การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอม

Strain Selection of *Bacills thuringiensis* for Controlling Cut Worm, *Spodoptera litura* and Beet army worm, *Spodoptera exigua* .

อิศเรส เทียนทัด อัจฉรา ตันติโชดก ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

นำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 1,144 isolates มาทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยใช้การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (preliminary screening test) กับหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผัก ด้วยวิธีการ diet plug method พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 357 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 247 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 199 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 111 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 49 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้ จำนวน 181 isolates เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับหนอนกระทู้ผัก พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 348 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 237 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 156 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 151 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 104 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ จำนวน 148 isolates โดยมีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 24 isolates และเมื่อนำเชื้อทีทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 7 isolates มาทำ insect bioassay พบว่ามีเชื้อ Bt จำนวน 4 isolates ที่มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าเชื้อ Bt มาตรฐาน คือ isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), phet 110-1 และ tak 171-2(5) และจากการศึกษาผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า Bt isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), nkr 190-14, nkr 192-8, nkr 194-1, phet 110-1 และ tak 171-2(5) ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 128.63-138.48 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Cry 1 ที่มีพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่นเดียวกัน Bt subsp. *aizawai* และ Bt subsp. *kurstaki* HD-1

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-04-01-01-51

คำนำ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูง สามารถใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกินใบปาล์ม เป็นต้น อันดับ Coleoptera เช่น ด้วงหมัดผัก และแมลงสาธารณสุขบางชนิดในอันดับ Diptera เช่น ยุง เป็นต้น (อัจฉรา, 2544) สามารถใช้ได้โดยไม่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติชนิดอื่นๆ เชื้อ Bt ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ.1901 และได้มีการใช้ควบคุมแมลงมาอย่างยาวนาน สามารถพบเชื้อ Bt ได้ตามแหล่งธรรมชาติทั่วๆไป (Schnept *et.al*, 1998) ซึ่ง Bt จะมีการสร้างสารพิษได้หลายชนิดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ subspecies แต่ส่วนใหญ่แล้ว Bt สายพันธุ์ต่าง ๆ จะสร้างสารพิษหลักเป็น proteinaceous crystal คือผลึกที่ประกอบไปด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีน ไม่ทนต่อความร้อน มีทั้งสารพิษและเอ็นไซม์ (enzyme) เกาะกันเป็นรูป dumbbell (อัจฉรา, 2529) มีด้วยกันหลายชื่อ เช่น crystal toxin, parasporal inclusion body และ insecticidal crystal protein (ICP) เป็นต้น

การสร้างผลึกโปรตีนของเชื้อ Bt ถูกควบคุมด้วยยีนต่างๆ กัน ดังนั้น Bt แต่ละสายพันธุ์จะสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษต่างชนิดกัน และมีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกันอีกด้วย (Dulmage, 1981) ซึ่งใน Bt บางสายพันธุ์มีการสร้างผลึกโปรตีนได้หลายชนิด จากการศึกษาของ Aronson *et al*. (1986) พบว่า เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน 2 ชนิดขึ้นไปในการสร้างผลึกโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ Bt และเชื้อ Bt สายพันธุ์เดียวกันแต่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่างกัน สามารถสร้างผลึกโปรตีนได้ต่างชนิดกันได้ ทำให้เชื้อ Bt จากแหล่งต่าง ๆ มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้แตกต่างกันด้วย

ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีการใช้ประโยชน์มากที่สุด เพราะมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อมากกว่า 100 ชนิด (Porcar and Caballero, 2000) แต่เชื้อ Bt สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมและหนอนผีเสื้อในสกุล *Spodoptera* หลายชนิด ซึ่งมีเชื้อ Bt บางสายพันธุ์ที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมได้ผล เช่น สายพันธุ์ *kenyae, darmstadiensis, gallieriae* และ *aizawai* เนื่องจากเชื้อ Bt สายพันธุ์เหล่านี้มียีน *cry*1C และ *cry*1E ที่สามารถผลิตผลึกโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อหนอนกระทู้หอมได้ (Chang *et al*., 1998) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Visser *et al*. (1990) ที่พบว่า ผลึกโปรตีน Cry1E มีความเป็นพิษเฉพาะเจาะจงต่อหนอนกระทู้หอม นอกจากนี้ Bajwa and Kogan (2005) พบว่าประสิทธิภาพในความเป็นพิษต่อแมลงจะเพิ่มขึ้นถ้าเชื้อ Bt นั้นมีผลึกโปรตีนอยู่ด้วยกันหลายชนิด และปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดความเป็นพิษต่อแมลงได้มากยิ่งขึ้น นั่นคือการที่หนอนได้รับสปอร์และผลึกโปรตีนเข้าไปพร้อมกัน (Moar, 1996) แต่อย่างไรก็ตามยังมีแมลงบางชนิดสามารถสร้างความต้านทานต่อผลึกโปรตีนสารพิษได้ ถ้าในกรณีที่ผลึกโปรตีนนั้นเป็น single Cry protein ซึ่งจากการศึกษาของ Moar (1996) พบว่า หนอนกระทู้หอมสามารถสร้างความต้านทานต่อผลึกโปรตีน

Cry1Ca ได้ และเมื่อผ่านไปอย่างน้อย 12 รุ่น (generation) ความต้านทานนั้นจะอยู่ถาวรภายในประชากรไม่สูญหายไป จากความรู้และข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวทำให้นักวิจัยจากหลายประเทศทำการศึกษารวบรวมเชื้อ Bt จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อให้ได้ Bt สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตผลึกโปรตีนได้หลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้หลากหลายไปพร้อมกัน ดังเช่นจากการศึกษาของ Lee *et al*. (2001) พบว่า Bt ที่แยกออกจากดินในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีบาง isolate มีการสร้างผลึกโปรตีนขึ้นหลายชนิด มีความเป็นพิษสูง ต่อหนอนกระทู้หอมและรวมทั้งลูกน้ำยุง *Culex pipiens* ด้วย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ตามแหล่งต่างๆ ทั่วโลกดังนั้นจึงมีการเก็บรวบรวมเชื้อไว้ในห้องปฏิบัติการของหลายประเทศ ซึ่งบาง isolate ที่เก็บไว้มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงดีมาก จนสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์การค้าได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1
2. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth และ nutrient agar
4. ตู้บ่มเชื้อ
5. ตู้เขี่ยเชื้อ
6. กล้องจุลทรรศน์
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
8. สารเคมีและอุปกรณ์ในการทำ SDS-PAGE

วิธีการ

1. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ Bt

นำ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินมาทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (preliminary screening test) กับหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอมโดยวิธีการ diet plug method เนื่องจาก เชื้อ Bt ที่แยกได้ออกมาจากดินมีเป็นจำนวนมาก ดังนั้นเพื่อความสะดวกและรวดเร็วต่อการตรวจสอบความเป็นพิษของเชื้อจึงต้องใช้วิธีการทดสอบประสิทธิภาพในเบื้องต้น เพื่อทำการคัดเลือกเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนได้จริงออกมาก่อน โดยทำการเลี้ยงเชื้อ Bt isolate บนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้ว ทำการผสมเชื้อ Bt isolate ปริมาณ 4 loopfull ต่อน้ำกลั่นน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการเจาะอาหารเทียมเลี้ยงแมลงด้วยที่เจาะจุกคอร์กเบอร์ 1 ให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร สูง 3 มิลลิเมตร วางบนจานอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นหยดสารละลายเชื้อ Bt ที่เตรียมไว้ลงบนก้อนอาหารเทียม ก้อนละ 5 ไมโครลิตร และตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง คัดเลือกหนอนทดลองที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และปล่อยให้อดอาหารประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อเตรียมไว้

