



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียบีทีและไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง
เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” (ระยะที่1)

โดย

รศ.ดร. จริยา จันทรไพแสง

ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์

มิถุนายน 2549

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียบีทีและไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเพื่อ
การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” (ระยะที่1)

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.ดร. จริยา จันทรไพแสง

ภาควิชาชีววิทยา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอ)

Outputs

1. New knowledge, research experience and biological data involving development of bacterial resistance in insect, potency and molecular biology of *cry* genes in the effective strains *B. thuringiensis* JC150 and JC590: diamondback moth (*Plutella xylostella*) did not develop resistance to *B. thuringiensis* JC150 and JC590 after 7 generations mass rearing, potency of *B. thuringiensis* JC150 and JC590 were not significantly different in statistic analysis, and *cry* genes were presence both on chromosomal and plasmid DNA of *B. thuringiensis* JC150 and JC590

2. The derived information will lead to the future use in strain protection and application

3. The research experience from this project could be used for seeking for novel effective strains and developing Bt products

Duration time 30 months

Total Budget 1,976,309.00 Baht

บทคัดย่อ

Bacillus thuringiensis เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารพิษทำลายแมลงหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มหนอนผีเสื้อ หนอนด้วง แมลงวัน เป็นต้น ได้มีการนำ *B. thuringiensis* มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชมาเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแมลงศัตรูพืชบางชนิดสามารถสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการพัฒนาความต้านทานของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS โดยทดสอบประสิทธิภาพกับ *B. thuringiensis* ทั้งสายพันธุ์ในห้องปฏิบัติการเพื่อหาระดับความเข้มข้นที่ทำให้หนอนทดสอบตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) และทดสอบการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *B. thuringiensis* โดยให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS ได้รับ *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (LC_{10}) อย่างต่อเนื่องได้ทั้งหมด 7 รุ่น พบว่าอัตราความต้านทาน (RR) หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS รุ่นที่ 7 ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีค่าเท่ากับ 0.954 ส่วนสายพันธุ์ JC590 มีค่า 0.648 ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS รุ่นที่ 7 ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีค่าเท่ากับ 0.481 ส่วนสายพันธุ์ JC590 มีค่าเท่ากับ 31.58 ค่า Heritability (h^2) ของหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เท่ากับ 0.047 และ -0.009 ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ 0.074 และ -0.081 เมื่อนำมาหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ สายพันธุ์ JC590 พบว่าค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS โดยเปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบผง (TW1) มีค่าความแรง 25,473 - 57,945.94 IU และ 12,236.8 - 28,429 IU/ml ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบน้ำขุ่น (TW2) มีค่าความแรง 3,438.53 - 22,265.5 IU/ml และ 3,308 - 38,964 IU/ml ตามลำดับ ในการทดสอบเพื่อหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับ TW1 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน โดยทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS โดยใช้ TW1 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน มีค่าความแรง 14,975.6 - 53,600 IU/ml และ 2,293.3 - 34,970.40 IU/ml ตามลำดับ ขณะที่การเปรียบเทียบโดยใช้ TW2 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน มีค่าความแรง 3,228.29 - 10,776.37 IU/ml และ 2,642.6 - 7,302 IU/ml ตามลำดับ การศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนที่เป็นพิษ (*cry* genes) เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีวภาพของสายพันธุ์เพื่อใช้ประกอบการอธิบายถึงการทำงานในระดับชีวโมเลกุลของยีนที่ควบคุมความเป็นพิษของจุลินทรีย์ต่อชนิดแมลงศัตรูพืช โดยอาศัยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (polymerase chain reaction, PCR) และไพรเมอร์ในกลุ่มของยีน *cry* พบว่า *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 พบยีน *cry* จำนวน 7 ชนิด คือ ยีน *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I* และ *cry2A* และ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 พบยีน *cry* จำนวน 6 ชนิด คือ ยีน *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*,

cry1E, *cry1I* และ *cry2A* ทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์บีทีและการนำไปใช้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดได้ในอนาคต

Abstract

Bacillus thuringiensis is bacteria, producing insecticidal toxin, which widely used as bio-control agent in plantation field for many years. However, some pest insects can develop resistance to this organism. In this study, bacterial resistance development in diamondback moth (*Plutella xylostella*) of *B. thuringiensis* JC150 and JC590 was tested against *P. xylostella* strain BBS and TMS. The resistance rate (RR) of *P. xylostella* strain BBS and TMS calculated from LC_{10} of *B. thuringiensis* JC150 and JC590 for 7 generations of *P. xylostella* were 0.954, 0.648, 0.481, and 31.58, respectively. The Heritability (h^2) of *P. xylostella* strain BBS and TMS against *B. thuringiensis* JC150 and JC590 were 0.047, -0.009, 0.074, and -0.081, respectively. For potency study, the results of *B. thuringiensis* JC150 against *P. xylostella* strain BBS and TMS were 25,473 - 57,945.94 IU and 12,236.8 - 28,429 IU/ml, when compared with commercial strain of *B. thuringiensis* TW1 (powder product), and 25,473 - 57,945.94 IU and 12,236.8 - 28,429 IU/ml when compared with commercial strain of *B. thuringiensis* TW2 (concentrated liquid product). The potency of *B. thuringiensis* JC590 on *P. xylostella* strain BBS and TMS, were 14,975.6 -53,600 IU/ml and 2,293.3 - 34,970.40 IU/ml, when compared with commercial strain of *B. thuringiensis* TW1, and 3,228.29 -10,776.37 IU/ml and 2,642.6 -7,302 IU/ml when compared with commercial strain of *B. thuringiensis* TW2. The molecular study of *cry* genes showed that *cry* genes were presence both on chromosomal and plasmid DNA of *B. thuringiensis* JC150 and JC590. The genes *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I* and *cry2A* were detected on both chromosomal and plasmid DNA of *B. thuringiensis* JC150 and the genes *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I*, and *cry2A* were on both chromosomal and plasmid DNA of *B. thuringiensis* JC590. The results obtained here could be used in development and application of *B. thuringiensis* in the near future.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย โครงการนี้ ขอขอบคุณผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อสังเกตที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย และขอบคุณผู้ประสานงานชุดโครงการวิจัย “ การจัดการศัตรูพืช ” รศ.ดร. จริยา วิสิทธิ์พานิช ที่ช่วยประสานงานและให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา ขอขอบคุณภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ผู้วิจัยได้ใช้ห้องปฏิบัติการและเรือนปลูกทดลอง ตลอดจนการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณเกษตรกรผู้ปลูกผักในอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี และอำเภอดำม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ที่กรุณาให้ผู้วิจัยได้เข้าไปเก็บรวบรวมหนอนโยผักในแปลงปลูกเพื่อใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชากีฏวิทยา และนิสิตปริญญาโท-เอก โดยเฉพาะ คุณวรรณภา แก้วชิงดวง คุณแหวตา ศิริปะกะ คุณนฤมล สังข์โอธาน นางสาวประกาย เทพหาร นางสาวเยาวลักษณ์ พุจิตรกานนท์ นางสาวนาพร วงษ์นิคม นางสาวตุลยา กลับแก้ว และ นางสาวสุวิมล วงศ์พลัง รวมทั้งผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยสำเร็จลงด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
วัตถุประสงค์	1
คำนำ	2
บทที่ 1 บทนำ	1-1
บทที่ 2 การพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>) ต่อ <i>Bacillus thuringiensis</i>	2-1
บทที่ 3 ความแรงของสารออกฤทธิ์ใน <i>Bacillus thuringiensis</i>	3-1
บทที่ 4 คุณสมบัติทางชีวโมเลกุลของ <i>Bacillus thuringiensis</i> ที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูผัก	4-1
บทที่ 5 สรุป	5-1
ภาคผนวก	6-1

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	สายพันธุ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> ที่จำแนกตาม H-serotype	1-9
1.2	การเรียกชื่อยีน <i>cry</i> และ <i>cyt</i> ระบบใหม่เทียบกับชื่อยีน <i>cry</i> และ <i>cyt</i> ระบบเดิม	1-18
1.3	การกระจายตัวของผลึกโปรตีน 3 ชนิด ใน <i>B. thuringiensis</i> สายพันธุ์ต่างๆ จากการใช้ปฏิกิริยาของ monoclonal antibodies	1-22
1.4	ความเป็นพิษของผลึกโปรตีนต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera	1-23
1.5	แสดงชื่อผลิตภัณฑ์ <i>Bacillus thuringiensis</i> และค่าความแรงของสารออกฤทธิ์	1-25
2.1	แสดงวงจรชีวิตของหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>) และช่วงเวลาของระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS)	2-12
2.2	หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-21
2.3	หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-22
2.4	หนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-23
2.5	หนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-24
2.6	หนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-25
2.7	หนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ที่ได้รับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก	2-26
2.8	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-28

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		หน้า
2.9	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง(BBS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-29
2.10	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-30
2.11	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-31
2.12	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-32
2.13	ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อความต้านทาน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-33
2.14	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-34
2.15	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-34
2.16	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-35
2.17	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-35
2.18	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ(OSS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	2-36
2.19	ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ(OSS) ที่ทดสอบกับ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	2-36

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.1 ผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150, สายพันธุ์ JC590 และผลิตภัณฑ์การค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) ที่ฆ่าหนอนใยผัก สายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) และสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ให้ตายที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC ₅₀) (cfu/ml)	3-9
3.2 ค่าความแรง (potency) (ITU/ml) ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150, สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์การค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) ที่ฆ่าหนอนใยผักสายพันธุ์ บางบัวทอง (BBS)	3-10
3.3 ค่าความแรง (potency) (ITU/ml) ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150, สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์การค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) ที่ฆ่าหนอนใยผักสายพันธุ์ ท่าม่วง (TMS)	3-11
3.4 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแรงของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) กับหนอนใยผักสายพันธุ์ บางบัวทอง (BBS)	3-12
3.5 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแรงของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) กับหนอนใยผักสายพันธุ์ ท่าม่วง (TMS)	3-12
4.1 ไพรมเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน <i>cry</i>	4-5
4.2 คุณสมบัติของลำดับเบสของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนโครโมโซมดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลใน ฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST-N	4-20
4.3 คุณสมบัติของลำดับเบสของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนพลาสมิดเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BLAST-N	4-23

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4	คุณสมบัติของลำดับเบสของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนโครโมโซมดีเอ็นเอเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BLAST-N
4.5	คุณสมบัติของลำดับเบสของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนพลาสมิดเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม BLAST-N

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แสดงวงจรชีวิตของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	1-3
1.2 แสดงกลไกการเข้าทำลายแมลงของ <i>Bacillus thuringiensis</i>	1-7
1.3 Organization open reading frame ของ <i>cryIA</i> ที่ประกอบไปด้วยตำแหน่ง promoter <i>Is</i> และ <i>Tn</i> ยีน <i>cryIA</i> เช่น ยีน <i>cryIAc</i> มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดขนาด 75 กิโลเบส ของ <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> ซึ่งเป็น monocistronic ประกอบไปด้วย 2 โปรโมเตอร์ คือ σ^E -dependent promoter ICP และ σ^K -dependent promoter ICP	1-20
1.4 แสดงวงจรชีวิตของหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>)	1-27
2.1 พืชอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนใยผักและกล้าพืชสำหรับให้ผีเสื้อวางไข่	2-5
2.2 การเตรียมหนอนใยผักเพื่อเพิ่มจำนวนให้เพียงพอสำหรับการทดลอง	2-6
2.3 ผังการทดสอบหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>) เพื่อหาอัตราความต้านทานต่อ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590	2-9
2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590	2-10
2.5 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของดักแด้ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 ต่อหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) 7 รุ่น สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) 7 รุ่น และหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) 7 รุ่น ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ (LC_{10})	2-17
2.6 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของดักแด้ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 ต่อ หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) 7 รุ่น สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) 7 รุ่น และหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) 7 รุ่น ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ (LC_{10})	2-18
2.7 ค่า Heritability หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง(BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง(TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ(OSS) จากการทดสอบประสิทธิภาพของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590	2-37
4.1 แสดงลักษณะของพลาสมิดและโครโมโซมของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150	4-7
4.2 แสดงลักษณะของพลาสมิดและโครโมโซมของ <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590	4-8

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.3 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนโครโมโซม	4-10
4.4 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนโครโมโซม	4-11
4.5 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนพลาสมิด	4-12
4.6 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC150 บนพลาสมิด	4-13
4.7 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนโครโมโซม	4-14
4.8 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนโครโมโซม	4-15
4.9 แสดงชนิดของยีน <i>cry1</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนพลาสมิด	4-16
4.10 แสดงชนิดของยีน <i>cry</i> ที่พบใน <i>Bacillus thuringiensis</i> สายพันธุ์ JC590 บนพลาสมิด	4-17

สัญญาเลขที่ RDG 4620027

โครงการ “การพัฒนาสายพันธุ์แบคทีเรียบีทีและไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง
เพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน” (ระยะที่1)

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 มิถุนายน 2546 – 30 พฤศจิกายน 2548

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน รศ.ดร. จริยา จันทรไพแสง
หน่วยงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย ผศ.ดร. สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์
หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) แมลงศัตรูสำคัญของผัก ต่อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช
2. หาค่าความแรง (potency) ของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ในหน่วย International Toxicity Unit (ITU)/mg เพื่อใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานกำกับอัตราการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช
3. เพื่อศึกษาคูณสมบัติทางชีวโมเลกุลของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เช่น ชนิดและลำดับเบสของ *cry* genes โครงสร้างของยีน เป็นต้น
4. เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีวโมเลกุลของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ที่แยกและคัดเลือกในประเทศไทยกับสายพันธุ์อื่นๆที่มีรายงาน โดยเทคนิคทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ และการปกป้องสายพันธุ์ในอนาคต

คำนำ

ปัจจุบันการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะพืชผักเศรษฐกิจ เช่น คะน้า กะหล่ำดอก ผักกาด เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีสารพิษตกค้างในระบบนิเวศ และสิ่งแวดล้อม มีการปนเปื้อนของสารเคมีในดินและไหลลงสู่แม่น้ำลำคลองมีผลกระทบต่อสมดุสธรรมชาติก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในทางที่เสื่อมลงอย่างรวดเร็ว เกษตรกรผู้ใช้สารเคมีได้รับผลกระทบโดยตรง แมลงตัวห้ำตัวเบียนลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว แมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารเคมีเพิ่มมากขึ้น เกษตรกรจึงต้องเพิ่มปริมาณการใช้สารกำจัดศัตรูพืชสูงขึ้น และประเทศไทยต้องนำเข้าสารกำจัดแมลงจากต่างประเทศในปริมาณเพิ่มขึ้นทำให้เงินตราไหลออกนอกประเทศ จากสถานการณ์ในปัจจุบัน สภาวะทางเศรษฐกิจของประเทศไทยยังคงฟื้นตัวช้า นอกจากนี้ผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศยังตื่นตัวและตระหนักถึงอันตรายของสารเคมีที่ตกค้างในผลิตภัณฑ์เกษตรกันมากขึ้น ทำให้การเกษตรปลอดสารพิษเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง ทำให้เกิดการนำเข้าผลิตภัณฑ์เกษตรปลอดสารพิษซึ่งเป็นสินค้าเกษตรที่ผลิตตามระบบมาตรฐานและมีการจัดการที่ดี มีราคาแพง เป็นมูลเหตุจูงใจที่สำคัญที่ทำให้เกษตรกรไทยตื่นตัวในเรื่องการลดปริมาณการใช้สารเคมี และหันมาใช้จุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นในการกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น สิ่งมีชีวิตที่นิยมใช้ในการควบคุมแมลงที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ คือ แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) และไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในภูมิประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตนานาชนิด จึงมีการค้นพบสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์เหล่านี้ในภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศ ด้วยกระแสความตื่นตัวด้านนี้ทำให้นักวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องทั่วโลกให้ความสำคัญและสนใจต่อการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ *B. thuringiensis* และไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีนำไปใช้พัฒนาให้เกิดประโยชน์ และรวบรวมสายพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในอนาคต รวมทั้งมีการศึกษาในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลของสายพันธุ์ที่ดีเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นพิษ (*cry genes*) ต่อแมลงศัตรูพืช การศึกษาการพัฒนาความต้านทานของแมลงต่อ *B. thuringiensis* และความแรง (*potency*) ของเชื้อ *B. thuringiensis* ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช นับเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาในเรื่องดังกล่าวในประเทศไทย เพื่อใช้อธิบายถึงผลของความรุนแรงของพิษและเป็นข้อมูลพื้นฐานทางชีวภาพของสายพันธุ์ ตลอดจนสร้างความเข้าใจในศักยภาพของ *B. thuringiensis* อย่างถูกต้อง และนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด อีกทั้งเป็นข้อมูลในการปกป้องสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่ดีที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งเป็นการป้องกันการละเมิดหรืออ้างสิทธิ์ในทรัพยากรทางชีวภาพของประเทศไทย

จากแนวทางการศึกษาและปัญหาที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกทำการวิจัยกับแมลงศัตรูผักเป็นอันดับแรก ทั้งนี้เพราะผักมีอายุสั้น มีศัตรูพืชลงทำลายมาก เกษตรกรจึงเร่งใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช เมื่อถึงเวลาเก็บเกี่ยวสารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังคงตกค้างอยู่ในปริมาณมาก ประกอบกับความนิยมในการบริโภคผักสดมีมากขึ้น ทำให้ผู้บริโภคมีโอกาสได้รับพิษภัยจากสารตกค้างดังกล่าวมากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้ในช่วงเวลาของการเจริญเติบโตของผักแมลงศัตรูที่เข้าทำลายผักยังแตกต่างกันไปตามความชอบ และความเหมาะสมของแมลงที่จะเข้าทำลาย รวมทั้งการปลูกผักต่อเนื่อง ซ้ำซากในพื้นที่เดียวกันตลอดปีทำให้เป็นแหล่งสะสมของแมลงศัตรูผักชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้การปลูกผักชนิดเดียวกันแต่ต่างพื้นที่ จะพบปัญหาการระบาดของแมลงที่แตกต่างกันไปอีก จากสถานการณ์ดังกล่าวจึงมีความจำเป็นที่จะต้องผสมผสานจุลินทรีย์ในท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อหาแนวทางที่เหมาะสมในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูผักได้อย่างจริงจัง รวมทั้งการวิจัยเพื่อพัฒนาการผลิต *B. thuringiensis* เพื่อใช้เองในประเทศ ในอาหารเพาะเลี้ยงที่หาง่ายและราคาถูก และมีศักยภาพในการผลิตเชิงพาณิชย์ ทำให้ผลิตภัณฑ์ Bt มีราคาลดลง ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณการใช้ *B. thuringiensis* ของเกษตรกรผู้ปลูกผักเพิ่มสูงขึ้น และเกิดรูปแบบของการนำทรัพยากรธรรมชาติมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อม โดยเฉพาะการกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกรักและหวงแหนทรัพยากรของชาติไว้ให้กับคนรุ่นต่อไป ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญที่จะลดการนำเข้าสินค้าจากต่างประเทศและหันมาพึ่งพาตนเองอย่างยั่งยืนต่อไป

รายงานนี้ได้รวบรวมข้อมูลต่าง ๆ ของ *B. thuringiensis* และแมลงศัตรูเป้าหมายที่จะนำ *B. thuringiensis* ไปใช้ควบคุมรวมทั้งการพัฒนางานวิจัยเพื่อแก้ปัญหาต่าง ๆ เพื่อนำมาใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจกำหนดทิศทางการวิจัยในเรื่องที่เกี่ยวข้องต่อ ๆ ไป

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ประวัติการศึกษา *Bacillus thuringiensis*

