ศึกษาชีววิทยาของโปรโตซัวที่เข้าทำลายระบบการเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัส Nucleopolyhedrovirus และการควบคุม

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

ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรส เทียนทัด สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี รัตนา นชะพงศ์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่ติดเชื้อโปรโตซัว โดยจะมีลำตัวสีซีดมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาต่างๆ จากนั้นทำ sucrose gradient centrifugation สามารถแยกเศษซากหนอน และเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ทำให้เชื้อโปรโตซัวบริสุทธิ์ ทำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 x 10^7 PIBs/ml การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวน้อยที่สุด คือ 38.75 x 10^7 PIBs/ml แต่กรรมวิธีอื่นๆ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ การใช้ความเร็วรอบ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด การศึกษาปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ พบว่าหนอนกระทู้ผักวัย 2 ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 15-19 วัน วัย 3 11-13 วัน วัย 4 7-12 วัน และวัย 5 ประมาณ 6 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.2186 – 0.3600 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ส่วนรุ่นลูกพบว่าหนอนวัย 2 (F1) ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 8-16 วัน วัย 3 (F1) 13-16 วัน วัย 4 (F1) 10-13 วัน และวัย 5 (F1) ประมาณ 11-13 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักระหว่างวัยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.3069 – 0.3968 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่น

รหัสการทดลอง **03-04-54-01-02-01-06-54**

เดียวกัน ส่วนหนอนกระทู้ผักวัย 2 ที่กินเชื้อโปรโตซัวความเข้มข้น $1x10^8$ และ $1x10^8$ (cell/ml) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงรุ่นลูก (F1) ได้ จากการตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากมูลหนอนพบเชื้อโปรโตซัวในปริมาณน้อยมาก และหนอนที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหนอนปกติ แต่ลำตัวจะมีสีซีดกว่าปกติ และควรทำการศึกษาผลของโปรโตซัวต่อหนอนในรุ่นต่อๆ ไป และศึกษาวิธีควบคุมเชื้อโปรโตซัวในการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัสเอ็นพีวี

คำนำ

หนอนกระทู้ผักหรือหนอนกระทู้ยาสูบ เดิมพบระบาดเป็นครั้งคราวในไร่ข้าวโพด ทำความเสียหายในขณะข้าวโพดยังเล็กอยู่ และเป็นศัตรูสำคัญของฝ้ายและยาสูบในประเทศไทย แต่ปัจจุบันนี้หนอนกระทู้ผักมีความสำคัญมากและมีแนวโน้มจะระบาดรุนแรงในอนาคต เนื่องจากเป็นหนอนผีเสื้อกลางคืนที่มีขนาดกลาง 3 - 4 เซนติเมตร แม่ผีเสื้อวางไข่เป็นกลุ่มนับร้อยฟอง เมื่อฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม และเริ่มแยกย้ายออกจากกลุ่มไปทำลายส่วนต่าง ๆ ของพืช ในพืชผักสามารถทำลายได้ทุกส่วนของพืช (กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ, 2542) นอกจากนี้ยังพบระบาดในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ฝ้าย พริก ผักตระกูลกะหล่ำ ทานตะวัน ถั่วลิสง ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ละหุ่ง ข้าว ข้าวโพด ยาสูบ ส้ม สตรอเบอร์รี่ กุหลาบ มันเทศ มะเขือเทศ เป็นต้น (กองกีฏและสัตววิทยา, 2544) ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานว่าหนอนผีเสื้อชนิดนี้เข้าทำลายในพืชเศรษฐกิจมากกว่า 80 ชนิด (Okada, 1981) และที่สำคัญหนอนกระทู้ผัก ซึ่งเป็นหนอนในสกุล *spodoptera* จัดว่าเป็นแมลงในสกุลที่มีความสามารถในการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้อย่างรวดเร็วและดีที่สุดเมื่อเทียบกับแมลงในสกุลอื่น (El-Guindy *et al*., 1982) ไวรัส เอ็น พี วี หนอนกระทู้ผัก จัดอยู่ในวงศ์ *Baculoviridae* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการก่อให้เกิดโรคเฉพาะกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังใน phylum Arthropod เท่านั้น (Murphy *et al*.,1995) ในประเทศไทยพบไวรัสเอ็น พี วี หนอนกระทู้ผัก (SlNPV) ครั้งแรกเมื่อ พ.ศ. 2535 ที่อำเภอหนองเสือ จังหวัดปทุมธานี โดยคุณอุทัย เกตุนุติ นักกีฏวิทยา กรมวิชาการเกษตร และนำไวรัสดังกล่าวมาเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการและศึกษาวิจัยเรื่อยมา ปัจจุบันพบว่าสามารถใช้กำจัดหนอนกระทู้ผักได้เป็นอย่างดีในสภาพไร่ และเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับการแนะนำให้ใช้ในการควบคุมหนอนกระทู้ผักในพืชหลายชนิด ปัจจุบันได้มีการผลิตขยายไวรัสเอ็นพี วี หนอนกระทู้ผักภายในโรงงานต้นแบบการผลิตไวรัส เอ็น พี วี ควบคุมแมลงศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร

โดยหลักการแล้วไวรัส NPV จะทำให้ตัวอ่อนของแมลงในตระกูลผีเสื้อตายจากการเกิดโรคและเกิดการแพร่ระบาดไปสู่ประชากรของหนอน โดยการถ่ายทอดไปทางไข่ของแม่ผีเสื้อ ดังนั้นการผลิตไวรัสต้องแยกอาคารที่ผลิตแมลงอาศัยออกจากอาคารที่ผลิตขยายเชื้อไวรัส แต่เนื่องจากมีพื้นที่จำกัดทำให้ต้องเลี้ยงแมลงอาศัยและผลิตขยายเชื้อไวรัสในอาคารเดียวกันแต่แยกชั้น ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตขยายเชื้อไวรัสจึงมีปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและโปรโตซัวซึ่งสามารถถ่ายทอดโรคโดยผ่านทางไข่ เริ่มแสดงอาการในหนอนรุ่นที่ 2 และเกิดการระบาดรุนแรงในหนอนรุ่นที่ 3 ทำให้ผลผลิตไวรัส NPV ที่ได้มีการปนเปื้อนสปอร์ของโปรโตซัว ซึ่งส่งผลกระทบโดยตรงต่อคุณภาพของไวรัสที่ผลิตได้ (อุทัย และคณะ, 2543) การผลิตไวรัส SlNPV

ในเชิงพาณิชย์ ยังประสบปัญหาของการปนเปื้อนของเชื้อโปรโตซัว (*Nosema* sp.) ในระบบการผลิตหนอนกระทู้ผัก เพื่อนำไปใช้ผลิตเชื้อไวรัส SlNPV ทำให้ไม่สามารถทำการผลิตหนอนกระทู้ผักได้อย่างต่อเนื่อง การหาวิธีการควบคุมไม่ให้เกิดการระบาดของเชื้อโปรโตซัว จึงมีความสำคัญยิ่งต่อระบบการผลิตเชื้อไวรัส SlNPV ของหนอนกระทู้ผัก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์แยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ ได้แก่ sieve ขนาด 150 micrometer เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เครื่อง ultra centrifuge น้ำตาล sucrose

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างแมลง ได้แก่ ขวดดอง ถุงพลาสติก ปากคีบ ตะกร้า กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 19x28x11 เซนติเมตร

3. อุปกรณ์ทำสไลด์ ได้แก่ แผ่นสไลด์ แผ่นปิดสไลด์ เข็มเขี่ยเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ น้ำกลั่น haemacytometer

4. อุปกรณ์จำแนกสัณฐานวิทยาของเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์พร้อมชุดบันทึกภาพ กล้องบันทึกภาพ

5. อุปกรณ์เพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก ได้แก่ กล่องเลี้ยงแมลงขนาด 22x15x5 เซนติเมตร โถแก้ว ขันผ้าขาวบาง ยางรัด ปากคีบ น้ำผึ้ง น้ำกลั่น พู่กัน