สำหรับทำการทดสอบ หลังจากนั้นนำอาหารเทียมที่หยดเชื้อแล้วใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 3 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขี่ยหนอนลงในหลอด หลอดละ 1 ตัว บันทึกผลการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นจึงคัดเลือก Bt isolate ที่ทำให้หนอนตาย 100 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปเพื่อนำไปศึกษา insect bioassay ต่อไป โดยนำ Bt isolate ที่ผ่านการทดสอบแล้ว มาทำการทดสอบกับหนอนกระทู้ผักและหนอนกระทู้หอม เปรียบเทียบประสิทธิภาพด้วย Bt มาตรฐาน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ ใช้หนอน 20 ตัวต่อซ้ำ บันทึกผลการตายของหนอนทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2. การศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีน Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำ Bt isolates ที่ผ่านการทำ Bioassay แล้ว มาศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของ Crystal protein โดยวิธี SDS-PAGE โดยนำเชื้อ Bt isolate ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพแล้ว มาเลี้ยงขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการสกัดโปรตีนเพื่อศึกษาขนาดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) มี 2 ขั้นตอนดังนี้

2.1 การสกัดโปรตีนและการแยกขนาดของโปรตีน

นำเชื้อ Bt ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ใน microtube แล้วนำไปเข้าเครื่อง centrifuge ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำให้โปรตีนหลุดออกมาจากเซลล์ จากนั้นดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 400 ไมโครลิตร และนำไปเข้าเครื่อง centrifuge อีกครั้งเพื่อทำการล้างโปรตีนที่ได้ให้สะอาด จากนั้นใช้ pipett ดูดน้ำส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่โปรตีนที่ตกตะกอนในก้นหลอด แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 ไมโครลิตร ใช้ปลาย tip กวนโปรตีนในหลอดให้ละลาย หลังจากนั้นเติม 4X loading buffer จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่างโปรตีน แล้วผสมให้เข้ากันและนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตัวอย่างโปรตีนที่ผสมกับ 4X loading buffer แล้ว load ลงใน polyacrylamide gel ที่อยู่ในชุด electrophorsis ที่เตรียมไว้แล้วลงในช่อง (well) ช่องละ 10 ไมโครลิตร โดยให้ load standard marker 3 ไมโครลิตรลงในช่องแรก เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล เดินเครื่อง electrophorsis โดยใช้กระไฟฟ้าคงที่ที่ 100 volt จนกระทั่งเห็นโปรตีนเคลื่อนที่มาจนถึงปลายล่างของเจลจึงปิดเครื่อง

2.2 การย้อมสีโปรตีนในเจล

เตรียม staining solution โดยใช้ 0.1% coomassie brilliant blue R-250 ผสมลงใน 40% methanol และ 10% acetic acid เพื่อใช้ย้อมแผ่นเจลที่ได้ แช่ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที (เขย่าแผ่นเจลที่แช่สีย้อมไว้ด้วย shaker ความเร็ว 50 รอบต่อนาที) จากนั้นทำการ destain สีที่ย้อมเจลด้วยสารผสมของ 10% methanol และ 10% acetic acid เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ destain หลาย ๆ ครั้ง จน

เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน นำเจลที่ผ่านการ destain แล้วมาทำให้แห้ง โดยมาแช่ใน methanol 10% ประมาณ 10-15 นาที เพื่อให้เจลไม่เปราะขาดง่าย แล้วจึงนำไปทำให้เจลแห้งบนกระดาษแก้วเซลโลเฟน ทำการบันทึกภาพถ่ายผลแถบโปรตีนที่ได้จากเจลที่แห้งแล้ว จากนั้นจึงนำภาพถ่ายมาอ่านค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยโปรแกรม Gene Tools version 3.06 ต่อไป

เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2549 – กันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบประสิทธิภาพเชื้อ Bt

นำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 1,144 isolates มาทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (preliminary screening test) กับหนอนกระทู้หอมโดยวิธีการ diet plug method พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 357 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 247 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 199 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 111 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 49 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้ จำนวน 181 isolates เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับหนอนกระทู้ผัก พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 348 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 237 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 156 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 151 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 104 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ จำนวน 148 isolates (ตาราง 1) จากนั้นเมื่อนำเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมตายได้ 81-100 เปอร์เซ็นต์ มาตรวจสอบดู พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่ทำให้หนอนตาย 81-89 เปอร์เซ็นต์จำนวน 25 isolates ทำให้หนอนตาย 90-99 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 17 isolates และทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 7 isolates คือ isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), nkr 190-14, nkr 192-8, nkr 194-1, phet 110-1 และ tak 171-2(5) (ตาราง 2) และเมื่อนำเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักตายได้ 81-100 เปอร์เซ็นต์ มาตรวจสอบดู พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่ทำให้หนอนตาย 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 24 isolates คือ isolate cyp 7-1, kk 32-1, kk 32-3, kk 34-2, lop 413, nk 26-1, nk 26-2, nk 27-1, nk 27-2, nk 29-1, nk 30-6, nkr 3-1, nkr 104-2, nkr 194-6, phet 122-2, sk 76, sk 78, srb 199, srb 410, ud 23-1, ud 23-4, ud 23-6, ud 23-7 และ ud 24-1 (ตาราง 3) จากนั้นนำเชื้อ Bt

isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์ มาทำ bioassay โดยทดสอบกับหนอนกระทู้หอม เปรียบเทียบประสิทธิภาพด้วย Bt มาตรฐาน โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ 10 กรรมวิธี ใช้หนอน 20 ตัวต่อซ้ำ จากผลการทดสอบพบว่าเชื้อ Bt isolate phet 110-1 ให้ประสิทธิภาพดีที่สุดหลังได้รับเชื้อ 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมเท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ nkn 35-1(34) และ cm-ss6(5) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 34 และ 32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ Bt subsp. *kurstaki* HD-1, tak 171-2(5) และ Bt subsp. *aizawai* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 29, 27 และ 23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Bt isolate nkr 190-14, nkr 192-8 และ nkr 194-1 ทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 4, 3 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับไม่แตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับเชื้อ 5 วัน พบว่า Bt isolate nkn 35-1(34), nkr 192-8, phet 110-1 และ tak 171-2(5) มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 100, 99 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากกรรมวิธี Bt subsp. *aizawai* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ Bt subsp. *kurstaki* HD-1 และ Bt isolate cm-ss6(5) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Bt isolate nkr 190-14 และ nkr 194-1 มีประสิทธิภาพต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 24 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในทุกกรรมวิธีการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้หอมแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ หลังจากหนอนกระทู้หอมได้รับเชื้อ 7 วัน พบว่า Bt isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), phet 110-1 และ tak 171-2(5) มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตาย 100, 100, 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างจากกรรมวิธี Bt subsp. *kurstaki* HD-1 และ Bt subsp. *aizawai* ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 100 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือ Bt isolate nkr 192-8 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 44 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Bt isolate nkr 190-14 และ nkr 194-1 มีประสิทธิภาพต่ำ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 22 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับกรรมวิธีควบคุมมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับทุกกรรมวิธีการทดลอง (ตาราง 4)

2. การศึกษาขนาดและน้ำหนักโมเลกุลของผลึกโปรตีน Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

จากการนำ Bt 7 isolates ที่ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอมแล้วมาศึกษาผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เชื้อ Bt subsp. *kurstaki* HD-1, Bt subsp. *aizawai* (Xentari), Bt subsp. *kurstaki* (Thuricide) และ Bt subsp. *israelensis* เป็นเชื้อมาตรฐานในการเปรียบเทียบ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 116, 66.2, 45, และ 35 กิโลดาลตัน พบว่า Bt isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), nkr 190-14, nkr 192-8, nkr 194-1, phet 110-1 และ tak 171-2(5) ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 128.63-138.48 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Cry 1

