ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ของหนอนกระทู้หอม

Resistance Development to *Bacillus thuringiensis* of the Beet Armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner)

อิศเรส เทียนทัด สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ภัทรพร สรรพนุเคราะห์

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมจากพื้นที่ปลูกหอมหัวใหญ่ที่มีการระบาดของหนอน มาทำการเลี้ยงขยายเพื่อใช้ในการทดลอง เมื่อเลี้ยงหนอนได้เพียงแค่ในรุ่น F1 พบว่า มีการระบาดของเชื้อโปรโตซัว ทำให้หนอนอ่อนแอและติดเชื้อตายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมจากแหล่งปลูกพืชอื่นๆเข้ามาเลี้ยงขยายใหม่เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ทำการทดลองได้ และเมื่อเมื่อเลี้ยงหนอนได้ในรุ่น F1 ทำการคัดเลือกหนอนวัย 3 จำนวน 400 ตัว และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 200 ตัว จากนั้นทำการ infect เชื้อ Bta ลงในหนอนที่ความเข้มข้น 1×10^{7} cfu/ml และเลี้ยงขยายหนอนที่รอดตายจากเชื้อ Bt เพื่อใช้เป็น selected colony และunselected colony จากนั้นได้ทำ pretest เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่สามารถฆ่าหนอนได้อยู่ในช่วง 10-90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่ทำให้หนอนตายอยู่ในช่วงดังกล่าวมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $1 \times 10^{7} - 1 \times 10^{4}$ cfu/ml

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-02-02-01-06-55

คำนำ

หนอนกระทู้หอมเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง พบมีการระบาดทำลายพืชหลายชนิดทั้งพืชผัก พืชไร่ พืชสวน ตลอดจนไม้ดอกไม้ประดับต่างๆ ในการเข้าทำลายพืชหนอนอาจจะกัดเจาะพืชให้เป็นรูลึกแล้วเข้าไปกินอาหารอยู่ภายในรูตามส่วนต่างๆของพืชอาหาร บางครั้งหนอนจะหลบซ่อนตัวตามซอกกาบใบ ทำให้สารฆ่าแมลงที่ใช้พ่นไม่ถูกตัวหนอนโดยตรงหรือพ่นถูกตัวได้ยาก (อุทัย,2544) ซึ่งหนอนกระทู้หอมในแต่ละแหล่งจะมีการตอบสนองต่อสารฆ่าแมลงแตกต่างกัน โดยแนวโน้มที่จะมีการปรับตัวต้านทานต่อสารฆ่าแมลงชนิดใดนั้นจะขึ้นอยู่ว่าในแหล่งปลูกพืชนั้นมีการใช้สารฆ่าแมลงใดๆ อย่างต่อเนื่อง (สมชัยและคณะ, 2543; สุเทพและคณะ, 2541) และความแปรปรวนในการตอบสนองต่อสารฆ่าแมลงที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากลักษณะการจัดการต่อหนอนกระทู้หอมในแต่ละแหล่งนั้นๆ (Brewer *et al.*, 1990) และผลจากการใช้สารฆ่าแมลงไม่ถูกต้อง เป็นสาเหตุให้หนอนกระทู้หอมสามารถพัฒนาความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงชนิดต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว กนกพรและคณะ (2537) ได้ทดสอบระดับความต้านทานของสารฆ่าแมลงกับหนอนกระทู้หอมวัยต่างๆ โดยวิธีการให้หนอนได้รับสารด้วยการกินอาหารเทียมที่มีสารฆ่าแมลงเคลือบผิวหน้าไว้ พบว่าระดับความต้านทานของหนอนกระทู้หอมจะเพิ่มขึ้นตามวัย ขนาดและน้ำหนักของหนอนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการสร้างความต้านทานของแมลงต่อสารเคมีฆ่าแมลงเป็นปรากฏการณ์ทางชีววิทยาที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องไม่หยุดนิ่งโดยมีสารฆ่าแมลงเป็นตัวคัดเลือก แมลงที่รอดชีวิตอาจพัฒนาสร้างกลไกความตานทานและขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนมากขึ้นแมลงเหล่านี้จะมีจีโนไทป์ซึ่งเปลี่ยนแปลงและแสดงออกโดยมีกลไกความต้านทานตั้งแต่ 1 วิธีขึ้นไป ซึ่งจะยังผลให้แมลงเหล่านี้สามารถรอดชีวิตอยู่ได้ภายหลังมีการใช้สารฆ่าแมลง และเมื่อมีการใช้สารฆ่าแมลง ชนิดนั้นๆซ้ำๆในบริเวณกว้างขวางมากขึ้น จำนวนแมลงที่รอดชีวิตที่จะมียีนต้านทานก็จะยิ่งมากขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเป็นจำนวนส่วนใหญ่ของประชากรซึ่งแสดงให้เห็นจากประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงลดลง ทำให้ต้องใช้สารฆ่าแมลงในอัตราที่สูงขึ้นเรื่อยๆจนต้องเลิกใช้สารฆ่าแมลงชนิดนั้นในที่สุด แต่ยังมีสารฆ่าแมลงที่มีประสิทธิภาพดีในการป้องกันกำจัดหนอนกระทู้หอม ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ไวรัส NPV และสารเคมีฆ่าแมลงบางชนิดเท่านั้น ที่ยังคงให้ผลดีอยู่ในปัจจุบัน (อัจฉรา, 2544) แต่ไม่ว่าจะเป็นสารที่มีประสิทธิภาพดีเพียงใดก็ตาม เมื่อมีการใช้ฉีดพ่นเพื่อควบคุมหนอนไปนานๆ ย่อมมีโอกาสที่หนอนกระทู้หอมจะสร้างความต้านทานต่อสารนั้นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยและทดสอบเพื่อการติดตามประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ที่มีต่อหนอนและตรวจสอบแนวโน้มการพัฒนาความต้านทานของหนอนกระทู้หอมต่อเชื้อ Bt

วิธีการดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*
3. หนอนกระทู้หอม
3. กล้องจุลทรรศน์
4. จานแก้วเพาะเชื้อ
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ
6. อาหารเทียมเลี้ยงแมลง

วิธีการ

1. เตรียมเชื้อแบคทีเรีย Bt ด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ $1x10^3$, $1x10^4$, $1x10^5$, $1x10^6$ และและ $1x10^7$ cfu/ml

2.นำหนอนกระทู้หอมที่เก็บจากแหล่งต่างๆ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเทียมจนได้หนอนรุ่นที่ 1 นำมาทดสอบหาค่าความเป็นพิษของเชื้อ Bt โดยวิธีให้กิน (Feeding Method) บนอาหารเทียมโดยหยดเชื้อ Bt ที่ความเข้มข้นต่างๆที่ได้เตรียมไว้ลงบนอาหารเทียมที่เตรียมไว้ในถ้วยพลาสติกสำหรับทดสอบปริมาณ 30 ไมโครลิตรต่อถ้วย ใช้หนอนทดลองวัย 2 ทำอัตราความเข้มข้นละ 100 ตัว ทำการตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

3. หนอนกระทู้หอมอีกจำนวนหนึ่งนำมาคัดเลือกโดยนำมาให้กินเชื้อ Bt บนอาหารเทียมเช่นเดียวกัน โดยใช้หนอนทดลอง 100 ตัวต่อรุ่น แล้วเก็บหนอนที่มีชีวิตอยู่รอดของแต่ละรุ่นที่ทดสอบนำมาเลี้ยงต่อไป ด้วยวิธีการคัดเลือกนี้จะจำแนกหนอนกระทู้หอมที่ทำการทดลองในครั้งนี้เป็น 2 กลุ่มคือ

