่อการให้ผลผลิตไวรัส/ตัวได้สูงสุด โดยการใช้หนอนกระทู้ผักที่อายุ 7, 8, 9 และ 10 วัน มาทำการทดลอง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

ขั้นตอนที่1 ทดลองเลี้ยงหนอนกระทู้ผักสูตรมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบน้ำหนักหนอนขนาดโตเต็มที่และน้ำหนักดักแด้ที่อายุ 3 วัน

ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงหนอนกระทู้ผักในภาชนะที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 1 โดยทำการเปรียบเทียบจำนวนหนอนต่อภาชนะเลี้ยงและอัตราการใช้อาหารเทียมต่อภาชนะเลี้ยง เปรียบเทียบขนาดและน้ำหนักของหนอนและดักแด้

ขั้นตอนที่ 3 ปรับสูตรอาหารเทียมโดยเปรียบเทียบกับสูตรมาตรฐาน เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของหนอนโดยดูน้ำหนักของหนอนและน้ำหนักดักแด้และคิดค่าใช้จ่ายของอาหารเทียม

ขั้นตอนที่ 4

1. ทดลองใช้หนอนกระทู้ผักได้รับไวรัส SINPV ที่อัตราต่างๆ โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 อายุ 8 วัน ทดลอง เปรียบเทียบผลการตายของหนอนที่ระยะเวลา 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 วัน

2. ทดลองใช้หนอนอายุ 7, 8, 9, 10 วันได้รับเชื้ออัตราที่ได้จากการทดลองในข้อ 1 มาทดลองเปรียบเทียบระยะเวลาที่หนอนตาย เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนและปริมาณผลึกไวรัสที่อยู่ในซากหนอน

การบันทึกข้อมูล

ขั้นตอนที่ 1 บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต น้ำหนักหนอนโตเต็มที่ น้ำหนักดักแด้และเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้

ขั้นตอนที่ 2 บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ขนาดของหนอน น้ำหนักของหนอนโตเต็มที่ น้ำหนักดักแด้และเปอร์เซ็นต์การดักแด้

ขั้นตอนที่ 3 บันทึกการเจริญเติบโตและเปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ของหนอนที่เลี้ยงบนอาหาร เทียมแต่ละสูตรค่าใช้จ่ายของอาหารเทียมแต่ละสูตร

ขั้นตอนที่ 4 บันทึกระยะเวลาที่หนอนตาย เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนและปริมาณผลึกไวรัสในซากหนอนตาย

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ทำการทดลองเลี้ยงขยายหนอนกระทู้ผัก เพื่อให้ได้ปริมาณมากโดยเลี้ยงเปรียบเทียบกันระหว่างภาชนะเลี้ยงแบบถาดขนาดช่องเลี้ยง 4x4 เซนติเมตร จำนวน 36 ช่อง/ถาด และขนาดช่องเลี้ยง 1.5x3.0 เซนติเมตร จำนวน 98 ช่อง/ถาด โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 3 วันที่ 1ในการเริ่มทดลองและเลี้ยงหนอนจำนวน 1 ตัวต่อ 1 ช่อง จากผลการทดลองพบว่า ภาชนะเลี้ยงขนาด 36 ช่อง/ถาด หนอนสามารถเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้ได้เฉลี่ย 88.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนภาชนะเลี้ยงขนาด 98 ช่อง/ถาด หนอนสามารถเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้ได้เฉลี่ย 90.8 เปอร์เซ็นต์

ได้ทำการทดลองผลิตขยายเชื้อไวรัส SINPV โดยใช้ภาชนะเลี้ยงแบบถาด ขนาดช่องเลี้ยง 1.5x3.0 เซนติเมตร จำนวน 98 ช่อง/ถาด โดยทำการทดลองหาอัตราความเข้มข้นของเชื้อไวรัสอัตราต่างๆกัน จำนวน 3 อัตราความเข้มข้น ที่ $3x10^6$, $6x10^6$, $9x10^6$และ $1.2x10^7$ PIB/ml โดยหยดเชื้อจำนวน 3, 4 และ 5 มล./ถาด ลงบนผิวหน้าของอาหารเทียมแล้วใช้แปรงขนนกปัดให้เชื้อคลุมผิวหน้าอาหารเทียมทั่วทั้งถาดเลี้ยง ก่อนกดช่องเลี้ยงลงบนถาด โดยทดลองกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 หลังจากลอกคราบ 1 วัน และ 2 วัน ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อหนอนได้รับเชื้อไวรัส NPV จะเริ่มตายในวันที่ 6 ไปจนถึงวันที่ 14 ดังนั้นจึงวางแผนการทดลองตรวจนับผลการตายและตรวจนับปริมาณเชื้อไวรัสจากหนอนที่เป็นโรคตาย โดยใช้ระยะเวลา 10 วัน หลังจากปลูกเชื้อ จากการทดลองใช้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 อายุ 1 วัน ใช้ inoculum ที่ $3x10^6$, $6x10^6$, $9x10^6$และ $1.2x10^7$ PIB/ml ตรวจนับผลการตายของหนอนที่ทดลองระยะเวลา 10 วัน หลังจากได้รับเชื้อ เมื่อใส่ inoculum 3 มล./ถาด พบหนอนตาย 62.24, 68.36, 82.65 และ 67.34 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ใช้ inoculum 4มล./ถาด พบหนอนตาย 71.42, 78.59, 89.74 และ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ใช้ inoculum 5 มล./ถาด พบหนอนตาย 81.63, 83.67, 94.89 และ 85.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

พบว่าในทุกอัตราความเข้มข้นของไวรัสที่นำมาปลูกเชื้อ การใช้ไวรัส SINPV ที่อัตรา 5 มล./ถาด จะให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนสูงกว่าที่อัตรา 3 และ 4 มล./ถาด

การศึกษาปริมาณเชื้อไวรัสที่ผลิตได้จากการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักในถาดเลี้ยงขนาด 98 ช่อง/ถาด โดยใช้ inoculum 3 อัตราที่ $3x10^6$, $6x10^6$และ $9x10^6$ PIB/ml ที่อัตรา 4 มล./ถาด พบว่าสามารถผลิตไวรัส SINPV ได้ $1.99x10^8$, $1.72x10^8$ และ $1.59x10^8$ PIB/ตัว ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อัตรา inoculum ต่ำที่ $3x10^6$ PIB/ml จะมีการตายของหนอนต่ำกว่าที่อัตรา $6x10^9$ และ $9x10^6$ PIB/ml แต่จะได้จำนวนผลึก NPV/หนอน 1 ตัวสูงกว่า