เช่นเดียวกัน Bt subsp. *aizawai* (Xentari), Bt subsp. *kurstaki* (Thuricide) และ Bt subsp. *kurstaki* HD-1 ส่วน Bt subsp. *israelensis* ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 62.95 และ 25.67 กิโลดาลตัน (ภาพ 1 และ 2)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการนำเชื้อ Bt isolate ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน มาทำการทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้น (preliminary screening test) กับหนอนกระทู้หอมโดยวิธีการ diet plug method พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 357 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 247 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 199 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 111 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 49 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้ จำนวน 181 isolates เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นกับหนอนกระทู้ผัก พบว่ามีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักให้ตายได้ 1-20 เปอร์เซนต์ จำนวน 348 isolates ทำให้หนอนตาย 21-40 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 237 isolates ทำให้หนอนตาย 41-60 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 156 isolates ทำให้หนอนตาย 61-80 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 151 isolates ทำให้หนอนตาย 81-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 104 isolates และไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้ผักได้ จำนวน 148 isolates โดยมีเชื้อ Bt isolate ที่สามารถทำให้หนอนกระทู้ผักตายได้ 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 24 isolates และเมื่อนำเชื้อทีทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 7 isolates มาทำ insect bioassay พบว่ามีเชื้อ Bt จำนวน 4 isolates ที่มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าเชื้อ Bt มาตรฐาน คือ isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), phet 110-1 และ tak 171-2(5) และจากการศึกษาผลึกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า Bt isolate cm-ss6(5), nkn 35-1(34), nkr 190-14, nkr 192-8, nkr 194-1, phet 110-1 และ tak 171-2(5) ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 128.63-138.48 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม Cry 1 ที่มีพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่นเดียวกัน Bt subsp. *aizawai* และ Bt subsp. *kurstaki* HD-1

เอกสารอ้างอิง

อัจฉรา ตันติโชดก. 2529. สารพิษ delta-endotoxin. ว. กีฏ. สัตว. 8(2): 88-93.

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

Aronson, A. I., W. Beckman and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 50(1): 1-24.

Bajwa, I. W. and M. Kogan. 2005. *Bacillus thuringiensis* based biological control of insect pests. (Online). Available:http: // www.ippc.crst.edu/dir/microbial/bt (February 17, 2005).

Chang, J. H., J. Y. Roh, Y. H. Je, H. W. Park, B. R. Jin, S. D. Woo and S. K. Kang. 1998. Isolation of a strain of *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 encoding delta - endotoxin Cry1E. Lett. Appl. Microbiol. 26(5): 387-390.

Dulmage, H. T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. pp. 193-222. *In*: H. D. Burges (ed.). Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980. Academic Press, London.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of badteriophage T4. Nature 227(5259): 630-685.

Lee, I. H., Y. H. Je, J. H. Chang, J. Y. Roh, H. W. Oh, S. G. Lee, S. C. Shin and K. S. Boo. 2001. Isolation and characterization of a *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* strain toxic to *Spodoptera exigua* and *Culex pipiens*. Curr. Microbiol. 43(4): 284-287.

Moar, W. 1996. Spodoptera exigua Resistance to Bt. pp. 460-467. *In*: Proceedings of the Second Pacific RIM Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Impact to the Environment. November 4-8, 1996. Chiang Mai, Thailand.

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.

Schnept, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Buam, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.

Visser, B., E. Munsterman, A. Stoker and W. G. Dirkse. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. J. Bacteriol. 172(12): 6783-6788.