3.1 หนอนที่คัดเลือกด้วยเชื้อ Bt (Bt selected colony) คือกลุ่มของหนอนกระทู้หอมที่เริ่มคัดเลือกโดยได้รับเชื้อ Bt แล้วมีชีวิตอยู่รอด โดยได้รับเชื้อ Bt ที่อัตราความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้หนอนตายประมาณ 10-20 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงต่อในสภาพห้องปฏิบัติการ

3.2 หนอนที่เลี้ยงเป็น control (Unselected colony) คือกลุ่มของหนอนกระทู้หอมที่ไม่ได้รับการคัดเลือกโดยสารฆ่าแมลงใดๆเลี้ยงไว้ในสภาพห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ

4. ทดสอบค่าความเป็นพิษของเชื้อ Bt ทำเช่นนี้ทุกรุ่นของหนอนกระทู้หอมที่ทดสอบที่เป็น Bt selected colony ส่วนอัตราความเข้มข้นที่ใช้คัดเลือกจะใช้ตามความเหมาะสมของการตอบสนองต่อเชื้อ

Bt ตลอดจนการดำรงอยู่ของกลุ่มหนอนแต่ละรุ่น โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml

กรรมวิธีที่ 2. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml

กรรมวิธีที่ 3. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml

กรรมวิธีที่ 4. เชื้อ Bt ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml

กรรมวิธีที่ 5. เชื้อ Bt ความเข้มข้น 1×10^7 cfu/ml

กรรมวิธีที่ 6. control

การบันทึกข้อมูล

ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีทุก 24 ชั่วโมงหลังการทดลองในแต่ละรุ่นจนครบ 7 วัน และ ถ้าพบหนอนตายใน control ปรับค่าเปอร์เซ็นต์การตายด้วย Abbott's formula ดังนี้

$$\% \text{ corrected mortality} = \frac{\% \text{ test mortality} - \% \text{ control mortality}}{100 - \% \text{ control mortality}} \times 100$$

จากนั้นนำข้อมูลจำนวนหนอนที่ตายมาหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้หนอนตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ด้วยโปรแกรม Probit analysis

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2554 – กันยายน 2557

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองทำ pretest เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้อยู่ในช่วง 10-90 เปอร์เซ็นต์ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD จากการทำ pretest ครั้งที่ 1 พบว่า Bta ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 6.45 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 10.33 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 38.87 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 74.65 เปอร์เซนต์ และ Bta ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 91.33 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 1) และจากการทำ pretest ครั้งที่ 2 พบว่า Bta ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 7.15 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 12.33 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 37.45 เปอร์เซนต์ Bta ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 77.25 เปอร์เซนต์ และ Bta ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml สามารถทำให้หนอนตายได้ 90.78 เปอร์เซนต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งจากผลการทดลองช่วงความเข้มข้นของเชื้อ Bta ที่สามารถฆ่าหนอนได้อยู่ในช่วง 10-90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่ทำให้หนอนตายอยู่ในช่วงดังกล่าวมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง $1 \times 10^7 - 1 \times 10^4$ cfu/ml

ในปี 2555 เป็นช่วงที่ได้รับผลกระทบจากการเกิดอุทกภัย ทำให้หนอนทดลองที่ได้เลี้ยงไว้เกิดความเสียหายทั้งหมด และเมื่อได้ทำการออกเก็บหนอนจากแหล่งปลูกพืชมาทำการเลี้ยงขยายพบว่ามีการระบาดของเชื้อโปรโตซัวทำให้หนอนอ่อนแอและติดเชื้อตายเป็นจำนวนมาก จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การทดลองทำ strain selection ในช่วงแรกไม่สามารถเก็บข้อมูลได้ ดังนั้นจึงต้องมีการเก็บหนอนกระทู้หอมจากแหล่งปลูกพืชอื่นๆเข้ามาเลี้ยงขยายใหม่เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ทำการทดลองได้ในปีถัดไป

