การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย โดยเทคนิค PCR

The Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains in Thailand by PCR Identification

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรส เทียนทัด สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

จากคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักได้มากกว่า 80% จำนวน 11 และ 153 isolate ตามลำดับ นำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าโคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB 72 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งหมดสร้างผลึกโปรตีนเป็นรูป พีระมิดคู่ (Bipyramid) ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ ปะปนกัน และเชื้อบางไอโซเลท มีผลึกโปรตีนทั้งรูป bipyramid และ rhomboid ปะปนกัน เมื่อนำไปทดสอบกับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่า ไม่มี isolate ใดสามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 80% มี 63 isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายตั้งแต่ 80% ทดลองนำเชื้อ 5 isolate ไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis พบว่าเชื้อทั้ง 5 isolate มี *cry* โปรตีนเป็นชนิด *Cry 1AC* ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อได้ดี

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-03-01-54

คำนำ

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติพิเศษที่สามารถสร้างสาร toxin ภายในเซลล์พร้อมๆ กับการสร้าง spore สาร toxin นี้มีคุณสมบัติทำลายแมลงศัตรูพืชหลายชนิดได้ดี โสธร (2512) ได้รายงานว่าเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำมาใช้ควบคุมหนอนใยผัก *Plutella xylostella* และหนอนคืบกะหล่ำปลี *Trichoplusia ni* ซึ่งดื้อต่อสารฆ่าแมลง ต่อมาได้มีการนำ Bt สายพันธุ์ใหม่ๆ เช่น *aizawai* สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้กว้างขวางขึ้น (อัจฉรา, 2539) จากปัญหาของหนอนใยผักดื้อต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้กสิกรต้องใช้สารเคมีกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้น พิษตกค้างของสารฆ่าแมลงบนพืชผักจึงมีสูงขึ้น ผู้บริโภคประสบอันตรายจากสารพิษบนพืชผักเพิ่มมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2527) ได้นำBt ที่ผลิตได้มาควบคุมหนอนใยผักบนกะหล่ำปลีอย่างได้ผล วินัย (2533) ได้นำ Bt ไปใช้ในการบริหารแมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำ โดยนำไปใช้ลดและทดแทนสารฆ่าแมลง และได้มีการแนะนำให้ใช้ Bt ควบคุมแมลงศัตรูผักมากขึ้น อัจฉราและคณะ (2536) นำ Bt มาใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อศัตรูส้มเขียวหวานได้ 3 ชนิด คือ หนอนแปะใบส้ม หนอนผีเสื้อกินใบส้ม และหนอนเจาะสมอฝ้าย การนำ Bt ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชช่วยลดปัญหาผลกระทบของสารฆ่าแมลงและพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงได้เป็นอย่างดี

การคัดเลือกสายพันธุ์ Bt จากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย นอกจากจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่เป็นข้อมูลของความหลากหลายทางชีวภาพแล้ว อาจได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และสามารถทำลายแมลงได้มากชนิดขึ้นอีกด้วย เนื่องจากเชื้อ Bt แต่ละสายพันธุ์สร้างโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อแมลงศัตรูพืชต่างชนิดกัน ซึ่งการสร้างนี้ถูกควบคุมโดยยีนที่ต่างกัน Höfte และ Whiteley (1989) จึงได้จัดระบบอนุกรมวิธานของโปรตีนและยีนที่ควบคุมแต่ละชนิดว่า “*cry*” และเรียกโปรตีนที่สร้างขึ้นว่า “Cry” การ ในการจำแนกสายพันธุ์ของ Bt โดยการศึกษารูปร่างลักษณะของผลึกโปรตีนของสารพิษ (toxin) จากกล้องจุลทรรศน์ electron microscope การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ Bt ในปัจจุบันได้นำเทคนิคทางด้านอิมมูโน (H-antigen) เทคนิคทางชีวเคมี (Barjac และ Frachon, 1990) และเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ โดย Chak และคณะ (1994) รายงานการศึกษาการจำแนกเชื้อ Bt จากดินด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ specific oligonucleotide primer สามารถค้นพบเชื้อ Bt จำนวน 225 ชนิด (isolates) ด้วยต้นทุนและแรงงานที่ต่ำ สามารถจำแนกเชื้อ Bt ที่มียีน *cry* แตกต่างกัน 6 ชนิด ประกอบด้วย *cry* 1 A(a), *cry* 1 A(b), *cry* 1 A(c), *cry* 1 C, *cry* 1 D และ *cry* 4