ตาราง 1 จำนวน Bt isolate ที่มีผลต่อหนอนกระทู้หอมและหนอนกระทู้ผักในช่วงการตายต่างๆ

ช่วงเปอร์เซ็นต์การตาย	จำนวน Bt isolateที่มีผลต่อ	
	หนอนกระทู้หอม	หนอนกระทู้ผัก
0	181	148
1-20	357	348
21-40	247	237
41-60	199	156
61-80	111	151
81-100	49	104
รวม	1,144	1,144

ตาราง 2 แสดง Bt isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย	ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
1	cm-m2(6)	95.00	30	sk 79-1(3)	94.72
2	cm-me3(1)	85.70	31	sk 80-1(1)	94.72
3	cm-ss1(3)	83.32	32	sk 80-1(3)	84.21
4	cm-ss6(5)	100	33	sk 83-2(2)	85.71
5	nk 26-1	86.20	34	srb 198-2(2)	93.73
6	nkn 35-2(9)	80.76	35	srb 198-2(3)	93.73
7	nkn 35-2(10)	88.46	36	srb 334-1(3)	94.72
8	nkn 36-2(3)	93.10	37	srb 356-2(4)	88.46
9	nkn 55-1(34)	100	38	tak 167-1	81.25
10	nkr 2-2	82.14	39	tak 170-2(3)	80.94
11	nkr 187-1	90.00	40	tak 170-2(4)	90.47
12	nkr 190-9	83.32	41	tak 170-2(5)	100
13	nkr 190-13	94.42	42	tak 171-2(1)	90.47
14	nkr 190-14	100	43	Aud 12-1	85.70
15	nkr 190-15	86.66	44	ud 14-7	93.10
16	nkr 191-6	85.00	45	ud 14-14	93.10
17	nkr 191-7	93.33	46	ud 14-15	86.20
18	nkr 191-8	81.00	47	ud 14-17	96.54
19	nkr 192-4	89.99	48	ud 21-2	82.75
20	nkr 192-8	100	49	ud 23-4	86.20
21	nkr 194-1	100			
22	nkr 194-3	94.42			
23	nkr 247-13	89.28			
24	nkr 281-9	85.17			
25	phet 110-1	100			
26	phet 122-1	89.65			
27	phet 152-1	83.32			
28	phet 226-1	83.32			
29	phet 227-2	86.66			

ตาราง 3 แสดง Bt isolate ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย	ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
1	cp 168-1	80.76	30	nkr 190-8	89.66
2	cp 168-6	88.46	31	nkr 190-15	96.55
3	cyp 7-1	100	32	nkr 191-3	83.33
4	cyp 296	93.33	33	nkr 191-6	96.66
5	kk 10-1	83.33	34	nkr 191-7	89.65
6	kk 11-10	90.00	35	nkr 193-2	82.47
7	kk 32-1	100	36	nkr 193-4	89.66
8	kk 32-3	100	37	nkr 193-7	90.00
9	kk 34-2	100	38	nkr 193-8	82.75
10	lop 413	100	39	nkr 194-1	89.65
11	nk 20-2	96.66	40	nkr 194-2	86.66
12	nk 26-1	100	41	nkr 194-3	96.54
13	nk 26-2	100	42	nkr 194-6	100
14	nk 27-1	100	43	nkr 194-8	96.54
15	nk 27-2	100	44	nkr 194-12	96.54
16	nk 28-1	96.66	45	nkr 281-2	86.20
17	nk 29-1	100	46	nkr 281-4	96.54
18	nk 30-2	90.00	47	nkr 281-5	93.10
19	nk 30-6	100	48	nkr 281-6	89.65
20	nkr 2-1	92.33	49	nkr 281-8	96.54
21	nkr 2-15	86.66	50	nkr 281-9	89.65
22	nkr 3-1	100	51	phet 110-1	96.66
23	nkr 3-2	86.66	52	phet 112-4	90.00
24	nkr 4-1	80.25	53	phet 121-1	90.00
25	nkr 104-1	96.14	54	phet 122-2	100
26	nkr 104-2	100	55	phet 226-1	93.10
27	nkr 104-4	92.36	56	phet 227-1	96.54
28	nkr 187-1	88.46	57	phet 227-2	89.65
29	nkr 190-7	93.33	58	phet 227-4	81.47

ตาราง 3 (ต่อ)