6. อุปกรณ์ทำอาหารเทียม ได้แก่ เครื่องปั่นผสมอาหาร วุ้น ถั่วเขียว วิตามิน สารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

วิธีการ

1. ศึกษาวิธีการแยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อโปรโตซัวในห้องปฏิบัติการ นำหนอนที่ได้มาบดในน้ำกลั่น นำสารแขวนลอยที่ได้มากรองด้วย sieve ขนาด 150 micrometer เพื่อแยกเอาเนื้อเยื่อหนอนออก นำของเหลวส่วนบนที่ได้มาแบ่งเป็นส่วนๆ นำไปปั่นที่ความเร็วรอบต่างๆ ดังนี้

1 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที
2 อัตราความเร็ว 1,000 RPM 3 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที
3 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 10 นาที
4 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 2,000 RPM 20 นาที
5 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 10 นาที
6 อัตราความเร็ว 1,500 RPM 5 นาที และ 3,000 RPM 20 นาที

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

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

จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยเครื่อง ultra centrifuge โดยวิธี sucrose gradient centrifugation ที่ 24,000 RPM 30 นาที นำเชื้อโปรโตซัวที่ปั่นแยกได้มาตรวจนับความเข้มข้นของสปอร์เชื้อโปรโตซัวในแต่กรรมวิธี ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด haemacytometer ใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกข้อมูลปริมาณสปอร์เชื้อโปรโตซัวที่นับได้ ลักษณะของตะกอนเชื้อโปรโตซัวที่ได้ คำนวณหาค่าเฉลี่ยนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

2. ศึกษารูปร่าง ลักษณะของโปรโตซัวในหนอนกระทู้ผัก

นำตะกอนของตัวอย่างโปรโตซัวที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 ไปเจือจางในน้ำเล็กน้อย เตรียมตัวอย่างย้อมสีบนสไลด์ ศึกษารูปร่าง ลักษณะโปรโตซัว ภายใต้กล้องใต้กล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพ ข้อมูลรูปร่าง ลักษณะของเชื้อโปรโตซัว

3. ศึกษาปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 6 กรรมวิธี 4 ซ้ำ

กรรมวิธีที่ 1 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{2}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 2 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{4}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 3 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{6}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 4 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{8}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 5 ความเข้มข้นของโปรโตซัว $1x10^{10}$ cell/ml

กรรมวิธีที่ 6 น้ำกลั่น

คัดเลือกหนอนกระทู้ผักวัย 1 ที่ปราศจากเชื้อโปรโตซัวจำนวน 1 ตัวต่อถ้วย ซ้ำละ 5 ถ้วย ให้หนอนอดอาหาร 24 ชั่วโมง เตรียมอาหารเทียมตามกรรมวิธีต่างๆ ที่กำหนด เทอาหารเทียมในถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ นำไปเลี้ยงหนอนที่เตรียมไว้ โดยใช้เชื้อโปรโตซัวที่ปั่นแยกได้หยดลงบนผิวหน้าอาหารเทียม (diet plug method) 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 ถ้วย ย้ายหนอนไปเลี้ยงในอาหารเทียมแต่ละกรรมวิธี จากนั้นชั่งน้ำหนักหนอนทุก 24 ชั่วโมง บันทึกระยะเวลาการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก เปอร์เซ็นต์การเข้าดักแด้ และตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากสารคัดหลั่งของหนอนแต่ละตัว และปฏิบัติการทดลองเช่นเดียวกันในหนอนกระทู้ผักวัย 2, 3, 4 และ 5

เมื่อดักแด้ของหนอนกระทู้ผักวัย 2 - 5 กลายเป็นตัวเต็มวัย จับคู่ผีเสื้อในโหลแก้ว ให้น้ำหวานและความชื้น เพาะเลี้ยงผีเสื้อให้วางไข่ จากนั้นเก็บไข่ผีเสื้อแต่ละวัยมาเพาะเลี้ยง บันทึกน้ำหนัก ระยะเวลาในการ

เจริญเติบโตของหนอนแต่ละวัย นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากสารคัดหลั่งของหนอนแต่ละตัว

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการแยกเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์