ในปี ค.ศ. 1915 Berliner ได้ค้นพบ *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นครั้งแรกที่เมือง Thuringia ประเทศเยอรมัน โดยการแยกเชื้อจากหนอนผีเสื้อ Mediterranean flour moth (*Ephesia kuehniella*) จึงตั้งชื่อสปีชีส์ว่า *thuringiensis* ตามชื่อเมืองที่พบ แต่เชื่อนี้ได้ถูกค้นพบโดย Ishiwata ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1902 โดยการแยกแบคทีเรียจากหนอนไหมที่เป็นโรคท้องร่วง และตั้งชื่อเชื้อที่พบว่า *Bacillus sotto* แต่ Ishiwata ได้จัดบันทึกสันและไม่สามารถเปรียบเทียบกับการบันทึกของ Berliner ด้วยเหตุผลนี้ชื่อ *B. thuringiensis* จึงเป็นที่ยอมรับ (Tanada and Kaya, 1993) ซึ่งในขณะนั้น *B. thuringiensis* มีแนวโน้มว่าจะเป็นอันตรายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงไหม จึงไม่เป็นที่สนใจมากนัก ต่อมาในปี ค.ศ. 1928 Husz ได้ทดสอบ *B. thuringiensis* กับหนอนเจาะฝักข้าวโพด (*Ostrinia furnacalis*) ในสภาพแปลงปลูกเป็นครั้งแรก และให้ผลการควบคุมเป็นที่น่าพอใจ จากการทดสอบนี้ทำให้มีการพัฒนา *B. thuringiensis* เป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1938 ที่ประเทศฝรั่งเศส โดยมีชื่อทางการค้าว่า Sporein ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ทราบกลไกการเข้าทำลายแมลงอย่างแท้จริง

ต่อมาในปี ค.ศ. 1953 Hanney พบโครงสร้างอย่างหนึ่งในเซลล์แบคทีเรีย และให้ชื่อว่า parasporal bodies ได้ให้ข้อสังเกตว่าโครงสร้างที่พบน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1954 Angus พิสูจน์ว่าข้อสังเกตของ Hanney นั้นเป็นความจริง และศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลึกโปรตีนพบว่าประกอบด้วยไนโตรเจน 17 เปอร์เซ็นต์ และมีกรดอะมิโน 17 ชนิด (Hannay, 1957) แบคทีเรียนี้ได้รับความนิยมในการทำจัดแมลงศัตรูพืชมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ E.A Steinhaus นำ *B. thuringiensis* ฉีดพ่นในแปลงอัลฟาฟ่าเพื่อควบคุมหนอนอัลฟาฟ่า (alfalfa caterpillars) ทำให้จำนวนของหนอนลดลงจนต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจภายในระยะเวลาอันสั้น พร้อมทั้งศึกษาถึงความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จนเป็นที่ยอมรับ และมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดนี้มากขึ้น

สายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่มีศักยภาพสูงสุด คือสายพันธุ์ *kurstaki* ที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อ Mediterranean flour moth ในปี ค.ศ. 1962 ที่ประเทศฝรั่งเศส (Dulmage and Aizawa, 1982) และปี ค.ศ. 1967 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา Dulmage แยกเชื้อจากหนอนเจาะสมอฝ้ายสีชมพู (*Pectinophora gossypiella*) ได้สายพันธุ์ HD-1 (Dulmage, 1970) ส่งผลให้มีการค้าขายผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ของหลายบริษัทรวมถึงบริษัท Abbott ที่ขายผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ HD-1 ที่มีศักยภาพสูงโดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Dipel และสายพันธุ์นี้

ยังคงมีสารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่ใช้ควบคุมหนอนศัตรูพืชทางการเกษตร (Milner, 1994)

จากการค้นพบ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ HD-1 ทำให้มีการค้นหาสายพันธุ์อื่นๆ ซึ่งในปี ค.ศ. 1977 Goldberg and Margalit ได้แยก *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* จากตัวอย่างดินในประเทศอิสราเอล สายพันธุ์ใหม่ที่ได้นี้มีฤทธิ์ฆ่าลูกน้ำยุง ทั้งที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียชนิดนี้กับยุง และไม่มีหลักฐานทางธรรมชาติในการก่อโรคกับยุง (Dulmage and Aizawa, 1982) ต่อมาสายพันธุ์นี้ถูกนำมาผลิตเป็นการค้าในปี ค.ศ. 1980 จากนั้นมีการค้นพบ *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ซึ่งแยกเชื้อได้จากตัวอ่อนด้วงมอดแป้ง (*Tenebrio molitor*) ในปี ค.ศ. 1983 ได้นำมาทดสอบพบว่าเกิดพิษค่อนข้างรุนแรงกับตัวอ่อนด้วงวงศ์ Chrysomelidae และในปี ค.ศ. 1990 สายพันธุ์นี้ถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่มีพิษต่อด้วงจำหน่ายในสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ควบคุมตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle (Chilcott and Wigley, 1994) การศึกษา *B. thuringiensis* ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่มากขึ้น โดยมีฤทธิ์กับแมลงนอกเหนือจากกลุ่มหนอนผีเสื้อ หนอนด้วง เช่น มีฤทธิ์ต่อหนอนแมลงวัน แมลงในอันดับ Hymenoptera และ Mallophaga (Rajamohan et al., 1998)

1.2 ลักษณะวิทยาของ *Bacillus thuringiensis*

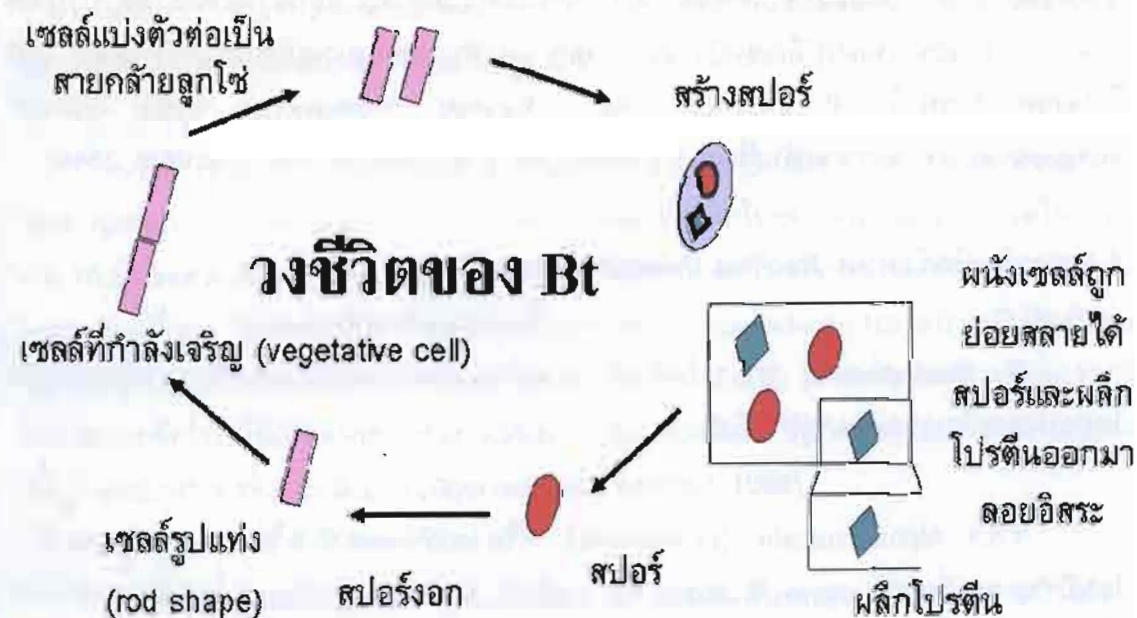
B. thuringiensis อยู่ในวงศ์ Bacillaceae สกุล *Bacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างสปอร์ได้ อยู่ในกลุ่ม facultative aerobe ซึ่งใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน สร้างเอนไซม์ catalase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase (Buchanan and Bibbon, 1974) มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ เช่น *B. mycoides*, *B. anthracis* และ *B. cereus* โดยเฉพาะ *B. cereus* ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีที่เหมือนกัน (Glare and O'Callaghan, 2000) โดยทั่วไปลักษณะรูปร่างของ *B. thuringiensis* เป็นเซลล์รูปแท่ง (rod shape) ต่อกันเป็นสายลูกโซ่ กว้าง 1.0-1.5 ไมครอน ยาว 4.0- 5.0 ไมครอน (Benson and Smith, 1992; Boucias and Pendland, 1998) ลักษณะของโคโลนีกลมค่อนข้างใหญ่ (5.0 -10.0 มิลลิเมตร) บางชนิดรูปร่างไม่แน่นอน ในช่วงของการเจริญจะสร้างสปอร์ (endospore) และผลึกโปรตีนในด้านตรงข้ามกันของเซลล์ โดยสปอร์จะมีความคงทนในสภาพธรรมชาติ (Buchanan and Bibbon, 1974)

ผลึกโปรตีนสามารถเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้อง phase contrast microscopy โดยมีรูปร่างปิรามิดคู่ (bipyramidal shape) ซึ่งมีขนาด 130 กิโลดาลตัน แต่ในบางสายพันธุ์จะสร้างผลึกโปรตีนรูปกลม (spherical shape) หรือรูปลูกบาศก์ (cuboidal shape) ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ (Yamamoto and Powell, 1993) การสร้างผลึกโปรตีนเป็นลักษณะพิเศษที่แยก

B. thuringiensis ออกจาก *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ (Buchanan and Bibbon, 1974) ในสายพันธุ์ *B. thuringiensis* มีความหลากหลายของคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น สามารถผลิต acetoin, lecithinase, pulcherrimin, proteolytic enzyme และ urease รวมทั้งการสร้างกรดจากน้ำตาล sucrose และ salicin คุณสมบัติเหล่านี้จะเฉพาะเจาะจงกับแต่ละสายพันธุ์ (de Barjac and Bonnefoi, 1968; Krieg, 1968)

1.3 วงชีวิตของ *Bacillus thuringiensis*

เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมสปอร์ของ *B. thuringiensis* จะออกเป็นเซลล์รูปแท่งภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นอีก 24-48 ชั่วโมง จะมีการสร้างสปอร์และผลึกโปรตีนที่มีหลายรูปแบบ เช่น รูปปิรามิดคู่ รูปกลม หรือรูปลูกบาศก์ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ ต่อจากนั้นผนังเซลล์จะสลายตัวไป สปอร์และผลึกโปรตีนจะลอยตัวอิสระอยู่ในอาหารหรือวัสดุที่เชื้ออาศัยอยู่ เมื่อตัวอ่อนแมลงมากินสปอร์และผลึกโปรตีนเข้าไป สภาพความเป็นต่างในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงจะย่อยสลายผลึกโปรตีนได้ protoxin และน้ำย่อย proteases จะช่วยกระตุ้นให้ protoxin เข้าทำลายเซลล์ของผนังกระเพาะอาหารต่อไป หลังจากแมลงตาย ซากของแมลงจะแตกออก *B. thuringiensis* จะกระจายตัวอยู่ในธรรมชาติและขยายพันธุ์แบบนี้ต่อไปเรื่อยๆ



ที่มา: จริยาและคณะ (2547)

ภาพที่ 1.1 แสดงวงจรชีวิตของ *Bacillus thuringiensis*

1.4 การแพร่กระจายของ *Bacillus thuringiensis* ในธรรมชาติ

ตามปกติ *B. thuringiensis* จะอาศัยอยู่ในดิน และเศษวัสดุพืชที่เน่าเปื่อย สารอาหารที่มีอยู่ในแหล่งต่างๆตามธรรมชาติ เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของ *B. thuringiensis* (West et al., 1985) จากการศึกษาถึงธาตุอาหารที่มีผลต่อการสร้างผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* พบว่า sucrose, lactose และ inulin จะช่วยสนับสนุนการสร้างสปอร์โดยแหล่งคาร์โบไฮเดรตของ *B. thuringiensis* ได้แก่ หางนม และกากน้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างผลึกโปรตีน ขณะที่ glycerol, glucose, maltose, dextrin และแป้ง จะทำให้มีการสร้างผลึกโปรตีนน้อย สำหรับแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ peptone ที่เป็นแหล่งอาหารที่ดีที่สุดในการสร้างผลึกโปรตีนและสปอร์ (Içgen et al., 2002)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาถึงการกระจายตัวตามธรรมชาติของ *B. thuringiensis* โดยมีการแยกเชื้อจาก ตัวอย่างดิน ไร่ข้าว และหนอนกอข้าวที่เก็บจากพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศรวบรวมได้ทั้งหมด 299 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 14 สายพันธุ์ ได้แก่ *kurstaki*, *alesti*, *kenyae*, *galleriae*, *canadensis*, *entomocidus*, *aizawai*, *kumamotoensis*, *tochigiensis*, *tolworthi*, *neoleonensis*, *mexicanensis*, *leesis* และสายพันธุ์ใหม่ 1 สายพันธุ์คือ *chanpaisis* (Chanpaisaeng et al., 1993) ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 จริยา และคณะ ได้แยก *B. thuringiensis* จากตัวอย่างดิน และเศษวัสดุพืชที่รวบรวมจากเขตป่าสมบูรณ์ในอุทยานแห่งชาติทั่วประเทศทั้งหมด 11 แห่ง รวมไปถึงเขตป่า ถ้ำ น้ำตก และดินจากหมู่บ้านเลี้ยงไหมได้ทั้งหมด 260 ไอโซเลท จำแนกได้ 6 สายพันธุ์ คือ *kurstaki*, *neoleonensis*, *sotto*, *colmeri*, *kumamotoensis* และสายพันธุ์ใหม่ 1 สายพันธุ์ คือ *thailandensis* (จริยา และคณะ, 2544)

1.5 สารพิษที่สร้างโดย *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis สามารถสร้างสารพิษเพื่อนำมาใช้ในการควบคุมแมลงได้หลายชนิด โดยแบ่งสารพิษออกเป็นกลุ่มๆ ดังนี้

1.5.1 Alpha-exotoxin (α -exotoxin) หรือ lecithinase C หรือ phospholipase C โดยมีรายงานเกี่ยวกับ alpha exotoxin ครั้งแรกในปี ค.ศ.1959 ว่าเป็นเอนไซม์ที่ละลายได้ในน้ำ ทนความร้อน สามารถย่อยสลายเซลล์ทุกชนิดและเป็นพิษกับแมลงเมื่อได้รับพิษโดยการกินเข้าไป สารพิษนี้ *B. thuringiensis* สร้างขึ้นขณะที่เซลล์มีการเจริญอย่างเต็มที่ แล้วขับออกนอกเซลล์ มีรายงานว่า เป็นพิษกับหนอนและหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Dulmage, 1981)

1.5.2 Beta-exotoxin (β -exotoxin) หรือ thuringiensin, thermostable toxin, fly toxin เป็น สารประกอบ จำพวกอะดีนีนนิวคลีโอไทด์ (Aronson *et al.*, 1986) ทนต่อความร้อน ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (Beebe and Bond, 1973) มีพิษค่อนข้างสูงกับแมลงหลายอันดับคือ Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera, Hemiptera, Isoptera และ Orthoptera สารพิษ Beta-exotoxin ไม่สามารถ ผ่านผนังกระเพาะอาหารของแมลงได้ เพราะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ phosphatases ใน กระเพาะอาหารของแมลง (Mac Connell, 1959) เมื่อแมลงได้รับพิษนี้ จะเกิดการเปลี่ยนแปลง รูปร่างโดยเฉพาะส่วนของปาก หนวด และปีก โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะพบในระยะลอกคราบ ดักแด้ และในขณะที่มีการเจริญเติบโต (Tanada and Kaya, 1993)

1.5.3 Delta-endotoxin (δ -endotoxin) เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat labile) สร้างในช่วงที่เซลล์มีการสร้างกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) และพร้อมที่จะสร้างสปอร์ (Heimpel, 1963) รูปร่างของผลึกโปรตีนสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคกับกลุ่มของ แมลง เช่น ปิรามิตคูมีฤทธิ์ฆ่าหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera ในขณะที่รูปกลม และรูป ลูกบาศก์ มีฤทธิ์ฆ่าหนอนในอันดับ Lepidoptera และ Diptera (Tanada and Kaya, 1993) ผลึก โปรตีนประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีนเกาะกันเป็นรูปแท่งเบเรลยาว 15 นาโนเมตร เส้น ผ่านศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 ดาลตัน และประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 1 สาย หรือหลาย ๆ สาย โดยมีขนาดตั้งแต่ 120 จนถึง 160 กิโลดาลตัน ซึ่ง 20-30 เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนที่เกิดขึ้นในระยะสร้างสปอร์จะถูกนำมาสร้างผลึกโปรตีน (Faust, 1974)

ผลึกโปรตีนสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างจัด (pH 9.0-10.5) และสารละลาย thiol reagent (Benoit *et al.*, 1995) ส่วนที่เป็นพิษของผลึกโปรตีนสามารถละลายได้ใน pH 9.0-10.5 และส่วนที่ไม่เป็นพิษสามารถละลายได้ที่ pH 12 ความแตกต่างของความสามารถในการละลายที่ pH ที่แตกต่างกัน ทำให้ทราบถึงการมีพันธะ disulfide 2 แบบ สภาพที่เป็นด่างจะ สลายผลึกโปรตีน เกิดการทำลายพันธะ disulfide จากนั้นปล่อย protoxin ออกมา นอกจากนี้ การสลายผลึกโปรตีนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protease เช่น trypsin และ chymotrypsin ที่อยู่ในกระเพาะอาหารของแมลง (Boucias and Pendland, 1998)

1.5.4 Gamma-exotoxin (γ -exotoxin) เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน สลายตัวได้ง่าย เมื่อสัมผัสอากาศ ออกซิเจน และแสงแดด พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส สารพิษนี้ จะสลายตัวภายใน 10-15 นาที กลไกในการเข้าทำลายแมลงยังไม่เป็นที่รู้จักแน่ชัด (ทิพย์วดี, 2535)

1.5.5 Louse-factor เป็นสารพิษที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ที่เป็นส่วนประกอบของสปอร์ และผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) ซึ่งสายพันธุ์นี้ไม่สร้าง Beta-exotoxin สารพิษชนิดนี้ แสดงความเป็นพิษต่อเหาที่อาศัยอยู่กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 4 ชนิด ได้แก่ *Bovicola bovis*, *B. crassipes*, *B. limbata* และ *B. ovis* (Heimpel, 1963)

1.5.6. Vegetative Insecticidal Proteins (VIPs) เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นในระยะ vegetative เช่น Vip3A เป็นสารพิษที่มีผลต่อแมลงในกลุ่มผีเสื้อ ได้แก่ หนอนกระทู้ดำ (*Agrotis ipsilon*) หนอนกระทู้ฝ้าย (*Spodoptera frugiperda*) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หนอนเจาะยอดยาสูบ (*Heliothis virescens*) และหนอนเจาะฝักข้าวโพด (*Helicoverpa zea*) เป็นต้น (Estruch et al., 1996)

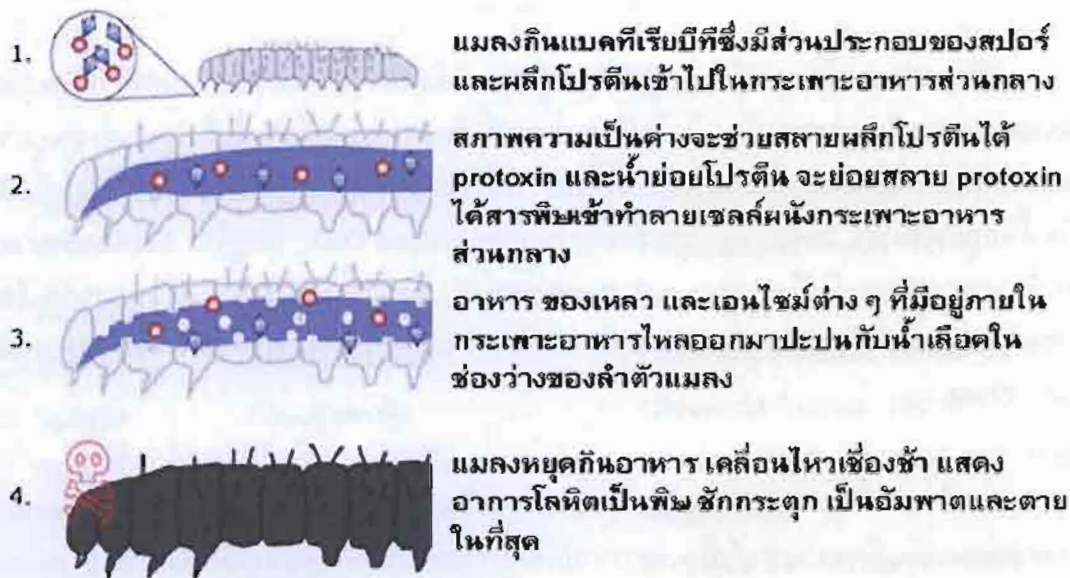
1.6 กลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