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์
2. ตู้เขี่ยเชื้อ
3. กล้องจุลทรรศน์
4. เครื่องแยกเชื้อบริสุทธิ์ (centrifuge)

5. เครื่องผสมอาหารเทียม
6. เครื่อง PCR
7. เครื่อง electrophoresis
8. สารเคมีผลิตอาหารเทียม
9. สารเคมีเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย บีที
10. สารเคมีทำ PCR

วิธีการ

การเพาะเลี้ยงแมลงอาศัยของเชื้อ Bt

1. เก็บหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม จากแปลงปลูกพืชมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมสูตรของกรมวิชาการเกษตร จนครบวงจรชีวิต

2. เพาะเลี้ยงหนอนศัตรูพืช ให้อยู่ในวัย 2 (อายุประมาณ 3 วัน) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดแมลงของเชื้อ Bt

การทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้หนอนตาย

1. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของกรมวิชาการเกษตร ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมตายตั้งแต่ 80% ขึ้นไป

2. นำเชื้อ Bt ที่ได้มาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวๆ ไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA เพื่อเพิ่มปริมาณ บ่มเชื้อในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างผลึกโปรตีน นำไปตรวจสอบผลึก หรือการปนเปื้อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. นำเชื้อที่ได้ไปตรวจสอบความเข้มข้นและปรับความเข้มข้น

4. นำเชื้อ Bt แต่ละ isolate มาทดสอบโดยหยดเชื้อบนอาหารเทียม นำไปใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก ใส่หนอนที่ต้องการทดสอบหลอดละ 1 ตัว ปิดฝา โดยทดสอบหนอนจำนวน 30 ตัวต่อเชื้อ 1 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเชื้อบีทีที่ผลิตเป็นการค้า

5. บันทึกข้อมูลจำนวนหนอนตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์และสรุปผล

การจำแนกสายพันธุ์โดยเทคนิคพีซีอาร์

1. ใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 คู่ ที่สามารถจำแนก cry ต่างๆ ได้แก่ cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1I, cry2 และ cry3

2. นำเชื้อ Bt ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 80% ขึ้นไป มาสกัดดีเอ็นเอ

3. ทำ PCR โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1 µl DNA, 12.5 µl PCR mixture, primers จำนวน 2 สาย สายละ 1.25 µl และ Dye 2.5 µl

4. นำดีเอ็นเอ ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation	ที่ 94°C	5 นาที	
Denaturation	ที่ 94°C	1 นาที	30 รอบ
Annealing	ที่ 54°C	5 นาที	
Extension	ที่ 72°C	1 นาที	
Final extension	ที่ 72°C	10 นาที	

จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย gel วิเคราะห์ผล

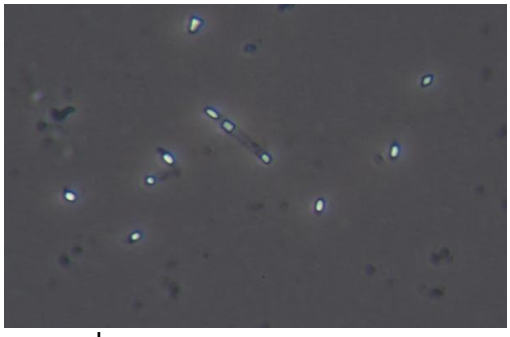
5. นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง

เวลาและสถานที่ ตุลาคม 2553-กันยายน 2556 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

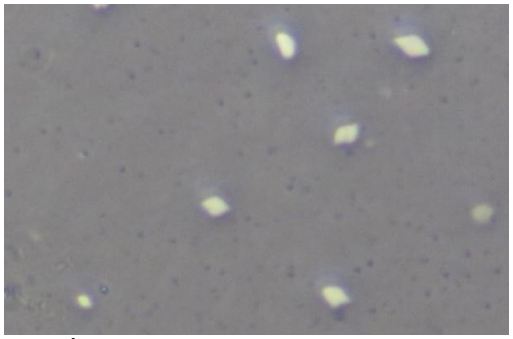
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