จากการคัดเลือกหนอนกระทู้ผักที่แสดงอาการติดเชื้อโปรโตซัว โดยลำตัวมีสีผิดปกติ ขาวซีด นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาต่างๆ เพื่อทำเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ และใช้น้ำตาลซูโครส ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์และเศษซากหนอนที่เหลืออยู่ ทำให้ได้เชื้อโปรโตซัวที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมานับจำนวนโปรโตซัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ ผลการปั่นเหวี่ยงเชื้อโปรโตซัว ที่ความเร็วรอบและระยะเวลาต่างๆ

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

จากตารางจะพบว่าการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 x10^7 PIBs/ml การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 20 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวน้อยที่สุด คือ 38.75 x10^7 PIBs/ml ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำเชื้อโปรโตซัวให้บริสุทธิ์ได้ แต่ทุกกรรมวิธี ไม่มีแตกต่างทางสถิติ การใช้ความเร็วรอบ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด

2. ศึกษาปริมาณเชื้อโปรโตซัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ

จากการทดสอบเชื้อโปรโตซัวกับหนอนกระทู้ผัก วัย 1 ไม่สามารถบันทึกผลการทดลองได้ เนื่องจากหนอนกระทู้ผักวัย 1 มีขนาดเล็ก อ่อนแอ เมื่อมีการเขี่ย หรือเคลื่อนย้ายหนอนหลายครั้ง หนอนกระทู้ผักตายเป็นจำนวนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถชั่งน้ำหนักหนอนได้เพราะมีขนาดเล็กประมาณ 1.5-2 มิลลิเมตร แม้จะใช้เครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง จึงทำการทดสอบหนอนกระทู้ผักวัย 2 -5 เชื้อโปรโตซัวความเข้มข้น 1x10^2 1x10^4 1x10^6 1x10^8 และ 1x10^{10} cell/ml กับหนอนกระทู้ผักวัยต่างๆ โดยให้หนอนกินอาหารเทียมที่มีเชื้อโปรโตซัว ได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 2 การเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่างๆ

ปริมาณเชื้อโปรโตซัว (cell/ml)	อายุเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักก่อนเข้าดักแด้ (วัน)				น้ำหนักเฉลี่ยของดักแด้ (กรัม)			
	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5
น้ำกลั่น	14.50	11.50	7.55	5.50	0.3360	0.3516	0.2897	0.2884
1x10^2	16.40	11.55	11.55	5.50	0.3600	0.3457	0.3457	0.2714
1x10^4	15.90	12.20	7.05	5.85	0.3348	0.3305	0.2586	0.2977
1x10^6	14.70	10.95	7.20	5.85	0.3551	0.3503	0.2937	0.2837
1x10^8	18.25	10.40	7.15	5.90	0.2862	0.3304	0.2946	0.2810
1x10^{10}	19.00	11.25	6.80	5.30	0.2816	0.3504	0.2790	0.2649

จากตารางพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวที่ความเข้มข้นต่างๆ วัย 2 ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 15-19 วัน วัย 3 11-13 วัน วัย 4 7-12 วัน และวัย 5 ประมาณ 6 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.2186 – 0.3600 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 รุ่น ลูก (F1) ที่ได้รับเชื้อปริมาณต่างๆ

ปริมาณเชื้อโปรโตซัว (cell/ml)	อายุเฉลี่ยของหนอนกระทู้ผักก่อนเข้าดักแด้ (วัน)				น้ำหนักเฉลี่ยของดักแด้ (กรัม)			
	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5	วัย 2	วัย 3	วัย 4	วัย5
น้ำกลั่น	11.65	12.85	9.90	11.15	0.3575	0.3464	0.3883	0.3564
$1x10^{2}$	15.80	14.17	11.55	12.10	0.3319	0.3069	0.3921	0.3416
$1x10^{4}$	12.63	12.55	10.35	11.65	0.3729	0.3510	0.3292	0.3311
$1x10^{6}$	8.00	12.56	11.40	11.15	0.3480	0.3419	0.3606	0.3535
$1x10^{8}$	-	15.21	11.60	10.95	-	0.3648	0.3968	0.3534
$1x10^{10}$	-	12.90	12.25	10.85	-	0.3436	0.3802	0.3483