เมื่อแมลงได้รับผลึกโปรตีน สภาพความเป็นต่างในกระเพาะอาหารจะสลายผลึกโปรตีน ได้ protoxin และน้ำย่อยจะย่อย protoxin ได้สารพิษ เข้าทำลายเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร โดยกลไกการเข้าทำลายแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร (gut paralysis) และทำให้เกิดอัมพาตทั่วตัว (general paralysis)

1.6.1 การเกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร แมลงจะแสดงอาการหลังจากที่มีการย่อยผลึกโปรตีนเนื่องจากกระเพาะอาหารของแมลงถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้แมลงหยุดกินอาหาร อาเจียนท้องเสีย แมลงจะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง ในกรณีของแมลงที่ได้รับพิษน้อยสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติภายใน 1-2 วันหลังจากได้รับผลึกโปรตีนเข้าไป ในช่วงที่เป็นอัมพาตนี้ สปอร์ของแบคทีเรียจะงอกและเจริญเป็นเส้นใยแทงทะลุไปยังช่องว่างลำตัวแมลง (Burgess and Hussey, 1971)

1.6.2 การเกิดอัมพาตทั่วตัว เนื่องจากเกิดรอยแยกของผนังบุกระเพาะอาหาร ทำให้อาหารของเหลว และเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ภายในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสภาพเป็นด่างไหลมาปะปนกับน้ำเลือดในช่องว่างของลำตัวแมลงซึ่งมีสภาพเป็นกรด เกิดความไม่สมดุลของระดับโพแทสเซียมไอออน (K^+) และเลือดมีความเป็นด่างมากขึ้น ทำให้แมลงหยุดกินอาหาร เคลื่อนไหวเชื่องช้า เป็นอัมพาต และตายในที่สุด *B. thuringiensis* บางสายพันธุ์ที่สร้าง exotoxin ที่ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว ด้วยอาการที่เรียกว่า "toximia" สารพิษแต่ละชนิด มีกลไกในการทำลายแมลงต่างกัน ในแมลงบางชนิดสารพิษที่ได้จาก *B. thuringiensis* จะไม่อันตรายแต่เมื่อผ่านเข้าสู่กระแสเลือด จะทวีจำนวนมากจนเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ หรือ septicemia (ทิพย์วดี, 2535; Knowles, 1993) ความแตกต่างระหว่างชนิดยีนที่ทำให้เกิดพิษ

ปริมาณของยีนที่แสดงออก และคุณสมบัติของสารพิษที่สร้างขึ้นมาเหล่านี้ล้วนมีอิทธิพลต่อความรุนแรง และการแสดงความเป็นพิษของ *B. thuringiensis* (Burges and Hussey, 1971)



ที่มา: จริยาและคณะ (2547)

ภาพที่ 1.2 แสดงกลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

1.7 การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*

การจำแนกสายพันธุ์ของ *B. thuringiensis* เริ่มจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอาศัยเทคนิคทางจุลชีววิทยาเนื่องจาก *B. thuringiensis* มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *B. cereus*, *B. mycoides*, และ *B. anthracis* แต่ระดับการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมี มีความแปรปรวนภายในสายพันธุ์เดียวกัน ดังนั้นการทดสอบทางชีวเคมีจึงไม่สามารถแยกสายพันธุ์ และสายพันธุ์ย่อยของ *B. thuringiensis* ได้อย่างสมบูรณ์ (Burges, 1981; Sneath et al., 1986; Heimpel and Angus, 1958)

Bonnefoi and de Barjac (1963) ได้จำแนกสายพันธุ์ *B. thuringiensis* โดยการหาปฏิกิริยาของ antibody ที่มีต่อ flagellin แล้วแยกสายพันธุ์ต่าง ๆ นี้ออกเป็น H-serotype วิธีนี้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงและน่าเชื่อถือ ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ทั้งหมด 69 serotypes และทำการแบ่งย่อยออกเป็น 81 serovars (Lecadet et al., 1999) ตามตารางที่ 1.1 ต่อมา มีการจำแนก *B. thuringiensis* โดยวิเคราะห์เอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ที่สกัดได้จากเซลล์ในขณะเจริญเติบโต (vegetative cell) โดยการใช้ starch-gel electrophoresis ซึ่งรูปแบบของเอสเตอเรส สามารถ

แบ่งออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจนโดยมีความสอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ปฏิกิริยาของ antibody อย่างไรก็ตาม การจำแนกโดยวิธีนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคของ *B. thuringiensis* ที่นำมาทดสอบ (Norris and Burges, 1963)

วิธีการจำแนกโดยใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอจากโคโลนีของแบคทีเรีย (colony hybridization) เป็นการถ่ายโอนโคโลนีของแบคทีเรียจากจานเลี้ยงเชื้อไปสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) นำไป hybridize กับโพรบ (probe) เพื่อหาดำแหน่งของโคโลนีที่มียีนนั้นอยู่ (สุรินทร์, 2543) วิธีนี้ใช้ครั้งแรกในการหา clone DNA ที่อยู่ใน *Escherichia coli* จากนั้นนำมาประยุกต์ใช้ในการแยก *B. thuringiensis* ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะสมในการคัดเลือก *B. thuringiensis* ที่เก็บมาในปริมาณมากซึ่งจะลดเวลา และค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ (Hansen et al., 1998)

การจำแนกโดยการเปรียบเทียบตำแหน่งของยีน *cry* ที่อยู่บนโครโมโซม (comparison of chromosome) มีจุดประสงค์เพื่อแยกความแตกต่างระหว่าง *B. thuringiensis* และ *B. cereus* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) และการใช้ pulse field gel electrophoresis (PFGE) ซึ่ง Lövgren et al. (1998) ได้นำวิธีดังกล่าวมาเปรียบเทียบ *B. thuringiensis* subsp. *gelechia*, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *B. thuringiensis* subsp. *berliner* ซึ่งอยู่ใน serotype เดียวกัน พบว่าสายพันธุ์ *gelechia* และ *berliner* มีตำแหน่งของยีนคล้ายกัน ขณะที่ตำแหน่งของยีนระหว่างสายพันธุ์ *thuringiensis* และ *gelechia* มีความแตกต่างกันมาก

ตารางที่ 1.1 สายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่จำแนกตาม H-serotype

H-serotype	Serovar	First mention and first valid description
1	<i>thuringiensis</i> ^a	Berliner 1915; Heimpel and Angus, 1958
2	<i>finitimus</i>	Heimpel and Angus, 1958
3a3c	<i>alesti</i>	Toumanoff and Vago, 1951; Heimpel and Angus, 1958
3a3b3c	<i>kurstaki</i>	de Barjac and Lemille, 1971
3a3d	<i>sumiyoshiensis</i>	Ohba and Aizawa, 1989b
3a3d3e	<i>fukuokaensis</i>	Ohba and Aizawa, 1989b
4a4b	<i>sotto (dendrolimus)</i>	Ishiwata 1901; Heimpel and Angus, 1959
4a4c	<i>kenyae</i>	Bonnefoi and de Barjac, 1964
5a5b	<i>galleriae</i>	Shvetsova 1959 and de Barjac and Bonnefoi, 1963
5a5c	<i>canadensis</i>	de Barjac and Bonnefoi, 1973
6	<i>entomocidus (subtoxicus)</i>	Heimpel and Angus, 1959
7	<i>aizawai</i>	Bonnefoi and de Barjac, 1963
8a8b	<i>morrisoni(tenebrionis)</i>	Bonnefoi and de Barjac, 1963
8a8c	<i>ostrinae</i>	Ren <i>et al.</i> , 1975
8b8d	<i>nigeriensis</i>	Weiser and Prasertphon, 1984
9	<i>tolworthi</i>	Norris 1964; de Barjac and Bonnefoi, 1968
10a10b	<i>darmstadiensis</i> ^c	Krieg <i>et al.</i> , 1969
10a10c	<i>londrina</i>	Arantes unpubl.
11a11b	<i>toumanoffi</i>	Krieg, 1969
11a11c	<i>kyushuensis</i>	Ohba and Aizawa, 1979b
12	<i>thompsonii</i>	de Barjac and Thompson, 1970

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

H-serotype	Serovar	First mention and first valid description
13	<i>pakistani</i>	de Barjac <i>et al.</i> , 1977
14	<i>israelensis</i>	de Barjac, 1978
15	<i>dakota</i>	DeLucca <i>et al.</i> , 1979
16	<i>indiana</i>	DeLucca <i>et al.</i> , 1979
17	<i>tohokuensis</i>	Ohba <i>et al.</i> , 1981a
18a18b	<i>kumanotoensis</i>	Ohba <i>et al.</i> , 1981b
18a18c	<i>yosoo</i>	Lee <i>et al.</i> , 1995a
19	<i>tochigiensis</i>	Ohba <i>et al.</i> , 1981b
20a20b	<i>yunnanensis</i>	Wan-yu <i>et al.</i> , 1979
20a20c	<i>pondicheriensis</i>	Rajagopalan <i>et al.</i> , unpubl.
21	<i>colmeri</i>	De Lucca <i>et al.</i> , 1984
22	<i>shandongensis</i>	Wang Ying <i>et al.</i> , 1986
23	<i>japonensis</i>	Ohba and Aizawa, 1986
24a24b	<i>neoleonensis</i>	Rodriguez-Padilla <i>et al.</i> , 1990
24a24c	<i>novosibirsk</i>	Burtseva <i>et al.</i> , 1995
25	<i>coreanensis</i>	Lee <i>et al.</i> , 1995
26	<i>silo</i>	de Barjac and Lecadet unpubl.
27	<i>mexicanensis</i>	Rodriguez-Padilla and Galan-Wong unpubl.
28a28b	<i>monterrey</i>	Rodriguez-Padilla <i>et al.</i> unpubl.
28a28c	<i>jegathesan</i>	Seleena <i>et al.</i> , 1995
29	<i>amagiensis</i>	Ohba unpubl.
30	<i>medellin</i>	Ordaz <i>et al.</i> , 1992
31	<i>toguchini</i>	Hodirev unpubl.
32	<i>cameroun</i>	Juarez-Perez <i>et al.</i> , 1994
33	<i>leesis</i>	Lee <i>et al.</i> , 1994

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

H-serotype	Serovar	First mention and first valid description
34	<i>konkukian</i>	Lee <i>et al.</i> , 1994
35	<i>seoulensis</i>	Lee <i>et al.</i> , 1995
36	<i>malaysiensis</i>	Ho unpubl.
37	<i>anduluciensis</i>	Aldebis <i>et al.</i> , 1996
38	<i>oswaldocruzi</i>	Rabinovitch <i>et al.</i> , 1995
39	<i>brasiliensis</i>	Rabinovitch <i>et al.</i> , 1995
40	<i>huazhongensis</i>	Dai Jingyuan <i>et al.</i> , 1996
41	<i>sooncheon</i>	Lee <i>et al.</i> , 1995
42	<i>jinghongiensis</i>	Li Rong Sen <i>et al.</i> , unpubl.
43	<i>guiyaniensis</i>	Li Rong Sen <i>et al.</i> , unpubl.
44	<i>higo</i>	Ohba <i>et al.</i> , 1995
45	<i>roskildiensis</i>	Hinrinschen <i>et al.</i> , unpubl.
46	<i>chanpaisis</i>	Chanpaisaeng unpubl.
47	<i>wratislaviensis</i>	Lonc <i>et al.</i> , 1997
48	<i>balearica</i>	Caballero <i>et al.</i> , unpubl.
49	<i>muju</i>	Seung Hwan Park <i>et al.</i> , unpubl.
50	<i>navarrensensis</i>	Caballero <i>et al.</i> , unpubl.
51	<i>xiaguangiensis</i>	Jian Pin Yan unpubl.
52	<i>kim</i>	Kim <i>et al.</i> unpubl.
53	<i>asturiensis</i>	Aldebis <i>et al.</i> 1996
54	<i>poloniensis</i>	Damgaard <i>et al.</i> 1996
55	<i>palmanyolensis</i>	Santiago-Alvarez unpubl.
56	<i>rongseni</i>	Li Rong Sen <i>et al.</i> in press
57	<i>pirenaica</i>	Caballero <i>et al.</i> unpubl.
58	<i>argentinensis</i>	Campos-Dias <i>et al.</i> inpubl.
59	<i>iberica</i>	Caballero <i>et al.</i> unpubl.

ตารางที่ 1.1 (ต่อ)

H-serotype	Serovar	First mention and first valid description
60	<i>pingluonsis</i>	Li Rong Sen <i>et al.</i> in press
61	<i>sylvestriensis</i>	Damgaard unpubl.
62	<i>zhaodongensis</i>	Li Rong Sen <i>et al.</i> unpubl.
63	<i>bolivia</i>	Ferre-Manzanero <i>et al.</i> unpubl.
64	<i>azorensis</i>	Santiago-Alvarez unpubl.
65	<i>pulsiensis</i>	Khalique and Khalique unpubl.
66	<i>graciosensis</i>	Santiago-Alvarez unpubl.
67	<i>vazensis</i>	Santiago-Alvarez unpubl.
68	<i>thailandensis</i>	Chanpaisaeng <i>et al.</i> unpubl.
69	<i>pahangi</i>	Seleena and Lee unpubl.

- ^a รวมทั้ง *B. thuringiensis* subsp. *gelechia*, *B. thuringiensis* subsp. *insectus* และ *B. thuringiensis* subsp. *berliner*
- ^b *tenebrionis* มีการจำแนกเป็น *B. thuringiensis* subsp. *sandiego*
- ^c *B. thuringiensis* subsp. *caucasicus* อยู่ในกลุ่ม H10a โดย Afrikyan และ Chil Akopyan ในปี ค.ศ. 1980 โดยสายพันธุ์นี้แยกได้ครั้งแรกจากหนอนไหมในปี ค.ศ. 1961 ในประเทศอาร์เมเนีย

ที่มา: Lecadet *et al.*, (1999)

1.8 การจัดจำแนกโปรตีน Cry และ ยีน cry (crystal protein gene)

เนื่องจากผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* เป็นหน่วยที่สร้างสารพิษเพื่อทำลายแมลงชนิดของผลึกโปรตีนที่แตกต่างกัน จะมีฤทธิ์ในการเข้าทำลายกลุ่มแมลงต่างกันไป Hofte and Whiteley (1989) ได้พัฒนาระบบอนุกรมวิธานในการตั้งชื่อยีนที่สร้างโปรตีนของ *B. thuringiensis* จัดออกเป็นกลุ่มโดยใช้ความแตกต่างของกรดอะมิโน และความสามารถในการทำลายแมลงแต่ละชนิด โดยแบ่งได้ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 โปรตีน CryI

โปรตีน CryI แบ่งออกเป็น 8 กลุ่มย่อยคือ CryIA-CryIH ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์มีขนาดโปรตีน 130-138 กิโลดาลตัน และมีพิษกับหนอนผีเสื้อ โปรตีน CryIA แยกจากโปรตีน Cry อื่นๆโดยใช้ความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโน (sequence homology) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นโปรตีน CryIAa, CryIAb และ CryIAc มีคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Hofte and Whiteley, 1989) จากการนำยีน cryIAa จาก *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* สายพันธุ์ HD-1 (Dipel) โคลนใน *E. coli* ได้โปรตีน CryIAa ที่มีพิษกับหนอนกินใบยาสูบ (*Manduca sexta*) และหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Lecadet et al., 1992) โปรตีน CryIAb จาก *B. thuringiensis* Berliner 1715 และโปรตีน CryIAc จาก *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* และ *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* พบว่ามีพิษกับหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni*) หนอนเจาะผักขาวโพดและหนอนผีเสื้อยิบซี (*Lymantria dispar*) แต่มีพิษน้อยกว่าหนอนใยผัก และในบางครั้งกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (*Ostrinia nubilalis*) (Michel et al., 1991) แต่ Janes et al. (1990) รายงานว่า โปรตีน CryIAc จาก *B. thuringiensis* strain HD 263 แสดงประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

โปรตีน CryIC มีพิษสูงกับลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) และหนอนกินใบยาสูบ (Widner and Whiteley, 1989) แต่มีพิษต่ำเมื่อทดสอบกับตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (Bradley et al., 1995) นอกจากนี้ Hofte et al. (1990) รายงานว่าโปรตีน CryIC มีพิษสูงกับหนอนผีเสื้อในกลุ่มหนอนกระทู้ แต่ไม่มีพิษกับหนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนผีเสื้อทำลายกะหล่ำปลี (*Mamestra brassicae*) ซึ่งคล้ายกับโปรตีน CryIAa โปรตีน CryIE มีพิษสูงกับหนอนกระทู้หอม และมีพิษเทียบเท่ากับโปรตีน CryIC เมื่อนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้หอมเช่นเดียวกัน (Masson et al., 1992) โปรตีน CryIF มีพิษกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด และหนอนเจาะยอดยาสูบ แต่เมื่อทดสอบกับหนอนกระทู้หอม โปรตีน CryIF จะมีพิษปานกลาง ขณะที่ไม่แสดงความเป็นพิษเมื่อทดสอบกับหนอนเจาะยอดยาสูบ Chambers et al. (1991) รายงานเพิ่มเติมว่าโปรตีน CryIF มีความเป็นพิษมากกว่า

CryIAb เมื่อทดสอบกับหนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนกระทู้หอม แต่มีพิษเท่ากันเมื่อทดสอบกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด

กลุ่มที่ 2 โปรตีน CryII

ผลึกโปรตีนรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า (rectangular shape) ประกอบด้วยโปรตีนขนาด 71 กิโลดาลตัน พบใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* Berliner, *B. thuringiensis* subsp. *tolworthi* และ *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* (Yamamoto, 1983) โปรตีน CryIIA มีพิษโดยเฉพาะกับแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนผีเสื้อยิบซี นอกจากนี้มีพิษกับลูกน้ำยุงลาย ความเป็นพิษของโปรตีน CryIIA เมื่อทดสอบกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด และหนอนผีเสื้อยิบซี แสดงความเป็นพิษเทียบเท่ากับโปรตีน CryIA (Chambers et al., 1991) โปรตีน CryIIB และโปรตีน CryIIC มีความเป็นพิษกับแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อบางชนิดเท่านั้น ขณะที่โปรตีน CryIIB มีพิษกับหนอนผีเสื้อหลายชนิด เช่น หนอนผีเสื้อยิบซี หนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนคืบกะหล่ำ (Dankocsik et al., 1990)

กลุ่มที่ 3 โปรตีน CryIII

กลุ่มโปรตีน CryIII ประกอบด้วยโปรตีน CryIIIA โปรตีน CryIIIB โปรตีน CryIIIC และโปรตีน CryIIID ทั้ง 4 ชนิดนี้มีความเป็นพิษกับตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle มีเพียงโปรตีน CryIIIC เท่านั้นที่มีพิษกับหนอนเจาะกินรากข้าวโพด (*Diabrotica undecimpunctata*) (Chilcott and Wigley, 1994) Sick et al. (1990) รายงานว่า ยีน cryIIIA สร้างโปรตีนขนาด 129 กิโลดาลตัน เมื่อถูกย่อยโดยน้ำย่อย proteolytic ในกระเพาะอาหารจะเกิดเป็นสารพิษที่มีขนาด 72 กิโลดาลตัน ขณะที่ยีน cryIIIB จะสร้างโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ระหว่างโปรตีน CryIIIA และโปรตีน CryIIIB มีความเหมือนกันของกรดอะมิโน 69 เปอร์เซ็นต์ ยีน cryIIID สร้างโปรตีนขนาด 70 กิโลดาลตัน มีผลึกโปรตีนรูปร่างสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (rhomboidal shape) เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่างโปรตีน CryIIIB, CryIIIC และโปรตีน CryIIID โดยทดสอบกับตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle พบว่าโปรตีน CryIIID แสดงความเป็นพิษมากกว่าโปรตีน CryIIIB และโปรตีน CryIIIC 5 และ 18 เท่า ตามลำดับ (Lambert and Peferone, 1992)