คัดเลือกเชื้อ Bt ของกรมวิชาการเกษตร ได้เชื้อที่ทำให้หนอนตายตั้งแต่ 80% โดยทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 153 isolate และหนอนกระทู้หอมตาย 11 isolate เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมในห้องปฏิบัติการโดยใช้อาหารเทียม นำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 164 isolate มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จะได้โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหาร NB 72 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อสร้างผลึกโปรตีน ตรวจสอบผลึกของแต่ละ isolate ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อทั้งหมดสร้างผลึกโปรตีนเป็นรูป พีระมิดคู่ (Bipyramid) ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ ปะปนกัน และเชื้อบางไอโซเลทมีผลึกโปรตีนทั้งรูป bipyramid และ rhomboid ปะปนกัน เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้หอม วัย 2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและเชื้อ Bt ทางการค้า พบว่าเชื้อที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตาย 0-25% 25.01-50% 50.01-75% และ 75.01-100% มีจำนวน 20 11 19 และ 104 isolate ตามลำดับ โดยมีเชื้อ 63 ไอโซเลทที่ทำให้หนอนตายมากกว่า 80%

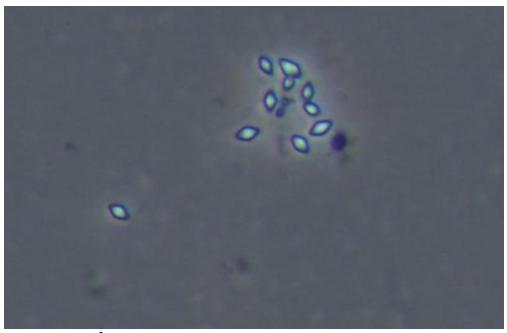
ภาพที่ 1 ผลึก Bt อยู่ภายในเซลล์



ภาพที่ 2 ผลึก Bt และสปอร์อยู่ภายในเซลล์



ภาพที่ 3 ผลึก Bt



ภาพที่ 4 ผลึก Bt

นำเชื้อ Bt จำนวน 5 isolate ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก มาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 6 คู่ ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นทำดีเอ็นเอเสียสภาพที่อุณหภูมิ 94°C 1 นาที ทำให้ไพรเมอร์จับกับสายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 54° C 5 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่อุณหภูมิ 72°C 1 นาที จำนวน 30 รอบ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ อุณหภูมิ 72°C 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำไปตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ DNA Marker ขนาด 100 bp จะได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 230-250 bp พบว่า *cry* โปรตีนเป็นชนิด *Cry 1AC* ซึ่งสามารถควบคุมแมลงในอันดับ Lepidoptera ได้ดี

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการศึกษาโคโลนีของเชื้อ Bt พบว่ามีสีขาวขุ่น ผิวด้าน ขอบไม่เรียบ ขนาดประมาณ 0.5-0.8 เซนติเมตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร NB 72 ชั่วโมง และตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อทั้งหมดสร้างผลึกโปรตีนเป็นรูป พีระมิดคู่ (Bipyramid) ขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ปะปนกัน และเชื้อบางไอโซเลท มีผลึกโปรตีนทั้งรูป bipyramid และ rhomboid ปะปนกัน

เชื้อ *Bt* ของกรมวิชาการเกษตรที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมได้มากกว่า 80% จำนวน 11 isolate เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้หอมวัย 2 พบว่า ไม่มี isolate ใดสามารถทำให้หนอนตายมากกว่า 80% ส่วนหนอนกระทู้ผักนำเชื้อ Bt จำนวน 153 isolate มาทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 พบว่ามี 104 isolate ที่ทำให้หนอนตายตั้งแต่ 75.01% และมี 63 ไอโซเลท ที่ทำให้ทำให้หนอนตายมากกว่า 80% เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี PCR จำนวน 5 isolate พบว่าเชื้อทั้ง 7 isolate มี *cry* โปรตีนเป็นชนิด *Cry 1AC* ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถควบคุมหนอนผีเสื้อได้ดี

เอกสารอ้างอิง

โสธร ประเสริฐผล. 2512. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อจุลินทรีย์. กสิกร 42(3) : 289-305.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2539. แบคทีเรียควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารทางวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 163-182.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2527. การศึกษาความคงทนของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บนกะหล่ำปลีในสภาพไร่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย ปี 2527. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 110-114.

อัจฉรา ตันติโชดก. อุทัย เกตุนุติ. 2537. ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียสูตรผงละลายน้ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมบนองุ่น. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2537. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 22-29.

Bourque, S.N, J.R. Valero, J. Mercier, M.C. Lavoie and R.C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 59:523-527.

Chak, K.F., D.C. Chao, M.Y. Tseng, S.S. Kao, S.J. Tuan and T.Y. Feng. 1994. Determination and distribution of *cry* – type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 60:2415-2420.

Hofte, H., H.R. whiteley. 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. Microbial. Rev. 53:242-25.