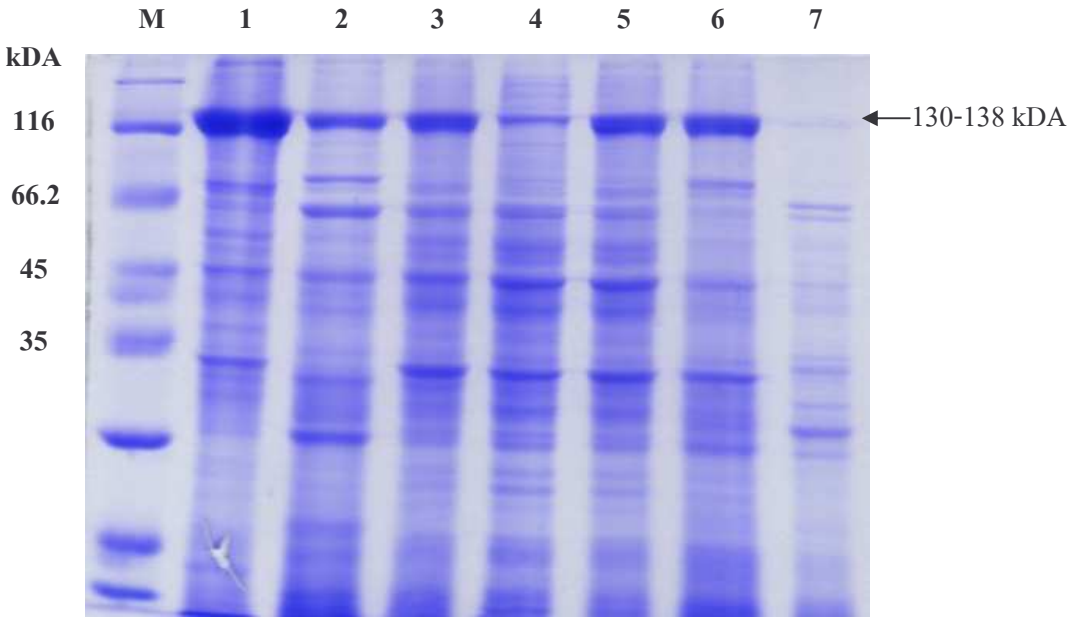
ลำดับ	Bt isolate	เปอร์เซ็นต์การตาย
59	phet 227-5	92.58
60	phet 227-6	81.47
61	phet 227-7	81.47
62	phet 227-8	92.22
63	phet 227-9	81.47
64	phet 227-10	81.47
65	phet 227-11	81.47
66	phet 227-16	85.17
67	phet 228-5	81.00
68	phet 228-6	85.17
69	phet 228-9	86.66
70	phet 229-1	83.33
71	phet 229-12	85.17
72	phet 229-13	85.17
73	phet 229-18	88.88
74	phet 229-23	96.66
75	phet 229-24	81.00
76	phet 230-1	86.66
77	phet 232-2	93.33
78	phet 232-5	96.66
79	phet 233-1	88.86
80	phu 180-1	92.30
81	phu 180-8	84.60
82	rcb 320-3	96.66
83	rcb 320-14	96.66
84	rcb 320-20	86.66
85	sk 76	100
86	sk 78	100
87	srb 199	100
88	srb 410	100
89	sur 182-3	84.60
90	sur 182-4	84.60
91	ud 12-2	83.33
92	ud 14-4	93.33
93.	ud 14-5	96.66
94	ud 14-14	93.10
95	ud 21-1	96.66
96	ud 21-2	96.66
97	ud 23-1	100
98	ud 23-2	82.76
99	ud 23-3	96.66
100	ud 23-4	100
101	ud 23-5	96.66
102	ud 23-6	100
103	ud 23-7	100
104	ud 24-1	100