กลุ่มที่ 4 โปรตีน CryIV

โปรตีน CryIV (A, B, C และ D) มีน้ำหนักโมเลกุล 135, 128, 74 และ 72 กิโลดาลตัน ตามลำดับ มีความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Diptera เช่น ลูกน้ำยุง ซึ่ง Chang et al. (1994) รายงานว่า *B. thuringiensis* var. *israelensis* และ *B. thuringiensis* var. *morrisoni* (PG-14) ทั้งสองไอโซเลทนี้สร้างผลึกโปรตีนรูปไข่ ขนาด 27, 72, 128 และ 130 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็น

โปรตีน CytA, CryIVD, CryIVB และ CryIVA ตามลำดับ โปรตีน CryIVA มีพิษรุนแรงกับลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles gambiae*) แต่มีพิษเล็กน้อยกับลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) โปรตีน CryIVA และ CryIVB ทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงความเป็นพิษเท่ากันเมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย และลูกน้ำยุงก้นปล่อง แต่โปรตีน CryIVA จะมีพิษสูงกว่า CryIVB เมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญ (Crickmore and Ellar, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน CryIVB มีพิษกับหนอนแมลงวันแมงมุม (*Tipula oleracea*) และลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*A. stephensi*) ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย

กลุ่มที่ 5 โปรตีน CryV

โปรตีน Cry V มีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อและหนอนด้วงและมีพิษกับกลุ่มไส้เดือนฝอย โดยมีขนาดของโปรตีน 140-150 กิโลดาลตันต่อมา Taylor *et al.* (1992) รายงานว่า พบโปรตีน CryV ซึ่งได้จาก *B. thuringiensis* 4835 มีขนาด 81.2 กิโลดาลตัน มีพิษกับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera และ Coleoptera และในปี ค.ศ. 1993 Gleave *et al.* รายงานว่า พบยีน cryV ใน *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* DSIR 732 ยีนดังกล่าวนี้ สร้างโปรตีนขนาด 81.2 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 719 ตัว มีความเป็นพิษกับหนอนผีเสื้อทำลายแอปเปิล (*Epiphyas postvittana*)

กลุ่มที่ 6 โปรตีน CytA และ CytB

โปรตีน CytA และ CytB พบใน *B. thuringiensis* ที่ฆ่าแมลงในอันดับ Diptera โดยโปรตีน CytA พบใน *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* และ *B. thuringiensis* subsp. *morrisoni* นำหนักโมเลกุล 27 กิโลดาลตัน ผลึกโปรตีนเป็นรูปไข่ (Chang *et al.*, 1994) โปรตีน CytB มีขนาดโมเลกุล 27.3 กิโลดาลตัน ซึ่งพบใน *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis* (H11a11c) (Koni and Ellar, 1993)

ในบรรดาโปรตีน Cry ตั้งแต่ CryI ถึง CryV กลุ่ม CryI เป็นกลุ่มที่มีผู้ศึกษาแพร่หลายที่สุด เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ทำลายแมลงจำพวก Lepidoptera ซึ่งเป็นกลุ่มแมลงที่เข้าทำลายพืชผักเศรษฐกิจ ต่อมา มีการพบผลึกโปรตีนจาก *B. thuringiensis* เพิ่มมากขึ้น วิธีการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติความเป็นพิษ รูปร่าง และขนาดของผลึกโปรตีนไม่สามารถจำแนกชนิดของยีน cry ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น Carozzi *et al.* (1991) จึงออกแบบไพรเมอร์ 12 แบบ ได้แก่ ไพรเมอร์ Lep1A (5' CCG GTG CTG GAT TTG TGT TA 3') ไพรเมอร์ Lep1B (5' AAT CCC GTA TTG TAC CAG CG 3') ไพรเมอร์ Lep2A (5' CCG AGA AAG TCA AAC ATG CG 3') และไพรเมอร์ Lep2B (5' TAC ATG CCC TTT CAC GTT CC 3') ที่ออกแบบจากยีน cry IA(b) ของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ไพรเมอร์ Col1A (5' GTC CGC TGT ATA TTC AGG TG 3') ไพรเมอร์ Col1B (5' CAC TTA ATC CTG TGA CGC CT 3') ไพรเมอร์

Col2A (5' AGG TGC CAA CTA ACC ATG TT 3') และไพรเมอร์ Col2B (5' GAT CCT ATG CTT GGT CTA GT 3') ที่ออกแบบจากยีน *cry IIIA* ของ *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* ไพรเมอร์ Dip1A (5' CAA GCC GCA AAT CTT CTG GA 3') ไพรเมอร์ Dip1B (5' ATG GCT TGT TTC GCT ACA TC 3') ไพรเมอร์ Dip2A (5' GGT GCT TCC TAT TCT TTG GC 3') และไพรเมอร์ Dip2B (5' TGA CCA GGT CCC TTG ATT AC 3') ที่ออกแบบจากยีน *cry IV* ของ *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* ในการทำ PCR เพื่อช่วยในการจัดจำแนกยีน *cryI*, *cryIII*, *cryIV* ซึ่งจำเพาะต่อแมลงกลุ่ม Lepidoptera, Coleoptera และ Diptera ตามลำดับ ซึ่งผลการจัดจำแนกโดยเทคนิค PCR สอดคล้องกับการจัดจำแนกโดยวิธี bioassay

ในปี ค.ศ. 1996 Kuo and Chak ใช้ไพรเมอร์แบบ Universal จำนวน 2 คู่ คือ ไพรเมอร์ K5UN2 (5' AGG ACC AGG ATT TAC AGG AGG 3') ไพรเมอร์ K3UN2 (5' GCT GTT GAC ACG AAG GAT ATA GCC AC 3') ในการจัดจำแนกและเพิ่มปริมาณยีน *cryI* ด้านปลาย 3' ไพรเมอร์ K5UN3 (5' CAA TGC GTA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT 3') ไพรเมอร์ K3UN3 (5' CCT CCT GTA AAT CCT GGT CCT 3') ในการจัดจำแนกและเพิ่มปริมาณยีน *cryI* ด้านปลาย 5' โดยออกแบบมาจากส่วนอนุรักษ์ของยีน *cryI* ที่ทราบลำดับเบสแล้ว เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของยีน *cryI* จาก *B. thuringiensis* สายพันธุ์ใหม่ โดยใช้วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ร่วมกับวิธี PCR ผลการศึกษา *B. thuringiensis* 20 สายพันธุ์ พบยีน *cryI* จำนวน 14 ชนิด ซึ่งคาดว่าจะมีชนิดใหม่จำนวน 7 ชนิด หลังจากการเปรียบเทียบลำดับเบสกับยีน *cryI* ในฐานข้อมูลพบว่ามีผลสอดคล้องกัน

ในปี ค.ศ. 1997 Juarez-Perez *et al.* ได้จัดจำแนกยีน *cry* โดยใช้เทคนิค PCR สองขั้นตอนคือ ขั้นแรกจัดจำแนกกลุ่มของยีน *cryI* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากการนำลำดับเบสของยีนกลุ่ม *cryI* จาก GenBank มาเปรียบเทียบกันโดยใช้คอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม DNASTar แล้วสร้างไพรเมอร์สองสายขนาด 20 เบส ที่ตำแหน่ง 2,268 ได้แก่ ไพรเมอร์ I(+) (5' MDA TYT CTA KRT CTT GAC TA 3') และตำแหน่ง 726 ของยีน ได้แก่ ไพรเมอร์ I(-) (5' TRA CRH TDD BDG TAT TAG AT 3') (B = C, G หรือ G; D = A, G หรือ T; H = A, T หรือ T; K = G หรือ T; M = A หรือ C; R = A หรือ G; Y = T หรือ C) ทำ PCR กับยีน *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE*, *cryIG*, *cryIIA* และ *cryIIIA* เกิดแถบขนาด 1.5-1.6 กิโลเบสกับยีนกลุ่ม *cryI* แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับยีนในกลุ่ม *cryIIA* และ *cryIIIA* จากนั้นจึงใช้ไพรเมอร์ IA's (5' CAA TAG TCG TTA TAA TGA TT 3') ไพรเมอร์ IAa (5' TTC CCT TTA TTT GGG AAT GC 3') ไพรเมอร์ IAb (5' CGG ATG CTC ATA GAG GAG AA 3') ไพรเมอร์ IAc (5' GGA AAC TTT CTT TTT AAT GG 3') ไพรเมอร์ IAd (5' ACC CGT ACT GAT CTC AAC TA 3') ไพรเมอร์ IB (5' GGC TAC CAA TAC TTC TAT TA 3') ไพรเมอร์ IC (5' ATT TAA TTT ACG TGG TGT TG 3') ไพรเมอร์ ID (5' CAG GCC TTG ACA ATT CAA AT 3') ไพรเมอร์ IE (5' TAG

GGA TAA ATG TAG TAC AG 3') ไพรเมอร์ IF (5' GAT TTC AGG AAG TGA TTC AT 3') ไพรเมอร์ IG (5' GGT TCT CAA AGA TCC GTG TA 3') ที่จำเพาะต่อยีน *cryIA*, *cryIA(a)*, *cryIA(b)*, *cryIA(c)*, *cryIA(d)*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE*, *cryIF* และ *cryIG* ตามลำดับ ทำ PCR ด้วย 3 ไพรเมอร์ ได้แก่ I(+) และ I(-) ร่วมกับไพรเมอร์ใด ไพรเมอร์หนึ่งเพื่อจัดจำแนกชนิดของยีน *cryI* ให้ละเอียดและสะดวกยิ่งขึ้น ผลจากการทำ PCR เกิดแถบดีเอ็นเอ 2 แถบคือ แถบขนาด 1.5-1.6 กิโลเบส และแถบที่เฉพาะกับยีน ในงานทดลองนี้ยังสามารถตรวจสอบพบยีน *cryIB* ชนิดใหม่ หลังจากทำการโคลนและศึกษาการเรียงลำดับเบสของยีนแล้ว พบว่าลำดับโปรตีนที่ผลิตจาก *cryIB* แตกต่างจากรายงานในฐานข้อมูลถึง 16.1 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 1998 Crickmore *et al.* ได้ปรับปรุงระบบการเรียกชื่อยีน *cry* โดยอาศัยการกระจายตัวทางวิวัฒนาการ ความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับกรดอะมิโน และโปรแกรมทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ในการเรียกชื่อยีน โดยแบ่ง delta-endotoxin ของ *B. thuringiensis* เป็น 2 กลุ่มได้แก่กลุ่มยีน *cry* และกลุ่มยีน *cyt* ตัวเลขอารบิกแทนชื่อ subfamily ใน subfamily เดียวกันจะมีผลต่อแมลงในอันดับ (Order) เดียวกันและมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่าร้อยละ 45 อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่แทนชื่อ group ใน group เดียวกันมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 45-75 อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กอักษรเดียวกันจะมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 75-95 โดยลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันเกิดขึ้นจากตำแหน่งกลายพันธุ์ (point mutation) ส่วนตารางที่ 1.2 แสดงการเรียกชื่อยีน *cry* และ *cyt* ใหม่เปรียบเทียบกับชื่อยีน *cry* และ *cyt* เดิม โดย http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/BU/ (Crickmore *et al.*, 2006)

ตารางที่ 1.2 การเรียกชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบใหม่เทียบกับชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบเดิม

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
<i>cry1Aa1</i>	<i>cryIA(a)</i>	<i>kurstaki</i> HD1	M11250
<i>cry1Aa2</i>	<i>cryIA(a)</i>	<i>sotto</i>	M10917
<i>cry1Aa3</i>	<i>cryIA(a)</i>	<i>aizawai</i> IPL7	D00348
<i>cry1Aa4</i>	<i>cryIA(a)</i>	<i>entomocidus</i>	X13535
<i>cry1Aa9</i>		<i>dendrolimus</i> T84A1	AB026261
<i>cry1Ab1</i>	<i>cryIA(b)</i>	<i>berliner</i> 1715	M13898
<i>cry1Ab6</i>	<i>cryIA(b)</i>	<i>kurstaki</i> NRD-12	M37263
<i>cry1Ab7</i>	<i>cryIA(b)</i>	<i>aizawai</i> IC1	X13233
<i>cry1Ab-like</i>		<i>kunthala</i> Rx24	AF327924
<i>cry1Ac2</i>	<i>cryIA(c)</i>	<i>kenyae</i>	M35524
<i>cry1Ad1</i>	<i>cryIA(d)</i>	<i>aizawai</i>	M73250
<i>cry1Ae1</i>	<i>cryIA(e)</i>	<i>alesti</i>	M65252
<i>cry1Ba1</i>	<i>cryIB</i>	<i>thuringiensis</i> HD2	X06711
<i>cry1Bc1</i>	<i>cryIB(c)</i>	<i>morrisoni</i>	Z26442
<i>cry1Bd1</i>	<i>cryE1</i>	<i>wuhanensis</i> HD525	U70726
<i>cry1Cb1</i>	<i>cryIC(b)</i>	<i>galleriae</i> HD29	M97880
<i>cry2Aa8</i>		<i>dongbei</i> 66	AF252262
<i>cry2Ac1</i>	<i>cryIIC</i>	<i>shanghai</i> S1	X57252
<i>cry3Aa1</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>san diego</i>	M22472
<i>cry3Aa2</i>	<i>cryIIIA</i>	<i>tenebrionis</i>	J02978
<i>cry3Ba1</i>	<i>cryIIIB2</i>	<i>tolworthi</i> 43F	X17123
<i>cry7Ab1</i>	<i>cryIIICb</i>	<i>dakota</i> HD511	U04367
<i>cry8Aa1</i>	<i>cryIIIE</i>	<i>kumamotoensis</i>	U04364
<i>cry15Aa1</i>	34kDa	<i>thompsonii</i>	M76442
<i>cry19Aa1</i>	Jeg65	<i>jegathesan</i> 367	YO7603
<i>cry19Ba1</i>		<i>higo</i>	D88381
<i>cry20Aa1</i>	86kDa	<i>fukuokaensis</i>	U82518
<i>cry21Ba1</i>		<i>Bt roskildiensis</i>	AB088406
<i>cry26Aa1</i>		<i>finitimus</i> B-1166	AF122897
<i>cry32Aa1</i>		<i>yunnanensis</i>	AY008143
<i>cyt1Ab1</i>	<i>cytIM</i>	<i>medellin</i>	X98793
<i>cyt1Ba1</i>		<i>neoleoensis</i>	U37196
<i>cyt1Ca1</i>		<i>israelensis</i>	AL731825
<i>cyt2Aa1</i>		<i>kyushuensis</i>	Z14147
<i>cyt2Aa2</i>	<i>cytB</i>	<i>darmstadiensis</i> 73E10	AF472606

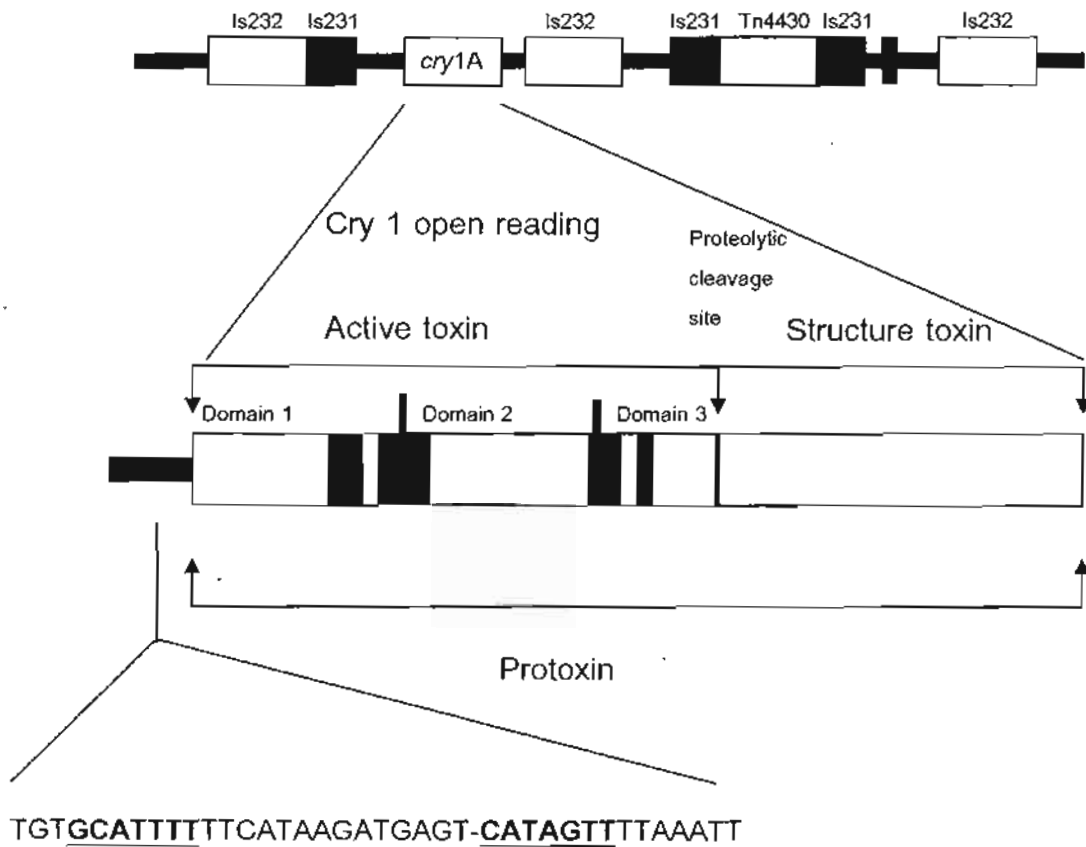
ที่มา: Crickmore et al. (2006)

1.9 ยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลง

Hofte and Whiteley (1989) ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *cryIA(a)*, *cryIA(b)* และ *cryIA(c)* ดังนี้ ประการที่ 1 องค์ประกอบส่วนโปรโมเตอร์ของยีนใน *B. thuringiensis* มี 2 ตำแหน่งคือ BII และ BIII โดย BII จะเริ่มทำงานในระยะแรกของการสร้างสปอร์ เป็นที่จับของ RNA Polymerase ที่สัมพันธ์กับ sigma subunit ขนาด 35 กิโลดาลตัน ซึ่งต่างจาก RNA Polymerase ในระยะ vegetative ที่มี sigma subunit ขนาด 60 กิโลดาลตัน และ BIII จะถูกกระตุ้นในระหว่างการสร้างสปอร์ เป็นที่จับกับ RNA Polymerase ที่มี sigma subunit ขนาด 28 กิโลดาลตัน ประการที่ 2 ส่วนบริเวณรหัสหยุดมีการล่อรหัสซึ่งมีประสิทธิภาพสูงมาก การเรียงตัวของดีเอ็นเอบริเวณนี้มีผลช่วยเพิ่มความเสถียรต่อ mRNA ที่ใช้ในการสร้างผลึกโปรตีน แต่การแปลรหัสของยีนควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่โคลนเข้าไปในพลาสมิดหลายชนิด จะไม่สัมพันธ์กับการสร้างสปอร์

ในปี ค.ศ. 1993 Carlson and Kolsto พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนในแบคทีเรีย *B. thuringiensis* อาจพบทั้งบนโครโมโซมและพลาสมิด ในบางสายพันธุ์พบว่ายีนดังกล่าวปรากฏเฉพาะบนโครโมโซม แต่ส่วนใหญ่จะพบอยู่บนพลาสมิด เช่น ยีน *cry1Aa*, *cry1Ac*, *cry2A* และ *cry2B* เป็นยีนของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ที่พบบน 110 mDa plasmid ขนาดโมเลกุลของพลาสมิดใน *B. thuringiensis* มีหลายขนาดตั้งแต่ 2,000 คู่เบส จนถึงมีขนาดใหญ่กว่า 200,000 คู่เบส และใน *B. thuringiensis* หนึ่งเซลล์สามารถพบพลาสมิดตั้งแต่ 1 ถึง 17 ชิ้น หรือไม่พบเลย (Gonzalez and Carlton, 1980) การกระจายตัวของยีน *cry* ภายใน พลาสมิดส่วนมากของ *B. thuringiensis* สามารถเปลี่ยนตำแหน่งได้ และในหลายกรณี ยีน *cry* อยู่บนพลาสมิด conjugative จากการทดลองพบว่า พลาสมิดสามารถถ่ายทอดได้ทั้งระหว่างเซลล์ในสายพันธุ์เดียวกันหรือต่างสายพันธุ์ Gonzalez et al. (1982) รายงานว่า *B. thuringiensis* มักพบพลาสมิดอยู่ภายในเซลล์และสามารถถ่ายทอดไปยังเซลล์อื่นๆโดยการจับคู่กันของเซลล์คล้ายการเกิดคอนจูเกชัน (conjugation-like) ระหว่างเซลล์กับเซลล์ เช่น จากผู้ให้ (donor) *B. thuringiensis* ไปยังผู้รับ (recipient) *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis* และ *B. anthracis* (Battisti et al., 1985) ได้