จากตารางพบว่าหนอนกระทู้ผักที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเริ่มบันทึกผลเมื่อหนอนอายุประมาณ 4 -5 วัน (อยู่ในวัย 2) พบว่าหนอนวัย 2 (F1) ใช้เวลาการเจริญเติบโตในระยะหนอนก่อนเข้าดักแด้ประมาณ 8-16 วัน วัย 3 (F1) 13-16 วัน วัย 4 (F1) 10-13 วัน และวัย 5 (F1) ประมาณ 11-13 วัน ซึ่งในแต่ละวัยระยะเวลาในการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักระหว่างวัยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนน้ำหนักดักแด้เฉลี่ยของหนอนทุกวัยอยู่ที่ 0.3069 – 0.3968 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน ส่วนหนอนกระทู้ผักวัย 2 ที่กินเชื้อโปรโตซัวความเข้มข้น $1x10^{8}$ และ $1x10^{8}$ (cell/ml) ไม่สามารถเพาะเลี้ยงรุ่นลูก (F1) ได้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบและเวลาเหมาะสม และวิธี sucrose gradient centrifugation สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัวบริสุทธิ์ได้ การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,500 rpm 5 นาที และ 5,000 rpm 10 นาที ได้เชื้อโปรโตซัวมากที่สุด คือ 61.11 x 10^7 PIBs/ml แต่การปั่นเหวี่ยงที่ 1,000 rpm 3 นาที และ 2,000 rpm 10 นาที จะเป็นกรรมวิธีที่ประหยัดและสิ้นเปลืองเวลาน้อยที่สุด เหมาะกับการนำไปใช้งานต่อไป

การศึกษาผลของเชื้อโปรโตซัวต่อการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผักวัย 1 ไม่สามารถทำการทดลองได้เนื่องจากหนอนมีขนาดเล็ก อ่อนแอ และตายได้ง่าย ทำการทดลองหนอนกระทู้ผักวัย 2 3 4 และ 5 ที่ปริมาณเชื้อโปรโตซัวความเข้มข้นต่างๆ มีระยะเวลาในการเจริญเติบโตในระยะหนอน ไม่แตกต่างกันในแต่ละวัย และน้ำหนักดักแด้ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกับในรุ่นลูก (F1)

จากการตรวจสอบเชื้อโปรโตซัวจากมูลหนอนพบเชื้อโปรโตซัวในปริมาณน้อยมาก และหนอนที่ได้รับเชื้อโปรโตซัวสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้เช่นเดียวกับหนอนปกติ แต่ลำตัวจะมีสีซีดกว่าปกติ และควรทำการศึกษาผลของโปรโตซัวต่อหนอนในรุ่นต่อๆ ไป และศึกษาวิธีควบคุมเชื้อโปรโตซัวในการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัสเอ็นพีวี

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบุคลากรในอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือ ความร่วมมือ และอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูผักไม้ดอกและไม้ประดับ. 2542. แมลงศัตรูผัก. เอกสารวิชาการ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 32.

กองกีฏและสัตววิทยา. 2544. เทคโนโลยีทางเลือกสำหรับ ไอ พีเอ็ม. *ใน* รายงานผลการดำเนินงาน การป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน ครั้งที่ 4 วันที่ 29-31 สิงหาคม 2544. โรงแรมรีเจนท์ชะอำ ชะอำ เพชรบุรี. 309 หน้า.

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

El – Guidny, M.A., Madi, S.M. , Keddis, M.E., lssa, Y.H. and Abdel – Sattar, M.M. 1982. Development of resistance to pyrethroids in field populations of the Egyptian Cotton Leafworm *Spodoptera litturalis* (Boisd.). International Pest Control 124: 6 – 11.

Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. 1995. Virus taxonomy: Sixth report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses Springer-Verlag, New York.

Okada, M.1981. Utilization and Mass Production of *Spodoptera litura* Nuclear Polyhedrosis Virus for control of the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* Fabricius.