ตาราง 4 ประสิทธิภาพของเชื้อ Bt isolate ที่มีต่อหนอนกระทู้หอม

กรรมวิธี	เปอร์เซ็นต์การตาย[1/]		
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7
cm-ss6(5)	32 ab[2/]	93 b	100 a
nkn 35-1(34)	34 ab	100 a	100 a
nkr 190-14	4 d	10 d	22 c
nkr 192-8	3 d	24 c	44 b
nkr 194-1	0 d	6 d	20 c
phet 110-1	38 a	99 a	100 a
tak 170-2(5)	27 bc	99 a	100 a
Bt subsp. *kurstaki* HD-1	29 bc	97 ab	100 a
Bt subsp. *aizawai*	23 c	99 a	100 a
control	1 d	1 e	2 d

[1/] ใช้หนอนกระทู้หอมวัยที่ 2 จำนวน 100 ตัวต่อกรรมวิธี

[2/] ตัวเลขในแต่ละคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางเศรษฐกิจที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี DMRT



ภาพ 1 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนที่ได้จากเทคนิค SDS-PAGE บน polyacrylamide gel 10 % ของ Bt isolate phet 110-1, tak 171-2 และ nkr 194-1

M standard marker

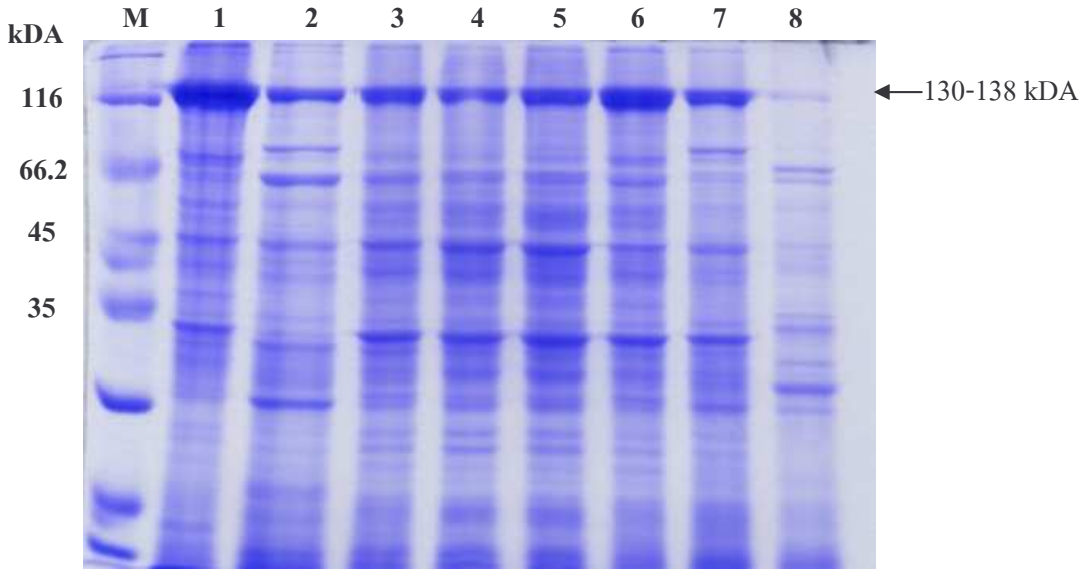
1 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *aizawai* (Xentari)

2 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *kurstaki* (Thuricide)

3 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *kurstaki* HD-1

4-6 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt isolate phet 110-1, tak 171-2 และ nkr 194-1

7 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *israelensis*



ภาพ 2 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนที่ได้จากเทคนิค SDS-PAGE บน polyacrylamide gel 10 % ของ Bt isolate nkn 35-1(34), nkr 190-4, nkr 192-8 และ cm-ss6(5)

M standard marker

1 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *aizawai* (Xentari)

2 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *kurstaki* (Thuricide)

3 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *kurstaki* HD-1

4-7 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt isolate nkn 35-1(34), nkr 190-4, nkr 192-8 และ cm-ss6(5)

8 แถบน้ำหนักโปรตีนของผลึกโปรตีนของ Bt subsp. *israelensis*