ตารางที่ 1 การตายของหนอนกระทู้หอมจากการได้รับเชื้อ Bta ที่อัตราความเข้มข้นต่างๆ(pretestครั้งที่1)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตาย
	วันที่ 7
Bta ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml	6.45
Bta ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml	10.33
Bta ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml	38.87
Bta ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml	74.65
Bta ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml	91.33
control	1.00

ตารางที่ 2 การตายของหนอนกระทู้หอมจากการได้รับเชื้อ Bta ที่อัตราความเข้มข้นต่างๆ(pretestครั้งที่2)

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตาย
	วันที่ 7
Bta ความเข้มข้น $1x10^3$ cfu/ml	7.15
Bta ความเข้มข้น $1x10^4$ cfu/ml	12.33
Bta ความเข้มข้น $1x10^5$ cfu/ml	37.45
Bta ความเข้มข้น $1x10^6$ cfu/ml	77.25
Bta ความเข้มข้น $1x10^7$ cfu/ml	90.78
control	0

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมจากพื้นที่ปลูกหอมหัวใหญ่ที่มีการระบาดของหนอน มาทำการเลี้ยงขยายเพื่อใช้ในการทดลอง เมื่อเลี้ยงหนอนได้เพียงแค่ในรุ่น F1 พบว่า มีการระบาดของเชื้อโปรโตซัวทำให้หนอนอ่อนแอและติดเชื้อตายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงได้ทำการเก็บหนอนกระทู้หอมจากแหล่งปลูกพืชอื่นๆเข้ามาเลี้ยงขยายใหม่เพื่อให้มีปริมาณมากพอที่จะใช้ทำการทดลองได้ และเมื่อเมื่อเลี้ยงหนอนได้ในรุ่น F1 ทำการคัดเลือกหนอนวัย 3 จำนวน 400 ตัว และแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 200 ตัว จากนั้นทำการ infect เชื้อ Bta ลงในหนอนที่ความเข้มข้น 1 x 10^7 cfu/ml และเลี้ยงขยายหนอนที่รอดตายจากเชื้อ Bt เพื่อใช้เป็น selected colony และunselected colony จากนั้นได้ทำ pretest เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่สามารถฆ่าหนอนได้อยู่ในช่วง 10-90 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ความเข้มข้นของเชื้อ Bt ที่ทำให้หนอนตายอยู่ในช่วงดังกล่าวมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 x 10^7 – 1 x 10^4 cfu/ml

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณมยุรา พงษ์ชวาล คุณปานนภา ภู่ทอง คุณวิทวัส สอนอ่อน คุณกษมา นามแดง คุณอำไพ หาญมนตรี และทีมงานทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือและช่วยปฏิบัติงานทดลองครั้งนี้เป็นอย่างยิ่ง

เอกสารอ้างอิง

กนกพร อุ่นใจชน, สุเทพ สหายา, อุทัย เกตุนุติ, อัจฉรา ตันติโชดกและเกศรา จีรจรรยา. 2537. การศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆต่อหนอนกระทู้หอม. รายงานการค้นคว้าและวิจัย ปี 2537. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, สุเทพ สหายา, กิตติ อ้อไธสงและเกศรา จีรจรรยา. 2543. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2543. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

สุเทพ สหายา, สุพจน์ กิตติบุญญา, ลักขณา บำรุงศรีและเกศรา จีรจรรยา. 2541. การศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆต่อหนอนกระทู้หอม. รายงานการค้นคว้าและวิจัย ปี 2541. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร.

อัจฉรา ตันติโชดก. 2544. บีที: การควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 183-208. *ใน*: การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยไวรัส NPV. หน้า 141-182. *ใน*: การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

Beron, C. M., L. Curatti and G. L. Salerno. 2005. New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 71(2): 761-765.

El-Guidny, M.A., Madi, S.M., Keddis, M.E., Issa, 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.

Porcar, M. and P. Caballero. 2000. Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. J. Appl. Microbiol. 89(2): 309-316.