ยีน *cry* ส่วนใหญ่เป็น monocistronic คือ มีรหัสพันธุกรรมที่สร้างโปรตีนเพียงชนิดเดียว ดัง แสดงในภาพที่ 1.3 อย่างไรก็ตามบางยีนอาจอยู่ในรูปของ polycistronic เช่น *cry2A* ของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ที่มีลักษณะเป็น three-gene operon (Widner and Whiteley, 1989)



δ^E -dependent promoter ICP δ^K -dependent promoter ICP

ที่มา : Boucias *et al.* (1998)

ภาพที่ 1.3 Organization open reading frame ของ *cry1A* ที่ประกอบไปด้วยตำแหน่ง promoter Is และ Tn ยีน *cry1A* เช่น ยีน *cry1Ac* มีตำแหน่งอยู่บนพลาสมิดขนาด 75 กิโลเบส ของ *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* ซึ่งเป็น monocistronic ประกอบไปด้วย 2 โปโมเตอร์ คือ δ^E -dependent promoter ICP และ δ^K -dependent promoter ICP

ยีน *cryI* เป็นยีนที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera มีน้ำหนักโปรตีน 130-140 กิโลดาลตัน ผลึกรูปปิรามิดคู่ ในระหว่างการสร้างสปอร์ของ *B. thuringiensis* ในระยะนี้โปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูป protoxin ที่ละลายได้ในกระเพาะส่วนกลางของแมลงที่มีสภาพเป็นต่าง จากนั้น protoxin จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60-70 กิโลดาลตัน จากรายงานของ Hofte and Whiteley (1989) พบว่าการย่อย protoxin สามารถย่อยได้ด้วยโปรติเอสหลายชนิดในหลอดทดลอง

สารพิษ protoxin ของโปรตีน CryIAb และ CryIC ปรากฏอยู่บริเวณด้านปลาย N-terminal เมื่อถูกกระตุ้นด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดจะถูกย่อยที่ตำแหน่งที่ 29 และ 28 ตามลำดับ (Hofte and Whiteley, 1989) Negamatsa *et al.* (1984) ตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ของชิ้นส่วนของผลึกโปรตีนที่เป็น tryptic core fragment ของ *B. thuringiensis* subsp. *dendrolimus* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CryIA เริ่มต้นบริเวณกรดอะมิโนตัวที่ 29 และพบว่าโปรตีน CryIB มีบริเวณด้านปลาย N-terminal แตกต่างไปจากโปรตีน CryI อื่นๆ จากการศึกษา Deletion Analysis ในยีน *cryI* หลายชนิด ได้แก่ *cryIAa* (Schnepf and Whiteley, 1985), *cryIAb* (Hofte *et al.*, 1986; Wabiko *et al.*, 1986), *cryIAc* (Adang *et al.*, 1985) และ *cryIC* (Sanchis *et al.*, 1988) พบว่าทางด้านปลาย C-terminal ของโปรตีน Cry ไม่สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษได้ Hofte *et al.* (1986) รายงานว่าโปรตีน CryIAb ขนาดเล็กที่สุดสามารถเกิดพิษได้อยู่ระหว่างโคดอน (codon) ที่ 29 ถึง 607 ถัดจากโคดอนออก 4 โคดอนทางปลาย 3' หรือตัดโคดอนออก 8 โคดอนจากปลาย 5' ทำให้ได้โปรตีนที่ไม่สามารถเกิดพิษได้

การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน CryI ใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis (Calabrese *et al.*, 1980; Jarret, 1985) และการใช้ปฏิกิริยาทาง monoclonal antibodies แสดงให้เห็นว่าผลึกโปรตีนบางชนิดประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 1 ชนิด (ตารางที่ 1.3) ในทางพันธุวิศวกรรมจากการโคลนยีนสร้างผลึกโปรตีนโดยใช้ดีเอ็นเอติดตามที่เฉพาะเจาะจง ทำให้ค้นพบยีนที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันหลายยีนในแบคทีเรีย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ (Kronstad *et al.*, 1983; Kronstad and Whiteley, 1986) ได้แก่ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 DiPel มียีน *cryIAa* และ *cryIAc* *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis* HD-2 มียีน *cryIAb* และ *cryIAc* (Hofte *et al.*, 1986) Bourque *et al.* (1993) รายงานว่าการศึกษาการกระจายตัวของยีน *cryIA* ด้วยระบบ multiplex polymerase chain reaction ซึ่งใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อบริเวณยีนที่สร้างโปรตีน *cryIAa*, *cryIAb* และ *cryIAc* ของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ทำให้สามารถแยกแยะความแตกต่างของสายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างรวดเร็ว Lee and Aronson (1991)

รายงานว่ *B. thuringiensis* subsp. *alesti* สร้างโปรตีนที่ผลิตสารพิษเฉพาะในกลุ่มโปรตีน CryIAb เท่านั้น

ตารางที่ 1.3 การกระจายตัวของผลึกโปรตีน 3 ชนิด ใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ต่างๆ จากการใช้ปฏิกิริยาของ monoclonal antibodies

Flagellar serotype	<i>B. thuringiensis</i> subsp.	สายพันธุ์	ชนิดของโปรตีนที่ตรวจสอบได้		
			CryIA	CryIB	CryIC
1	<i>thuringiensis</i>	HD-2, Berliner 1715	+	-	-
		HD-14	+(a)	-	-
		4412	-	+	-
3a		HD-4	+	-	-
3a3b		HD-1	+	-	-
		HD-73	+(c)	-	-
4a4b		HD-7	+	-	-
		HD-37	+(c)	-	-
4a4c		HD-5, HD-64	+(c)	-	-
		HD-136			
		HD-551	+	+	-
5a5b		HD-8, HD-129	+	?	?
6		HD-110, 4448	+(a)	+	+
6		HD-10	+	+	-
7		HD-11, HD-68	+	-	-
		HD-127, HD-854	+	-	+
		HD-229, HD-133			
		HD-137			
		HD-272	+	+	-
		HD-847	+	-	+
8a8b		HD-12	+	?	-
9		HD-12i	+	-	-

ที่มา : Hofte and Whiteley (1989)

การโคลนยีนในแบคทีเรีย ด้วยวิธีการทรานส์ฟอร์เมชัน (transformation) พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1928 โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษชื่อ Griffith ซึ่งพบในแบคทีเรีย *Pneumococcus pneumoniae* ปัจจุบันคือ *Streptococcus pneumoniae* กระบวนการนี้เป็นการถ่ายทอดพันธุกรรมที่มีขนาดเล็กจากแบคทีเรียผู้ให้ (donor) ไปยังผู้รับ (recipient) ในรูปของ naked DNA และเป็นกระบวนการที่มีโอกาสเกิดขึ้นได้น้อยมากในธรรมชาติ McLinden *et al.* (1985) ทำการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนจากพลาสมิดขนาด 75 กิโลเบสของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ *kurstaki* (HD-224) โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Sau* 3A แบบไม่สมบูรณ์ แล้วเชื่อมต่อพลาสมิด pBR 322 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam*HI โคลนที่ได้มีขนาดดีเอ็นเอขนาดประมาณ 4 กิโลเบสและให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบด้วยวิธี Enzyme linked immunosorbant assay (ELISA) จากนั้นตัดต่อยีนใหม่เข้ากับ pUC8 แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* สายพันธุ์ JM83 เพื่อผลิตโปรตีน Cry ขนาด 130 กิโลดาลตัน Tounsi *et al.* (1999) รายงานการโคลนยีน *cry1Aa* หรือ *crybns3-1* จาก *B. thuringiensis* ไอโซเลท BNS3 ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์ *kurstaki* และมีคุณสมบัติทางเคมีจัดเป็น H3a, 3b และ 3c จากการศึกษาหาลำดับเบสองค์ประกอบของยีน พบว่าทั้งยีนมี 3,531 คู่เบส กำหนดการสร้างโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,176 เรซิดิว จากการนำข้อมูลที่ได้ทั้งลำดับเบสองค์ประกอบ และลำดับกรดอะมิโนไปเปรียบเทียบกับกลุ่มยีน *cryIA(a)* อันพบว่ายีน *crybns3-1* จัดเป็นยีนกลุ่มใหม่

ตารางที่ 1.4 ความเป็นพิษของผลึกโปรตีนต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera

Cry protein	<i>B. thuringiensis</i> subsp./strain	LC ₅₀ ของโปรตีนต่อแมลง ¹		
		<i>P. brassicae</i> (µg/ml)	<i>M. sexta</i> (ng/cm ²)	<i>H. virescens</i> (ng/cm ²)
CryIA(a)	<i>aizawai</i> HD-68	0.8	5.2	90
CryIA(b)	<i>berliner</i> 1715	0.7	8.6	10
CryIA(c)	<i>kurstaki</i> HD-73	0.3	5.3	1.6
CryIB	<i>thuringiensis</i> 4412	2.8	>625	>625
CryIC	<i>entomocidus</i> HD-110	6.0	>128	>256
CryID	<i>aizawai</i> HD-68	>75	5	>256

¹โปรตีนที่ใช้ได้มาจากการแยกบริสุทธิ์จากรีคอมบิแนนท์โคลน (Recombinant clone) ผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* ที่ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว
ที่มา : Carlson and Kolsto (1993)

1.10 ความแรงของสารออกฤทธิ์ของ *Bacillus thuringiensis*

ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ประกอบด้วยสปอร์และผลึกโปรตีนที่มีสารพิษ Delta endotoxin และมีฤทธิ์ในการทำลายแมลง การวัดค่าความแรง (potency) ของสารออกฤทธิ์ของ *B. thuringiensis* แต่ละชนิดว่ามีระดับความแรงของสารออกฤทธิ์อยู่จำนวนเท่าใด โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพ (bioassay) กับหนอนแมลงศัตรูพืชเป้าหมาย เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานที่ทราบค่าความแรงแน่นอน ความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* ที่ทำให้หนอนตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC₅₀) จะนำมาคำนวณหาความแรงของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด โดยมีหน่วยเป็น ITU/mg (International Toxicity Unit / milligram)

$$\text{ค่าความแรงของ Bt ตัวอย่าง} = \frac{\text{LC}_{50} (\text{Bt มาตรฐาน}) \times \text{ค่าความแรงของ Bt มาตรฐาน}}{\text{LC}_{50} (\text{Bt ตัวอย่าง})}$$

ประสิทธิภาพการทำลายแมลงของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* จะแสดงหน่วยความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ (ผลึกโปรตีนและสปอร์) ของผลิตภัณฑ์ เป็น IU/mg หรือ ITU/mg (International Toxicity Unit / milligram) ในผลิตภัณฑ์ที่มีค่า IU สูง (ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์มาก) โอกาสที่ฆ่าแมลงจะมีมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่มีค่า IU ต่ำกว่า (ความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์น้อย) ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่มีวางจำหน่ายจะแสดงค่า IU ต่าง ๆ กัน เช่น 32,000 IU/mg 16,000 IU/mg และ 8,500 IU/mg เป็นต้น (ตารางที่ 1.5) ปัจจุบันมีการนำผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนไผ่ผัก เป็นต้น (จริยาและคณะ, 2547)

ตารางที่ 1.5 แสดงชื่อผลิตภัณฑ์ *Bacillus thuringiensis* และค่าความแรงของสารออกฤทธิ์

ผลิตภัณฑ์ <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i>	ค่าความแรง (IU/mg)	ผลิตภัณฑ์ <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i>	ค่าความแรง (IU/mg)
แบคโทสปิน เอชพี**	32,000	ฟลอร์แบค เอฟซี	8,500
ไบโอบิท 32 บี(เอฟซี)	8,499	ฟลอร์แบค เอชพี(ดับเบิลยูพี)	24,000
ไบโอบิท ดับเบิลยูพี	16,000	ทูเร็กซ์ 50 ดับเบิลยูพี	25,000
แบค 2 ไชด์เอส(เอฟซี)	8,000	ควอร์ก (เอฟซี)	3,000
เดลฟิน(=จาเวลิน***)			
ดับเบิลยูจี	53,000	อะกรี ดับเบิลยูจี	25,000
เดลฟิน อีเอส	17,600	ซีดาแบก เอฟซี	8,500
ดีเพล 2เอกซ์(ดับเบิลยูพี)	32,000	เซนตารี ดีเอฟ	35,000
ดีเพล อีเอส	17,600	เอ็กซ์ตรา เอสซี	8,500
ดีเพล ดีเอฟ	32,000		
ทรีไซด์ เอชพี(ดับเบิลยูพี)	16,000		
ควิสโตซิน	55,000		

ที่มา: IPM DANIDA (2549)

1.11 แมลงศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมายในการใช้ *Bacillus thuringiensis*

เนื่องจากปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดแมลงมีมากในแมลงศัตรูผัก ซึ่งเป็นพืชอายุสั้น มีแมลงศัตรูลงทำลายหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็นหนอนผีเสื้อ เช่น หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม หนอนคืบกระหล่ำ และหนอนใยผัก เป็นต้น ในกลุ่มแมลงศัตรูผักนี้ หนอนใยผักเป็นแมลงที่สร้างความเสียหายและพัฒนาความต้านทานต่อสารกำจัดแมลงได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยต่าง ๆ จึงมุ่งหาจุลินทรีย์มาใช้แทน ซึ่ง *B. thuringiensis* ซึ่งมีสารพิษ CryI มีฤทธิ์ที่จะฆ่าหนอนใยผักได้ จึงได้มีผู้ให้ความสนใจในการศึกษาการใช้ *B. thuringiensis* กับหนอนใยผักในแหล่งต่าง ๆ อย่างมากมาย

หนอนใยผัก (diamondback moth) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plutella xylostella* L. อยู่ในอันดับ Lepidoptera วงศ์ Plutellidae เป็นผีเสื้อที่มีขนาดเล็กและทำความเสียหายให้กับพืชตระกูลกะหล่ำ เช่น กะหล่ำปลี คะน้า ผักกาดขาว กวางตุ้ง ผักกาดหัว เป็นต้น สามารถพบได้แทบทุกพื้นที่ที่มีการปลูกผัก มักมีการระบาดอย่างรวดเร็ว เพราะมีวงจรชีวิตสั้น ในระยะแรกจะเข้าทำลายโดยการกัดกินผิวใบของผักให้เป็นรูหรือกัดกินใบด้านล่างจนเหลือเฉพาะผิวใบมองเห็นเป็นเยื่อบาง ๆ เรียกว่า windows การทำลายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อหนอนมีอายุมากขึ้น โดยกัดกินใบจนเป็นรูพรุน และอาจกินจนเหลือแต่ก้านใบ นอกจากนี้ยังกัดกินผลอ่อนและส่วนของดอกอีกด้วย สำหรับการศึกษาชีวประวัติของหนอนใยผักนั้นมีบันทึกไว้มากมาย ซึ่งจะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละพื้นที่ เพราะการแพร่กระจายมีขอบเขตกว้างขวางมาก (วินัย, 2535)

ระยะไข่ ผีเสื้อหนอนใยผักจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มติดกัน 2-5 ฟอง ไข่มีขนาดเล็กค่อนข้างแบนและยาวรี (oval) มีสีเหลืองอ่อนเป็นมัน ผิวขรุขระ ระยะไข่ประมาณ 2-3 วัน

ระยะหนอน หนอนมีลักษณะเป็นแบบ eruciform คล้ายหนอนผีเสื้อทั่วไป มีขาจริง 3 คู่ และขาเทียม 5 คู่ หนอนมี 4 วัย หนอนมีลักษณะหัวแหลม ท้ายแหลม ลำตัวเรียวยาว ส่วนท้ายมีปุ่มยื่นออกไปเป็น 2 แฉก มีสีเขียวย่อน หรือเทาอ่อน หรือเขียวปนเหลือง มีขนาดเล็กๆ สีดำปกคลุมกระจายอยู่ทั่วตัว หัวมีสีน้ำตาลปนเหลือง มีจุดสีดำอยู่บนหัว หนอนยาวประมาณ 8-9 มิลลิเมตร เมื่อถูกตัวจะดิ้นอย่างรุนแรง และชักโยเพื่อทิ้งตัวลงดิน หนอนวัย 4 ในช่วงท้ายสุดของการเป็นหนอน มักพบอยู่ตามซอกใบและก้นใบสีขาวเป็นรูปกระสวย หุ้มตัวเองไว้และจะอยู่นิ่งประมาณ 1-2 วัน จึงเข้าดักแด้ ระยะหนอนประมาณ 8-10 วัน

ระยะดักแด้ หนอนใยผักจะเข้าดักแด้บริเวณใบพืช ดักแด้เป็น obtect ยาวประมาณ 8-10 มิลลิเมตร เมื่อเข้าดักแด้ใหม่ๆ จะมีสีเขียวก่อนข้างใส หลังจากนั้นจะค่อยๆ งามเป็นสีเหลือง

อ่อน เมื่อด้งัดไถ่ล่ออกเป็นด้วเต็มวัย ในบริเวณที่เป็นส่วนของปีก ขา และหนวด จะมีสีน้ำตาลอ่อนสลับสีน้ำตาลเข้ม ส่วนบริเวณที่จะเป็นตารวม จะพัฒนาจากสีเขียวเป็นสีชมพูและดำในที่สุด บริเวณด้านข้างของส่วนท้องจะพบท่อหายใจ (spiracle) ยื่นออกมาเป็นปุ่ม 6 คู่ ระยะด้งัดไถ่ประมาณ 3-4 วัน

ด้วเต็มวัย เป็นผีเสื้อกลางคืนที่มีขนาดเล็ก ลำตัวยาวประมาณ 6-7 มิลลิเมตร มีเกล็ดปกคลุมโดยตลอด ปีกมีรูปร่างคล้ายใบหอก สีน้ำตาลอ่อนปนเทา บนสันหลังมีแถบสีเหลืองขาว พาดตามความยาวของลำตัว เมื่อมองจากด้านข้างจะเห็นเป็นรูปสามเหลี่ยม 3 อัน เรียงต่อกัน คล้ายรูปข้ามหลามตัด ซึ่งเป็นที่มาของชื่อ diamond-back (โสภณและวิบูลย์, 2537) ตามปกติ ด้วผู้จะมีสีเข้มและมีขนาดเล็กกว่าด้วเมีย หนวดเป็นแบบเส้นด้าย (filiform) แต่ละปล้องมีสีดำสลับขาว เมื่อเกาะนิ่งจะชี้หนวดไปทางด้านหน้า ระยะด้วเต็มวัยประมาณ 5-7 วัน การวางไข่ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นในช่วงกลางวัน โดยมีการพักรักด้วก่อนการวางไข่ 1 วัน ด้วเต็มวัยเพศเมียสามารถวางไข่ได้ประมาณ 47- 407 ฟอง รวมวงจรชีวิตประมาณ 23-33 วัน ช่วงอายุในแต่ละวัยมักไม่แน่นอน โดยจะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น ช่วงแสง เป็นต้น



ที่มา: เบรนท์ (2547)

ภาพที่ 1.4 แสดงวงจรชีวิตของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*)

หนอนใยผักสามารถพบได้ทั่วทุกภาคที่มีแหล่งปลูกผัก มักจะเริ่มระบาดมากตั้งแต่ฤดูหนาวและเพิ่มความรุนแรงเรื่อยๆ จนระบาดมากในช่วงท้ายของฤดูหนาวต่อฤดูแล้ง การระบาดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากหนอนใยผักมีวงจรชีวิตสั้น จึงมีการพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้เร็วและมากชนิด (วินัย, 2535) พบว่าเมื่อมีการใช้สารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่งติดต่อกันภายใน 3 ปี หนอนใยผักก็สามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีชนิดนั้นได้แล้ว ทำให้มีปัญหามากในการป้องกันกำจัด ปัจจุบันจึงมีการหาวิธีการป้องกันกำจัดหนอนใยผักใช้ผสมผสานกันหลายวิธี นอกจากการใช้สารเคมี เช่น การปลูกผักกางมุ้ง การใช้กับดัก การควบคุมโดยชีววิธี เป็นต้น

1.12 การพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *Bacillus thuringiensis*

Heckle (2001) ได้อธิบายถึงกลไกการสร้างความต้านทานต่อสารพิษจาก *B. thuringiensis* หลังจากที่ถูกแมลงกินผลึกโปรตีน *B. thuringiensis* เข้าไป protoxin อาจจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ protease ที่อยู่ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลง ทำให้ได้ active protease-resistant toxin ซึ่งจะไปจับกับเยื่อผนังกระเพาะอาหาร เฉพาะกับแมลงเป้าหมาย และจะสร้าง transmembrane pore เยื่อผนังเซลล์สลายตัวและแมลงตายในที่สุด และให้คำจำกัดความของความต้านทานว่า "an evolved change within a species that interferes with or blocks one or more of these processes, leading to enhance survivorship under toxin challenge" หมายถึงการเปลี่ยนแปลงที่ลดน้อยในชนิดแมลง ซึ่งจะเข้าไปกีดขวางขบวนการอย่างหนึ่งหรือมากกว่า เพื่อนำไปสู่การส่งเสริมการอยู่รอดของแมลงจากการได้รับสารพิษ โดยทั่วไปกลไกการสร้างความต้านทานที่มีคุณสมบัติ คือสารพิษประสบความล้มเหลวในการออกฤทธิ์ และการเปลี่ยนแปลงหรือสูญเสียการเข้า binding กับแมลงเป้าหมาย จากการศึกษาเบื้องต้นทำให้ทราบว่า Cadherin modification อาจเป็นกลไกการสร้างความต้านทานที่พบได้ในทั่วไปในอันดับ Lepidoptera

หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) เป็นแมลงศัตรูผักที่สำคัญชนิดหนึ่ง มีความสามารถที่จะพัฒนาความต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงได้หลายชนิด ทำให้ยากต่อการป้องกันกำจัด จึงได้มีการนำวิธีการอื่นๆมาใช้ เช่น การฉีดพ่น *B. thuringiensis* เพื่อควบคุมหนอนศัตรูผัก ซึ่งทำมากกว่า 50 ปีแล้ว แต่เกษตรกรยังไม่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เพราะราคาแพง ออกฤทธิ์เฉพาะกลุ่มแมลง ถูกทำลายโดยสภาพแวดล้อมได้ง่าย และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ไม่แน่นอน *B. thuringiensis* จะได้รับการส่งเสริมให้นำมาใช้ในการจัดการศัตรูพืชโดยมีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ใหม่และปรับปรุงรูปแบบผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้นรวมทั้งพัฒนาในด้านการตัดแต่งยีน โดยนำยีน Bt toxin เข้าไปในพืชที่สำคัญชนิดต่างๆ (Siegfried, 2006) รวมทั้งพืชตระกูลกะหล่ำด้วยแต่ก็ยังพบว่าหนอนใยผักสามารถสร้างความต้านทานได้ จากรายงาน

Shelton and Zhao (2000) พบหนอนใยผักต้านทานต่อ *B. thuringiensis* ครั้งแรกในประเทศฟิลิปปินส์ และอีกหลายๆ แห่งทั่วโลก เช่น รัฐฟลอริดาของสหรัฐอเมริกา ฮาวาย ญี่ปุ่น อเมริกากลาง และจีน เป็นต้น และมีความเป็นไปได้ที่แมลงจะมีโอกาสพัฒนาความต้านทานต่อพืชตัดแต่งพันธุกรรม เนื่องจาก toxin ที่ถูกตัดแต่งเข้าไปในพืช จะถูกสร้างอยู่ตลอดเวลาและอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีโปรตีนอยู่ในระดับสูงติดต่อกันเกือบตลอดเวลา ซึ่งอาจเป็นสาเหตุกระตุ้นให้แมลงนั้นพัฒนาความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* ได้เร็วขึ้น (โสภณและคณะ, 2546)

1.13 การถ่ายทอดยีน *Bacillus thuringiensis* ในพืช

เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมก่อให้เกิดการพัฒนาอย่างก้าวกระโดดทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ในปัจจุบันมีการโคลน (clone) ยีนจากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย พืช และสัตว์หลายชนิด สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการถ่ายฝากยีน เรียกว่า Genetically Modified Organism (GMO)

GMO หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ได้รับการถ่ายฝากยีนจากภายนอกโดยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม GMO จึงเป็นสิ่งมีชีวิตที่มียีนใหม่หรือมีลักษณะใหม่ที่ไม่สามารถเกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือวิธีผสมพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) การสร้างตัดแปลงพันธุกรรม หรือพืช GM โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมนั้น จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีกว่าเดิม เช่น ผลผลิตสูง มีขนาดใหญ่ขึ้น มีความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูพืช ตลอดจนมีลักษณะอื่นๆ ตามความต้องการของมนุษย์

ในปี พ.ศ. 2525 นักวิทยาศาสตร์ในสหรัฐอเมริกา ประสบความสำเร็จในการนำยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษจาก *B. thuringiensis* มาถ่ายฝากในต้นฝ้าย ทำให้ต้นพืชมีความต้านทานต่อแมลงศัตรูพืชเฉพาะชนิด โดยพืชตัดแปลงพันธุกรรมจะผลิตโปรตีนที่เป็นพิษต่อแมลง เมื่อแมลงมากินใบพืช หรือส่วนอื่นของพืชที่มียีนนี้เข้าไปแมลงจะตาย ทั้งนี้เชื่อกันว่าโปรตีนนั้นไม่เป็นพิษหรือเป็นอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และแมลงที่มีประโยชน์ ดังนั้นต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *B. thuringiensis* จึงถูกรับกวนจากแมลงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับต้นพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ปัจจุบันมีการถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้างสารพิษ *B. thuringiensis* ในพืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ฝ้าย และข้าวโพด เป็นต้น โดยใช้ยีน *B. thuringiensis* ที่สังเคราะห์และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ทำให้มีการแสดงออกของลักษณะความต้านทานต่อแมลงได้ดี และมีความเป็นพิษมากกว่ายีนเดิม พืชที่ได้รับการถ่ายยีน *B. thuringiensis* จึงมีความต้านทานสูงมากขึ้น (จริยาและคณะ, 2547)

การพัฒนาพืชตัดต่อพันธุกรรมเพื่อใช้ในการบริหารจัดการศัตรูพืช นับเป็นการพัฒนาที่มีนัยสำคัญมากที่สุดอย่างหนึ่ง ในการจัดการศัตรูพืชเมื่อ 40 ปีที่แล้วมีผลเกี่ยวโยงอย่างมากในเรื่องผลผลิตทางการเกษตรในเรื่องอาหารและไฟเบอร์ ผลกระทบอย่างแรกคือทำให้เกิดความมั่นใจในความสามารถด้านผลิตระยะยาว ผลผลิตมีคุณภาพสูงกว่า มีความคงที่มากกว่า และมั่นใจได้ว่าจะรอดพ้นจากการเข้าทำลายของแมลงที่ระบาดในแปลงปลูก แม้ว่าจะมีการฉีดพ่นสารเคมีแล้วก็ตาม ข้อได้เปรียบของพืชตัดแต่งพันธุกรรม คือลดค่าใช้จ่ายในการใช้สารเคมีฆ่าแมลง ลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ลดความเสี่ยงของมนุษย์จากสารฆ่าแมลงที่ทำลายระบบประสาทและยังสร้างผลกำไรและความยั่งยืนในการทำเกษตรกรรม (Siegfried, 2006)

McGauhey and Oppert (1998) รายงานว่าความต้านทานของแมลงต่อสารพิษจาก *B. thuringiensis* เป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญเพราะ toxin ที่ได้ถูกนำไปใช้ในการปลูกถ่ายยีนในพืช (plant genetic transformation) ถ้ายังมีการใช้ transgenic plant มาก โอกาสที่จะทำให้แมลงสร้างความต้านทานไม่เฉพาะสารพิษที่นำเข้าไปในพืช แต่ยังก่อให้เกิดความต้านทานในการใช้ *B. thuringiensis* ฉีดพ่นตามแปลงพืชอีกด้วย ซึ่งเป็นเรื่องที่ต้องหาทางสร้างความปลอดภัยในระยะยาวไว้ด้วย โดยใช้ยากำจัดแมลงที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม การจัดการความต้านทานอย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความเข้าใจในเรื่องการปรับตัวของแมลงต่อสารพิษ เมื่องานวิจัยยังมีมากทำให้เห็นว่ามีกลไกต้านทาน multiple resistant mechanism มีข้อมูลจำนวนมากที่เสนอแนะว่าการเปลี่ยนแปลง toxin binding อาจจะนำไปสู่การพัฒนาความต้านทานได้ทั้งการเปลี่ยนแปลงใน receptor หรือความสัมพันธ์ของ binding มีข้อมูลบ่งชี้ว่า toxin solubility และ proteinase activation ในกระเพาะอาหารส่วนกลางของแมลงอาจจะเกี่ยวกับการสร้างความต้านทานทางใดทางหนึ่งได้ หลังการจับ (post binding) อาจจะทำให้เกิด receptor aggregation, pore formation, ionic flux และ insect recovery เข้ามาเกี่ยวข้อง ยุทธศาสตร์เพื่อลดการสร้าง ความต้านทานของแมลงอาจจะเกิดจาก multiple toxin, refugia และ high toxin dose

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จรียา จันทรไพแสง, ปทุมพร ฉิมเอนก และ เลาจนา เซาวนาติชัย. 2544. ความหลากหลายของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- จรียา จันทรไพแสง, ยุพา มงคลสุข, สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ และประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์. 2547. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้แบคทีเรียบีทีจากงานวิจัยสู่เกษตรกร. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- เบรนท์ โรเวลล์. 2547. แมลงตัวเบียนของหนอนใยผัก (Diamondback Moth) ในประเทศไทย. แหล่งที่มา: http://www.ipmthailand.org/images/Natural_enemies/Cabbage/DBM_Life_cycle.JPG, 21 กุมภาพันธ์ 2549.
- วินัย รัชตปกรณชัย. 2535. แมลงศัตรูพืชผักตระกูลกะหล่ำและแนวทางการบริหาร, น. 142-152. ใน สุวัฒน์ รวยอารีย์; บรรณาธิการ. แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร, กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- โสภณ อุไรชื่น และวิบูลย์ จงรัตนเมธิกุล. 2537. แมลงศัตรูผัก, น. 135-142. ใน อินทวัฒน์ บุรีคำ, บรรณาธิการ. บทปฏิบัติการกีฏวิทยาทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- โสภณ อุไรชื่น, J.M. Vassal และ M. Vaissayre. 2546. ความต้านทานของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่มีต่อ δ -endotoxin ของ *Bacillus thuringiensis* Berliner, น.90-100. ใน รายงานการประชุมการอารักขาพืช ครั้งที่ 6 แห่งศตวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

- IPM DANIDA. 2549. ความรู้พื้นฐาน เกี่ยวกับเชื้อบีที (Bt) ในการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน. แหล่งที่มา: http://www.ipmthailand.org/th/Bt/Bt_Basics.htm, 21 กุมภาพันธ์ 2549.
- Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Baker and D.V. Thomson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. **Gene** 36: 289-300.
- Aronson, A.T., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogen. **Microbiol. Rev.** 50: 124.
- Battisti L, B. Green and C. Thorne. 1985. Mating system for transfer of plasmids among *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **J. Bacteriol** 162: 543 - 550.
- Beebee, T.J.C. and R.P.M. Bond. 1973. Effect of the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* on normal and ecdysone- stimulated ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei from the fat-body of *Sarcophaga bullata* larvae. **Biochem. J.** 136: 1-7.
- Benoit, T.G., K.A. Newman and G.R. Wilson. 1995. Correlation between alkaline activation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* spores and crystal production. **Curr. Microbiol.** 31: 301-303.
- Benson, T. and B. Smith. 1992. Hightech Bts, pp. 103-128. In ***Bacillus thuringiensis* Manual**. Abbott Lab., North Chicago.
- Birnboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.** 7: 1513-1523
- Bonnefoi, A. and H. de Barjac. 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la détermination de l'antigène flagellaire. **Entomophaga** 8: 223-229.

- Boucias, D.G., W.G. Farmerie and J.C. Pendland. 1998. Cloning and sequencing the cDNA of the insecticidal toxin hirsutellin A. **J. Invertebr. Pathol.** 72: 258-261.
- Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. **Principles of Insect Pathology**. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Bourque, S. N., J. Valero, M. Mercier, 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
- Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever and L.S. Bayer. 1995. The insecticidal CryIB crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and dipteran larvae. **J. Invertebr. Pathol.** 65: 162-173.
- Buchanan, R.E. and N.E. Bibbon. 1974. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 8th ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Burges, H.D. and N.W. Hussey. 1971. **Microbial Control of Insects and Mites**. Academic Press, New York.
- Burges, H.D. 1981. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-80**. Academic Press, New York.
- Calabrese, D.M., K.W. Nickerson and L.C. Lane. 1980. A comparison of protein crystal subunit sizes in *Bacillus thuringiensis*. **Can. J. Microbiol.** 26: 1006-1010.
- Carlson, C.R. and A.B. Kolsto. 1993. A complete physical map of a *Bacillus thuringiensis* chromosome. **Bacteriol.** 175: 1053-1060.
- Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola and M. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3057-3061.

- Chambers, J.A., A. Jelen, M.P. Gilbert, C.S. Jany, T.B. Johnson and C. Gawron-Burke. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. **J. Bacteriol.** 173: 3966-3976.
- Chang, C., S.M. Dai, R. Frutos, B.A. Federici and S.S. Gill. 1994. Properties of a 72 kilodalton mosquitocidal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT 3101. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 507-512.
- Chanpaisaeng, J., A. Tipvadee, N. Thaveechai and G. Theeragool. 1993. *Bacillus thuringiensis* found in natural habitat around Thailand, pp.664-670. In **Proceedings of the 31st Annual Conference in Plant Science**. Kasetsart University, Bangkok.
- Chilcott, C.N. and P.J. Wigley. 1994. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strain. **Agric. Ecosystem Environ.** 49: 51-57.
- Crickmore, N. and D.J. Ellar. 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned *cryIIA* delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. **Mol. Microbiol.** 6: 1533-1537.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62: 807-813.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D.H. Dean. 2006. *Bacillus thuringiensis* nomenclature. Available Source: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ , February 21, 2006.
- Dankocsik, C., W.P. Donovan and C.H. Gary. 1990. Activation of cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal. **Mol. Microbiol.** 4: 2017-2094.

- de Barjac, H. and A. Bonnefoi. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* Berliner with a key to their differentiation. **J. Invertebr. Pathol.** 11: 335-347.
- Dulmage, H.T. 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* var. *alesti*. **J. Invertebr. Pathol.** 15: 232-239.
- Dulmage, H.T. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control, pp. 193-222. In H.D. Burges, eds. **Microbial Control of Pests and Plant Diseases**. Academic Press, London.
- Dulmage, H.T. and K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. In: Kurstak, E., ed. **Microbial and Viral Pesticides**. Marcel Dekker, New York.
- Estruch, J.J., G.W. Warren, M.A. Mullins, G.J. Nye, J.A. Craig and M.G. Koziel. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insect. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 5389.
- Faust, R.M. 1974. Bacterial disease, pp. 87-183. In G.E. Cantwell, ed. **Insect Disease**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Glare, T.R. and M. O'Callaghan. 2002. ***Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety**. John Wiley and Sons, Ltd., New Zealand.
- Gleave, A.P., R. Williams and R.J. Hedges. 1993. Screening by polymerase chain reaction of *Bacillus thuringiensis* serotypes for the presence of *cryV*-like insecticidal protein genes and characterization of a *cryV* gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1683-1687.
- Gonzalez, J.M. and B.C. Carlton. 1980. Patterns of plasmid DNA in crystalliferous and acrySTALLIFEROUS strains of *Bacillus thuringiensis*. **Plasmid** 3: 92-98.

- Gonzalez, J.M., Jr., B. J. Brown and B.C. Carlton. 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for δ -endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. **PNAS**. 79: 6951-6955.
- Hannay, C.L. 1957. The parasporal body of *Bacillus laterosporus* var. *laubach*. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** 3: 1001-1010.
- Hansen, B.M., P.H Damgaard, J. Eilenberg and J.C. Pedersen. 1998. Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. **J. Invertebr. Pathol.** 71: 106-114.
- Heckel, D.G. 2001. Mechanisms of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. pp. 22. In D.H. Dean, 4th ed. **Pacific Rim Conference on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and Its Environmental Impact**. Australian National University, Canberra, Australia.
- Heimpel, A.M. 1963. Disease cause by certain spore forming bacteria, pp.21-73. In E.A. Steinhaus. ed. **Insect Pathology**; An Advance Treatise. Vol. 2. Academic Press, New York.
- Heimpel, A.M. and T.A. Angus 1958. The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Frankland and Frankland. **Can. J. Microbiol.** 4: 531-541.
- Hofte, H., H. de Greve, J. Seurick, S. Jansens, J. Mahillon, C. Ampe, J. Van dekerckhove, H. Van derbruggen, M. Van Montagu, M. Zabeau and M. Vaeck. 1986. Structure and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. **Eur. J. Biochem.** 161: 273-280.
- Hofte, H. and H.R. Whiteley 1989. Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiol. Rev.** 53: 242-255.
- Hofte, H., P. Soetaert, S. Jansen and M. Peferoen. 1990. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new Lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. **Nucleic Acids Res.** 18: 5545.

- Içgen, Y., B. İçgen and G. Özcengiz. 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : II effect of carbon and nitrogens sources. Research in **Microbiology**. 153: 605-609.
- Janes, A.B., D.M. Coyle, M.P. Gilbert, C.S. Jany and C. Cawron-Burke. 1990. Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 3420-3425.
- Jarret, P. 1985. Potency factors in the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*, and the significance of plasmids in their control. **J. Appl. Bacteriol.** 58: 437-448.
- Juarez-Perez, V.M., M.D. Ferrandis and R. Frutose. 1997. PCR-Base approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 2997-3002.
- Knowles, B.H. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, **Programme and Abstracts, Second Canberra Bacillus thuringiensis Meeting**, 21-23 September 1993, CSIRO Division of Entomology, Australia.
- Koni, P. A. and D. J. Ellar. 1993. Cloning and characterization of novel of *Bacillus thuringiensis* cytolytic toxin delta-endotoxin. **J. Mol. Biol.** 229: 319-327.
- Krieg, A. 1968. A taxonomy study of *Bacillus thuringiensis* Berliner . **J. Invertebr. Pathol.** 12: 366-378.
- Kronstad, J.W., H.E. Schnepf and H.R. Whiteley. 1983. Diversity of locations for the *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **J. Bacteriol.** 154: 419-428.
- Kronstad, J.W. and H.R. Whiteley. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. **Gene** 43: 29-40.
- Kuo, W.S. and K.F. Chak. Identification of Novel cry Type Genes from *Bacillus thuringiensis* Strains on the Basis of Restriction Fragment Length Polymorphism of the PCR-Amplified DNA. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1369-1377.

- Lambert, B. and M. Peferone. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. **Bio. Sci.** 42: 112-122.
- Lecadet, M.M., J. Chaufaux, J. Ribier and D. Lereclus. 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 840-849.
- Lecadet, M.M., E. Frachon, V.C Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. **J. Appl. Microbiol.** 86: 660-672.
- Lee, C.S. and A.I. Aronson. 1991. Cloning and analysis of delta-endotoxin genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *alesti*. **J. Bacteriol.** 173: 6635-6638.
- Lövgren, A., C.R. Carlson, K. Eskils and A.B. Kolsto. 1998. Localization of putative virulence genes on a physical map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gelechiæ* chromosome. **Curr. Microbiol.** 37: 245-250.
- Mac Connell, E. and A.G. Richards. 1959. The production by *Bacillus thuringiensis* (Berliner) a heat-stable substance toxic for insect. **Can. J. Microbiol.** 1: 161-168.
- Masson, L., W.J. Moar, K. Van Frandenhuyzen, M. Bosse and R. Brousseau. 1992. Insecticidal properties of a crystal protein gene product isolated from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 642-646.
- McGauhey, W. H. and B. Oppert. 1998. Mechanisms of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Israel Journal of Entomology.** 32: 1-14.
- McLinden, J. H., J. R. Sabourin, B. D. Clark, D. R. Gensler, W. E. Workman and D. H. Dean. 1985. Cloning and expression of an Insecticidal K-73 type crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* into *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** 50: 623-628.

- Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Taylor, R., J. Tippet, G. Gibb, S. Pell, D. Pike, L. Jordan and S. Ely. 1992. Identification and characterization of a novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to Coleoptera and Lepidoptera larvae. **Mol. Microbiol.** 6: 1211-1217.
- Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. **Insect Pathology**. Academic Press Inc., London.
- Tounsi, S., A. J'Mal, N. Zouari and S. Jaoua. 1999. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry1Aa*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Biotechnol. Lett.** 21: 771-775
- Wabiko, H., K.C. Raymond and L.A. Bulla, Jr. 1986. *Bacillus thuringiensis* entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis. **DNA** 5: 305-314.
- West, A.W., H.D. Burges, T.J. Dixon and C.H. Wyborn. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* spore inocula in soil: effect of pH, moisture, nutrient availability and in digenous microorganism. **Soil Biol. Biochem.** 17: 657-665.
- Widner, W.R. and H.R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* posses different host range specificities. **J. Bacteriol.** 171: 965-974.
- Yamamoto, T. 1983. Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. **J. Gen. Microbiol.** 129: 2595-2603.
- Yamamoto, T. and G.K. Powell. 1993. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins : Recent advances in understanding its insecticidal activity, pp. 3-41. In L. Kim, ed. **Advanced Engineered Pesticides**. Marcel Dekker, Inc., New York.

บทที่ 2 การพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ต่อ *Bacillus thuringiensis*

การตรวจเอกสาร

Bacillus thuringiensis Berliner (Bt) เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารมีพิษต่อแมลงในรูปแบบของผลึกโปรตีน (Crystal proteins หรือ Cry proteins) สารพิษที่สามารถทำลายแมลงกลุ่มสำคัญๆ ส่วนใหญ่จะจัดอยู่ในกลุ่ม Delta-endotoxin (δ - endotoxin) *B. thuringiensis* ได้ถูกนำมาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูทางการเกษตร ทางการแพทย์ และสัตวแพทย์เป็นเวลามากกว่า 30 ปีแล้ว (Feitelson et al., 1992; McGarr et al., 1972) อย่างไรก็ตาม มีแมลงศัตรูพืชบางชนิดที่สามารถสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* โดยมีรายงานว่าพบครั้งแรกในหนอนผีเสื้อ Indian meal moth (*Plodia interpunctella*) (Kinsinger and McGaughey, 1979) ขณะที่หนอนใยผัก ซึ่งเป็นแมลงศัตรูสำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำ พบการสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* ในหลายแหล่งทั่วโลก เช่น ฟลอริดา นิวยอร์ก ฟิลิปินส์ ญี่ปุ่น มาเลเซียและประเทศไทย ซึ่งการศึกษากลไกการสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* พบว่า เกิดจากการที่ toxin ไม่สามารถจับกับ receptor ได้อย่างสมบูรณ์ (Tabashnik et al., 1994) เช่น การศึกษาของ Van Rie et al. (1992) รายงานว่าหนอนใยผักและหนอนผีเสื้อ *P. interpunctella* กลุ่มที่สร้างความต้านทานจะมีการจับกันระหว่างโปรตีน CryIAb กับ receptor ลดลง เมื่อเทียบกับหนอนผีเสื้อที่ไม่สร้างความต้านทาน และขบวนการสร้างความต้านทานจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ proteinase ซึ่งเอนไซม์นี้มีความสำคัญในการย่อย protoxin ของ *B. thuringiensis* (Oppert et al., 1997) นอกจากนี้หนอนใยผักที่มีความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* ระดับปานกลาง (moderate resistance) จะแสดงความต้านทานอยู่ในระหว่างรุ่นที่ 21-40 (Tabashnik et al., 1995) จากการทดสอบความต้านทานในสภาพแปลงปลูกพบความต้านทานเกิดขึ้นในระดับต่ำ เช่น โปรตีน CryIC มีการพัฒนาความต้านทานเพิ่มขึ้น 23 เท่าในสภาพแปลงปลูก และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 62 เท่าในสภาพห้องปฏิบัติการ

Siegfried (2006) รายงานว่า กลไกการสร้างความต้านทานของแมลงในหลายกรณีได้มีการเปลี่ยนแปลงของ binding site ชนิดของแมลงที่ปรับตัวจากการเปลี่ยน toxin binding มีการลดความสัมพันธ์ของ Bt toxin ที่ brush border membrane ของเยื่อบุกระเพาะอาหารส่วนกลาง โดยได้ถูกจำแนกให้เป็นกลไกแรกของการสร้างความต้านทาน การศึกษาโดยใช้ Radioactive label Cry1Ab แสดงให้เห็นว่าใน Indian meal moth (*Plodia interpunctella*) ที่มีความต้านทานจะมีการลดลงของ binding 50 เท่า ในขณะที่พวกที่อ่อนแอจะมีความต้านทานลดลง 100 เท่า

ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์จากประเทศฟิลิปปินส์มีความต้านทานต่อ Cry1Ab ร่วมกับการจับตัวของ Cry1Ab toxin ที่เยื่อกระเพาะอาหารส่วนกลาง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น

ปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการตัดแต่งยีน Bt toxin เข้าไปในพืช เพื่อให้พืชผลิตสารพิษสำหรับป้องกันตัวเองจากแมลงศัตรู ซึ่งเป็นทางเลือกใหม่ที่สำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เป็นที่น่าสังเกตว่าการนำเทคโนโลยีนี้มาใช้อย่างกว้างขวางจะก่อให้เกิด selection pressure ซึ่งจะนำไปสู่การสร้าง ความต้านทานอย่างรวดเร็วในประชากรของศัตรูพืช แมลงมีคุณสมบัติที่เด่นชัดคือ สามารถปรับตัวต่อ selection pressure ได้ โดยการปรับตัวของแมลงมักจะไม่ค่อยเป็นที่สังเกตเห็นเพราะไม่มีผลต่อผลผลิตอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการปรับตัวของศัตรูพืชบางชนิดจะทำให้ลดประสิทธิภาพของระบบการจัดการศัตรูพืช ผลลัพธ์คือ การสูญเสียผลผลิต เสียค่าใช้จ่ายในการบริหารจัดการเพิ่มขึ้น รวมทั้งมีผลเสียต่อสภาพแวดล้อม มีหลักฐานว่ามีแมลงศัตรูพืชหลายชนิดสามารถสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* โดยการทำซ้ำหลายครั้งในห้องปฏิบัติการ โดยเฉพาะในกรณีของหนอนผีเสื้อ ได้มีการคัดเลือกในห้องปฏิบัติการ พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ LC_{50} อย่างมีนัยสำคัญ (มากกว่า 1,000 เท่า) ที่พบในหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni*) (Estada and Ferre, 1992) หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Tabashnik et al., 1991) Indian meal moth (*Plodia interpunctella*) (McGaughey and Whalon, 1992) หนอนกระทุ้งหอม (*Spodoptera exigua*) (Moar et al., 1995) *Heliothis virescens* (Gould et al., 1992) *Spodoptera littoralis* (Muller-Cohn et al., 1996) และหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด *Ostrinia nubilalis* (Huang et al., 1997) โดยหนอนใยผักเป็นแมลงที่สามารถพัฒนาระดับความต้านทานสูงขึ้นในแปลงปลูกพืช เมื่อมีการใช้ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ซ้ำๆ กันบ่อยๆ (Tabashnik et al., 1994) อย่างไรก็ตาม Indian meal moth อาจจะค่อยๆ เพิ่มอัตราความต้านทานในระดับต่ำในผลผลิตโรงเก็บที่ใช้ *B. thuringiensis* (McGaughey and Whalon, 1992)

จากการศึกษาและเก็บรวบรวมเชื้อ *B. thuringiensis* ในประเทศไทยตั้งแต่ปีพ.ศ. 2532 จนถึงปัจจุบัน ได้เชื้อ *B. thuringiensis* ที่เป็นสายพันธุ์ใหม่ 2 สายพันธุ์ คือ *thailandensis* และ *chanpaisis* และได้เชื้อ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพดีในการกำจัดแมลงศัตรูพืชหลายสายพันธุ์ (จริยา และคณะ, 2544 ข) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักที่พบในแปลงเกษตรกรต่อเชื้อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจในการพัฒนาความต้านทานของแมลงต่อ *B. thuringiensis* จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานทางชีวภาพของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งจะเป็นสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งในการใช้เป็นแนวทางเพื่อตัดสินใจใช้ *B. thuringiensis* ในการจัดการแมลงศัตรูพืชแบบบูรณาการต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

2.1.1 การเตรียม พืชอาหารสำหรับใช้เลี้ยงหนอนใยผัก

พืชที่ใช้สำหรับเลี้ยงหนอนใยผัก คือ กระบองเพชร ผักกวางตุ้งและปูเล่ ระยะเริ่มงานวิจัยได้รับความอนุเคราะห์ต้นพันธุ์ปูเล่จากกลุ่มงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและจัดการพันธุ์ กองส่งเสริมพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ซึ่งปลูกขยายในกระถางดินตามภาพที่ 2.1ก. ต่อมาใช้ระบบการปลูกผักแบบไม่ใช้ดิน (Hydroponic) ในการปลูกผักเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงหนอน โดยจะเพาะกล้ากระบองเพชรและกวางตุ้งในถาดพลาสติก ใช้วัสดุปลูก (Perlite + Vermiculite ในอัตราส่วน 2:1) ประมาณ 4-5 วัน แล้วจึงย้ายกล้าพืชลงปลูกในระบบ Hydroponic ตามภาพที่ 2.1ข. ซึ่งจะปลูกพืชทั้ง 2 วิธีนี้ไปพร้อมกันเพื่อให้มีพืชอาหารพร้อมที่จะใช้เลี้ยงหนอนใยผักได้พอเพียงตลอดเวลา

2.1.2 การรวบรวมหนอนใยผักจากแปลงปลูกผักของเกษตรกร

ทำการรวบรวมหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) เป็นตัวแทนของหนอนใยผักจากบริเวณที่มีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงในระดับสูง จากแปลงปลูกผักของเกษตรกรในอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี (ภาพที่ 2.2ก. และ 2.2ข.) และสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) เป็นตัวแทนของหนอนใยผักจากบริเวณที่มีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงในระดับปานกลางจากแปลงปลูกผักในอำเภوتاม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเริ่มต้นโครงการวิจัย ความถี่ในการเก็บ คือ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ช่วงที่ไม่มีการระบาดจะขยายเวลาเป็นเดือนละ 1 ครั้ง และช่วงที่มีการระบาดจะออกเก็บสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จนกระทั่งปริมาณหนอนใยผักในห้องเลี้ยงแมลงมีเพียงพอสำหรับการทดลองและสายพันธุ์อ่อนแอ (susceptible strain, OSS) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่เคยได้รับสารเคมีกำจัดแมลงเลย ได้รับความอนุเคราะห์จาก Nagoya University ประเทศญี่ปุ่น โดยได้รับอนุญาตจากกรมวิชาการเกษตรเพื่อนำผักหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS เข้ามาใช้ทดลองในโครงการวิจัยนี้ได้

2.1.3 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

หนอนใยผักที่เก็บรวบรวมมาได้จากแปลงเกษตรกรจะไม่นำมาใช้ทดลองในทันที เพราะหนอนอาจถูกสารเคมีหรืออาจถูกแมลงแตนเบียนวางไข่ไว้แล้ว (ภาพที่ 2.2ค.) ซึ่งจะทำให้ข้อมูลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ แต่จะนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องเลี้ยงแมลง ภายใต้อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ช่วงแสงที่เหมาะสมคือได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมง และช่วงมืด 8 ชั่วโมง คิด

เป็นอัตราส่วน 2:1 มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงด้วยใบผักที่ปลูกในสภาพปลอดสารเคมี โดยทางปฏิบัติจะเลี้ยงหนอนใยผักรุ่น F₁ ให้ปรับตัวในสภาพห้องเลี้ยงแมลงและมีปริมาณมากพอจึงเริ่มจัดชุดทดลอง ซึ่งเริ่มจากดักแด้ของรุ่น F₁ นำดักแด้ที่เก็บรวบรวมได้ประมาณ 30-50 ตัว มาใส่ในกรงเลี้ยงแมลง ซึ่งทำด้วย acrylic ใช้ถุงกรองซึ่งไว้ตรงทางเปิดเข้าออกเพื่อกันไม่ให้ผีเสื้อบินออกกระหว่างเปลี่ยนกล้าพืชอาหาร และใส่กล้าผักคะน้าอายุ 4-5 วัน จำนวน 3-4 ถ้วย เพื่อให้เป็นพืชอาหารที่ผีเสื้อหนอนใยผักใช้วางไข่ ดักแด้ใช้เวลา 1-2 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 2.1ค. และ 2.1ง.)

เมื่อออกเป็นตัวเต็มวัยให้น้ำหวาน (น้ำผึ้งหรือน้ำหวานความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์) เป็นอาหาร ซึ่งตัวเต็มวัยใช้เวลาวางไข่ 3-5 วัน ช่วงเวลาที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่จะเปลี่ยนต้นกล้าทุกๆ 2 วัน โดยนำต้นกล้าที่วางไข่แล้วออก และใส่ต้นกล้าใหม่ให้จนกว่าตัวเต็มวัยทั้งหมดตาย ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่จะใช้ต้นกล้าคะน้าเป็นอาหาร จนเจริญเข้าสู่ระยะหนอนวัย 2 ย้ายหนอนใยผักไปเลี้ยงบนใบผักกวางตุ้ง (ซึ่งสามารถปลูกเพิ่มปริมาณได้ง่าย ให้ใบจำนวนมาก และใช้เวลาไม่นาน) ในกล่องพลาสติกที่รองกันกล่องด้วยกระดาษ เปลี่ยนใบพืชและกระดาษรองทุกวัน หนอนวัยสุดท้ายส่วนใหญ่จะเข้าดักแด้ที่บริเวณผ่ากล่องและที่กระดาษรอง เก็บรวบรวมดักแด้และปล่อยให้ออกเป็นตัวเต็มวัยเพื่อขยายพันธุ์รุ่นต่อไป



ภาพที่ 2.1 พืชอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนใยผักและกล้าพืชสำหรับให้ผีเสื้อวางไข่

ก. เพิ่มขยายปริมาณพืชอาหารที่ปลูกในกระถางดิน

ข. ปลูกพืชอาหารโดยระบบไม่ใช้ดิน (Hydroponic system)

ค. เพาะกล้าผักคะน้าอายุ 4-6 วัน

ง. เตรียมย้ายกล้าผักคะน้าใส่ในกรงเลี้ยงแมลง เพื่อให้ผีเสื้อหนอนใยผักวางไข่



ภาพที่ 2.2 การเตรียมหน่อไม้ฝรั่งเพื่อเพิ่มจำนวนให้เพียงพอสำหรับการทดลอง

- ก. สภาพแปลงปลูกผักของเกษตรกรที่มีการระบาดของหน่อไม้ฝรั่ง
- ข. ออกเก็บรวบรวมหน่อไม้ฝรั่งจากแปลงปลูกของเกษตรกร
- ค. พบด้งด้แมลงเบียน (วงกลม) จำนวนมากติดมากับผักที่ถูกหน่อไม้ฝรั่งทำลาย
- ง. ใบผักที่ใช้เลี้ยงหน่อไม้ฝรั่งในห้องเลี้ยงแมลง คงเหลือแต่เส้นใบเพราะเนื้อใบถูกหน่อไม้ฝรั่งกัดกินจนหมด

2.2 ทดสอบการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590

การเลือกใช้ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ในโครงการวิจัยนี้ เพราะเป็นสายพันธุ์ที่คณะผู้วิจัยได้แยกจากตัวอย่างรำข้าวและตัวอย่างดินที่เก็บจากพื้นที่ในประเทศไทยที่ไม่มีการใช้ *B. thuringiensis* ที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า โดย *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 แยกได้จากตัวอย่างรำข้าวที่เก็บจากโรงสีชุมชนสหกรณ์การเกษตรอุทัยธานี บ้านดอนตูม ต.สะแกกรัง อ.เมือง จ.อุทัยธานี และ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 แยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากน้ำตกวังเหว อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ อ.นาดี จ.ปราจีนบุรี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533 เมื่อนำมาจำแนกโดยเทคนิค H-serotype ซึ่งดูจากการตกตะกอนของปฏิกิริยา antibody ที่มีต่อ flagellin เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่า *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ JC590 คือสายพันธุ์ *galleriae* และ *kurstaki* ตามลำดับ (จิริยาและคณะ, 2544 ก) ใน H-serotype เดียวกันยังมีความแตกต่างในด้านประสิทธิภาพการทำลายแมลงซึ่งเกิดจากสารพิษจากผลึกโปรตีนที่ควบคุมโดยยีน *cry* ไม่เกี่ยวกับปฏิกิริยาที่ได้มาจากเทคนิค H-serotype รวมทั้งได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 กับหนอนหนอนใยผัก หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอมทั้งในห้องปฏิบัติการ เรือนปลูกทดลองและในแปลงปลูกเกษตรกรแล้ว พบว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงและเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยตลอดมา จึงสามารถยืนยันได้ว่า *B. thuringiensis* ทั้งสองสายพันธุ์นี้เป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย

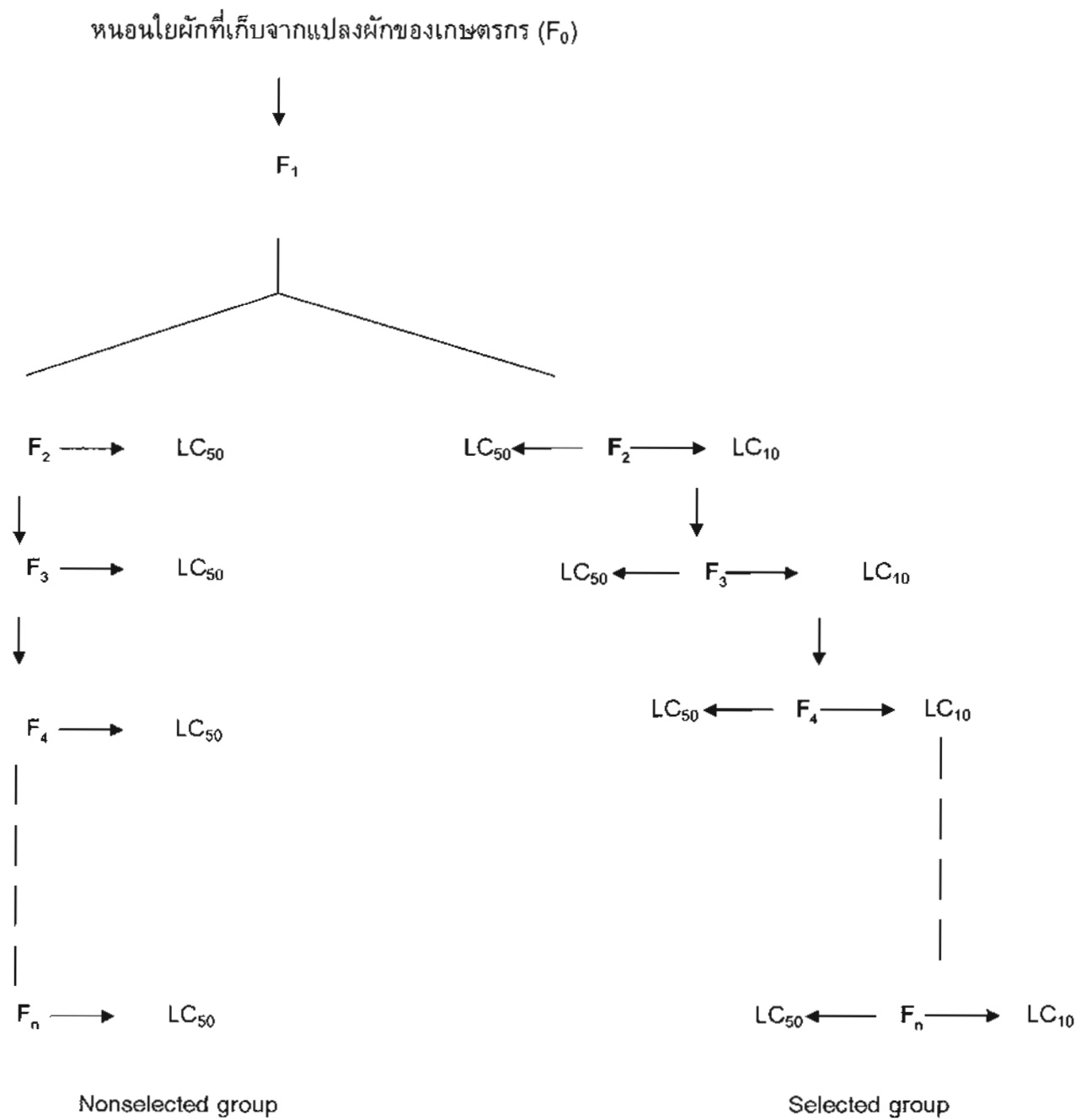
2.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ต่อหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS)

ทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 กับหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ด้วยวิธีการจุ่มใบ โดยเตรียมเพาะกล้าเชื้อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ได้ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 ที่ 1.37×10^8 cfu/ml และสายพันธุ์ JC590 ที่ 3.60×10^7 cfu/ml นำ *B. thuringiensis* มาทำ serial dilution ให้ได้ความเข้มข้น 5 ระดับคือ ที่ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 cfu/ml นำมาทดสอบกับหนอนใยผัก โดยใช้ puncher เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 นิ้ว ตัดใบผักวางดั่ง จุ่มลงในสารละลาย *B. thuringiensis* เป็นเวลา 5 นาที นำขึ้นมาผึ่งให้หมาดๆ ใส่ในถ้วยพลาสติกถ้วยละ 1 ชิ้น ใส่หนอนใยผักวัยที่ 2 ลงไปในถ้วย ความเข้มข้นละ 10 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ (ภาพที่ 2.4ก.) ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายหลังจากให้กินใบผักที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาค่า LC₅₀

โดยโปรแกรม Probit analysis (Finney, 1971) หนอนที่ไม่ได้ทดสอบนำไปเลี้ยงตามปกติจนเข้าดักแด้ ปลอยดักแด้ให้ออกเป็นตัวเต็มวัยและวางไข่บนกล้าผักคะน้าเป็นหนอนใยผักรุ่นถัดไป เมื่อหนอนใยผักในรุ่นถัดมาเจริญจนกระทั่งเป็นวัยที่ 2 จึงดำเนินการทดสอบเหมือนรุ่นแรกต่อเนื่องไปเรื่อยๆ หนอนใยผักในส่วนนี้เป็นประชากรที่ไม่ได้รับคัดเลือก (nonselected population)

2.2.2 การทดสอบการพัฒนาคความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *Bacillus thuringiensis*

ทดสอบการพัฒนาคความต้านทานของหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ต่อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 โดยเตรียมสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้นระดับ LC₁₀ ใช้ puncher เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 1 นิ้ว ตัดผักวางตั้ง จุ่มลงในสารละลาย *B. thuringiensis* เป็นเวลา 5 นาที นำขึ้นมาผึ่งให้หมาดๆ วางในกล่องพลาสติก จำนวน 10 ชิ้น นำหนอนใยผักวัย 2 (F₂) ประมาณ 100-200 ตัว มาให้กินใบผักที่จุ่มละลาย *B. thuringiensis* เพียง 1 ครั้งต่อ 1 รุ่นจนหมด ต่อจากนั้นให้ใบผักที่ไม่ได้ชุบ *B. thuringiensis* เลี้ยงหนอนใยผักที่รอดชีวิตตามปกติจนเข้าดักแด้ ปลอยดักแด้ให้ออกเป็นตัวเต็มวัยและวางไข่บนกล้าผักคะน้าเพื่อเจริญเป็นหนอนใยผักรุ่นถัดไป ซึ่งเป็นหนอนที่รุ่นพ่อ-แม่เคยได้รับ *B. thuringiensis* มาแล้ว (selection pressure) เมื่อหนอนใยผักเจริญเป็นหนอนวัย 2 แบ่งหนอนออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปทดสอบความเป็นพิษของ *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์เพื่อหาค่า LC₅₀ เช่นเดียวกับประชากรที่ไม่ได้รับคัดเลือก (nonselected population) ส่วนที่ 2 นำหนอนประมาณ 200-300 ตัว มาให้กินใบผักที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้นระดับ LC₁₀ ของหนอนที่ได้ทดสอบในรุ่นก่อนหน้า เพื่อใช้เป็น selection pressure ในรุ่นถัดไป ดำเนินการทดสอบเหมือนรุ่นแรกต่อเนื่องไปเรื่อยๆ หนอนใยผักในส่วนนี้เป็นประชากรที่ได้รับคัดเลือก (selected population) ดังภาพที่ 2.3 วิธีการนี้ได้ดัดแปลงมาจากรายงานของ Noppun *et al.* (1986)



ภาพที่ 2.3 ผังการทดสอบหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) เพื่อหาอัตราความต้านทานต่อ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590



ภาพที่ 2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ สายพันธุ์ JC590

- ก. เตรียมใบผักและเชื้อ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 มีความเข้มข้นที่ระดับ LC_{10} ในสภาพปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ
- ข. จุ่มใบผักลงในเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ทั้งไว้นาน 5 นาทีเพื่อให้ใบผักดูดซับเชื้อ
- ค. เชียหนอนใบผักลงบนใบพืชที่จุ่มเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากภาพที่ 2.4 ข.
- ง. ให้หนอนใบผักกินใบพืชที่จุ่มเชื้อ *B. thuringiensis* จนหมด แล้วจึงให้ใบผักตามปกติ โดยย้ายชุดทดลองไปเลี้ยงต่อในห้องเลี้ยงแมลง

2.2.3 การคำนวณหาอัตราความต้านทาน (Resistance Ratio) และ ค่า Heritability

นำข้อมูลที่ได้จากการหาค่า LC_{50} มาคำนวณเพื่อหาอัตราความต้านทาน (Resistance ratio; RR) และประมาณค่า Heritability (h^2) ของหนอนใยผัก

$$RR = \frac{LC_{50} \text{ of Selected population}}{LC_{50} \text{ of Nonselected population}}$$

การประมาณค่า Heritability (h^2) คือ ค่าความชัน (slope) ของเส้นแนวโน้ม (regression line : $Y=A+slope*(X)$) ระหว่าง cumulative selection differential ($\sum S$) และ cumulative response to selection ($\sum R$) ซึ่งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\overline{\text{Log } X} = \text{Log } LC_{50} \text{ of selected population} - \text{Log } LC_{50} \text{ of nonselected population}$$

$$\sigma = \text{Standard deviation of the regression line}$$

$$\sigma = 1 / \text{slope of probit regression line of selected population}$$

$$i = \text{Selection intensity from the Falconer's (1989) Appendix A}$$

$$S = \text{Selection differential } (S = \sigma i)$$

$$\sum S = \text{Cumulative selection differential}$$

$$R = \text{Response to selection}$$

$$R_t = \text{Log } \overline{X}_{t+1} - \text{Log } \overline{X}_t$$

where R_t is the response of the t^{th} generation, and $\text{Log } \overline{X}_t$ is the $\text{Log } \overline{X}$ of the t^{th} generation

$$\sum R = \text{Cumulative response to selection}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

2.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและวงจรชีวิตของหนอนใยผัก เพื่อหาแนวทางในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมาก พบว่า ตัวเต็มวัยที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว จะผสมพันธุ์และส่วนใหญ่จะวางไข่บนใบพืชด้านบนและด้านล่างในอัตราส่วน 3:2 พบเพียงเล็กน้อยที่วางไข่บนลำต้นและก้านใบ ไข่มีรูปร่างกลมรี ขนาดเล็ก สีเหลืองนวล ผิวขรุขระ ใช้เวลาประมาณ 1-3 วัน จึงจะฟักเป็นตัวหนอนมีรูปร่างหัวแหลม ท้ายแหลม สีเขียว หนอนที่เพิ่งฟักออกจากไข่ (neonate larvae) จะอาศัยกินอาหารบนใบพืชที่ใช้สำหรับวางไข่ หนอนจะเจริญเติบโตเข้าสู่วัย 2, 3 และ 4 ใช้เวลาประมาณ 5-12 วัน หนอนในวัย 4 จะถักใยสีขาวหุ้มตัวอยู่หนึ่ง ๆ ประมาณ 1-2 วัน หลังจากนั้นจะเข้าดักแด้ประมาณ 2-5 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย มีสีน้ำตาลอ่อนปนเทา บนสันหลังจะมีแถบสีเหลืองขาวพาดตามความยาวของลำตัวเมื่อมองทางด้านข้างจะเห็นเป็นรูปสามเหลี่ยมเรียงต่อกัน 3 อัน ตัวเต็มวัยเพศผู้จะมีสีเข้มและมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย ตัวเต็มวัยกินน้ำหวานเป็นอาหาร ระยะตัวเต็มวัยประมาณ 10-16 วัน หนอนใยผักที่เลี้ยงจะมีวงจรชีวิตแตกต่างกันออกไปตามแต่ละพื้นที่ (ตารางที่ 2.1) และช่วงอายุในแต่ละวัยมักไม่แน่นอน โดยจะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น ช่วงแสง เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 แสดงวงจรชีวิตของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) และช่วงเวลาของระยะไข่ ระยะหนอน ระยะดักแด้ และตัวเต็มวัย เปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS)

สายพันธุ์	ระยะไข่ (วัน)	ระยะหนอน (วัน)				ระยะดักแด้ (วัน)	ตัวเต็มวัย (วัน)	วงจรชีวิต (วัน)
		วัย1	วัย2	วัย3	วัย4			
BBS	2-3	2-3	1-2	1-2	2-3	3-4	10-16	21-33
TMS	2-3	2-4	1-3	1-2	1-3	2-5	11-16	20-36
OSS	1-3	2-4	1-2	2-3	1-2	3-4	10-15	20-33

หมายเหตุ ช่วงเวลาจากการเลี้ยงหนอนใยผัก 5 รุ่น

ผลการดำเนินการเพาะเลี้ยงหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) พบว่า หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ที่เก็บมารุ่นแรก (BBS-1) มีอัตราการรอดชีวิตของ F_4 , F_5 และ F_6 ในระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 24.22, 15.43 และ 9.5 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงจนเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 17.63, 100 และ 33.33 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.1) จะเห็นว่าอัตราการการเพิ่มปริมาณของแมลงมีอัตราลดลง เนื่องจากมีปัจจัยที่ยังไม่สามารถควบคุมได้เข้ามาเกี่ยวข้อง จึงออกไปเก็บรวบรวมหนอนมาเลี้ยงเพิ่มครั้งที่ 2 (BBS-2) เพาะเลี้ยงจนถึง F_4 พบว่า ระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตในระยะ F_0 , F_1 , F_2 , F_3 และ F_4 ร้อยละ 44.32, 2.39, 1.57, 69.07 และ 14.54 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงจนเจริญเติบโตเข้าเป็นดักแด้ และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 25.12, 51.4, 68.68, 22.9 และ 34.37 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.1) จากการเลี้ยงครั้งนี้พบว่าอัตราการรอดชีวิตของหนอนใน F_1 และ F_2 ต่ำมาก อาจมีสาเหตุมาจากมีปริมาณหนอนสูงมาก แต่แหล่งพืชอาหารที่ปลอดสารเคมียังมีไม่เพียงพอ และสภาพในห้องเลี้ยงแมลงบางส่วนยังไม่เหมาะสม ทำให้มีหนอนตายจำนวนมาก จึงทำการเก็บรวบรวมหนอน มาเลี้ยงเพิ่มอีกเรื่อย ๆ ข้อมูลอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของหนอนแสดงดังตารางผนวก 1.1 และเมื่อมีการเก็บรวบรวมหนอนมาเลี้ยงเพิ่มในครั้งที่ 8 (BBS-8) สามารถรวบรวมข้อมูลอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของหนอนได้ทั้งหมด 9 รุ่น (F_0 - F_9) พบว่าระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 57.86, 23.78, 82.06, 37.02, 33.79, 60.75, 68.52, 62.40, 43.12 และ 49.46 ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงจนเจริญเติบโตเข้าเป็นดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 63.85, 91.85, 61.83, 53.11, 94.99, 86.5, 86.84, 76.59, 86.38 และ 75.22 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.1) ซึ่งอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของหนอนอยู่ในระดับที่พอใจ มีปริมาณหนอนพอเพียงสำหรับใช้ในงานทดลอง

ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่เก็บมารุ่นแรก (TMS-1) สามารถรวบรวมข้อมูลอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตได้ในระยะ F_0 , F_1 , F_2 , F_3 และ F_4 โดยระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 39.84, 42.05, 8.43, 49.56 และ 6.74 เมื่อเจริญเติบโตเข้าเป็นดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 26.30, 72.95, 68.00, 87.49 และ 8.30 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.2) ในรุ่นแรกที่เก็บมานี้มีปริมาณหนอนสูงมาก เมื่อเลี้ยงในห้องเลี้ยงแมลง สามารถควบคุมให้ได้ตัวเต็มวัยจำนวนมากในรุ่น F_1 , F_2 และ F_3 พอถึง F_4 แมลงเริ่มอ่อนแอและลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว จึงได้ออกไปเก็บรวบรวมหนอนมาเลี้ยงเพิ่มครั้งที่ 2 (TMS-2) สามารถรวบรวมข้อมูลอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของหนอนได้ในระยะ F_0 , F_1 และ F_2 พบว่าระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 91.06, 62.83 และ 24.98 จนเจริญเติบโตเป็นดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 63.53, 26.92 และ 29.93 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.2) แต่จำนวนยังไม่พอสำหรับงานทดลองจึงได้

ออกไปเก็บรวบรวมหนอนมาเลี้ยงเพิ่มอีกเรื่อย ๆ ข้อมูลอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของหนอนแสดงดังตารางผนวก 1.2 และเมื่อไปเก็บรวบรวมหนอนมาเลี้ยงเพิ่มในครั้งที่ 7 (TMS-7) สามารถรวบรวมข้อมูลอัตราการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของหนอนได้ทั้งหมด 8 รุ่น (F_0 - F_8) พบว่าระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 18.58, 26.56, 25.19, 25.95, 30.97, 27.18, 26.38 และ 29.51 จนเจริญเติบโตเป็นดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 74.81, 77.04, 90.10, 84.73, 84.77, 88.05, 83.23 และ 79.61 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.2) ในช่วงนี้ อัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของหนอนไผ่ยังคงอยู่ในระดับที่พอใจและมีปริมาณหนอนพอเพียงสำหรับใช้ในงานทดลอง

หนอนไผ่กาสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ทำการเลี้ยงต่อเนื่องมาตั้งแต่ได้รับดักแด้จาก Nagoya University ประเทศญี่ปุ่น มีช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงจากวันที่ 8 ธันวาคม 2546 สามารถรวบรวมข้อมูลอัตราการอยู่รอดและการเจริญเติบโตของหนอนได้ทั้งหมด 20 รุ่น (F_0 - F_{20}) ระยะหนอนมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 28.83, 4.87, 14.34, 12.24, 15.44, 13.91, 8.20, 15.07, 54.91, 41.99, 61.18, 75.00, 54.72, 65.43, 59.75, 39.31, 60.00, 78.63, 44.86, 30.43 และ 69.14 ตามลำดับ เมื่อหนอนเจริญเติบโตจนเข้าดักแด้และออกเป็นตัวเต็มวัย มีอัตราการออกเป็นตัวเต็มวัยร้อยละ 34.14, 84.21, 95.23, 95.55, 93.70, 87.78, 90.69, 69.23, 76.84, 51.32, 59.80, 68.59, 56.35, 65.05, 65.36, 36.89, 88.89, 56.52, 64.58, 77.55 และ 66.07 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.3) ในรุ่น F_8 จำนวนหนอนไผ่กาสายพันธุ์ OSS สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นและช่วงแสงในห้องเลี้ยงแมลง ทำให้หนอนไผ่กาสายพันธุ์ OSS สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ ซึ่งอัตราเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นมาอย่างสม่ำเสมอของหนอนไผ่กาสายพันธุ์ OSS จะเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญอันหนึ่งว่า สภาพห้องเลี้ยงแมลงมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอนไผ่กาสายพันธุ์

จากการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนไผ่ที่เก็บมาได้ในสภาพห้องเลี้ยงแมลง พบว่าหนอนไผ่กาสายพันธุ์ที่เพิ่งเก็บมาจากแปลงปลูกของเกษตรกรมีอัตราการตายส่วนหนึ่ง เนื่องจากแตนเบียน *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) ซึ่งเป็น larval parasites ที่ติดมาจากสภาพธรรมชาติ พบหนอนไผ่กาสายพันธุ์ (host) จำนวนมากที่ถูกวางไข่โดยแตนเบียนชนิดนี้ เมื่อแตนเบียนฟักออกจากไข่จะอาศัยอยู่ในหนอนไผ่กาสายพันธุ์ จนถึงประมาณวัยที่ 3 จึงออกจาก host และเข้าดักแด้สีขาวอยู่ข้างๆ host หลังจากนั้นไม่นาน host ก็ตาย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Delucchi et al. (1954) ว่า *C. plutellae* สามารถฆ่าหนอนไผ่กาสายพันธุ์ได้สูงถึง 60-80% ตามรายงานการวิจัยในปี ค.ศ.1954 ซึ่งย้อนหลังไปกว่า 50 ปีนี้ ชี้ให้เห็นว่า ในช่วงเวลาดังกล่าวหนอนไผ่กาสายพันธุ์ยังไม่พัฒนาความต้านทานต่อสารเคมี นอกจากนี้ปัญหาโรคกันขาวของหนอนไผ่กาสายพันธุ์ ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดจนกระทั่งเข้าดักแด้ของหนอนไผ่กาสายพันธุ์มีค่าต่ำลง

ส่วนสาเหตุที่ทำให้จำนวนหนอนใยผักและดักแด้ของ 3 สายพันธุ์ มีจำนวนลดลง เนื่องจากปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ เช่น ความคงที่ของอุณหภูมิและความชื้น ความอับชื้นในห้องเลี้ยงแมลง การใช้ฟูกกันเชื้อหนอน เพื่อเปลี่ยนอาหารและโรคกันขาวมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในระยะตัวหนอน เป็นต้น ส่วนระยะดักแด้ มีสาเหตุที่ทำให้ดักแด้จำนวนน้อยลง เช่น ผีเสื้อแห้งตายก่อนออกจากใย และดักแด้แห้งตายเนื่องจากความชื้นไม่เพียงพอ ผีเสื้อวางไข่น้อย และไข่ไม่ฟักเป็นตัวเพราะช่วงแสงไม่เหมาะสม ซึ่งสภาพแวดล้อมดังกล่าวทางคณะผู้วิจัยได้ปรับปรุงให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของหนอนใยผักแล้ว

ปัจจุบันได้มีความพยายามเพาะเลี้ยงแมลงในพืชอาหารที่เจริญตามธรรมชาติ เช่น ปลอ่ยตัวอ่อนแมลงบนพืชอาหารที่ปลูกในกระถางและใช้กรงมุ้งลวดครอบ ปลอ่ยให้แมลงได้เจริญเติบโตโดยไม่ถูกรบกวนจากมนุษย์ เช่น ไม่ต้องมีการเปลี่ยนใบพืชอาหารทุกวัน เพียงแต่เฝ้าดูแลรดน้ำต้นพืชอาหารให้แข็งแรงและสดอยู่เสมอเท่านั้น โดยวิธีนี้จะได้ปริมาณของแมลงที่ต้องการจากสภาพธรรมชาติ และแมลงหรือตัวหนอนอยู่ในสภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแมลงทดสอบประสิทธิภาพเป็นอย่างดี เช่น การทดสอบหาค่า LC_{50} ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เป็นต้น ส่วนการศึกษาการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผัก *B. thuringiensis* ยังคงต้องตรวจนับจำนวนของหนอนและดักแด้ในแต่ละรุ่นอย่างต่อเนื่องซึ่งวิธีการที่ใช้อยู่เป็นวิธีที่เหมาะสมและใช้ในห้องปฏิบัติการต่างๆ

2.2 ผลการทดสอบการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590

2.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis*

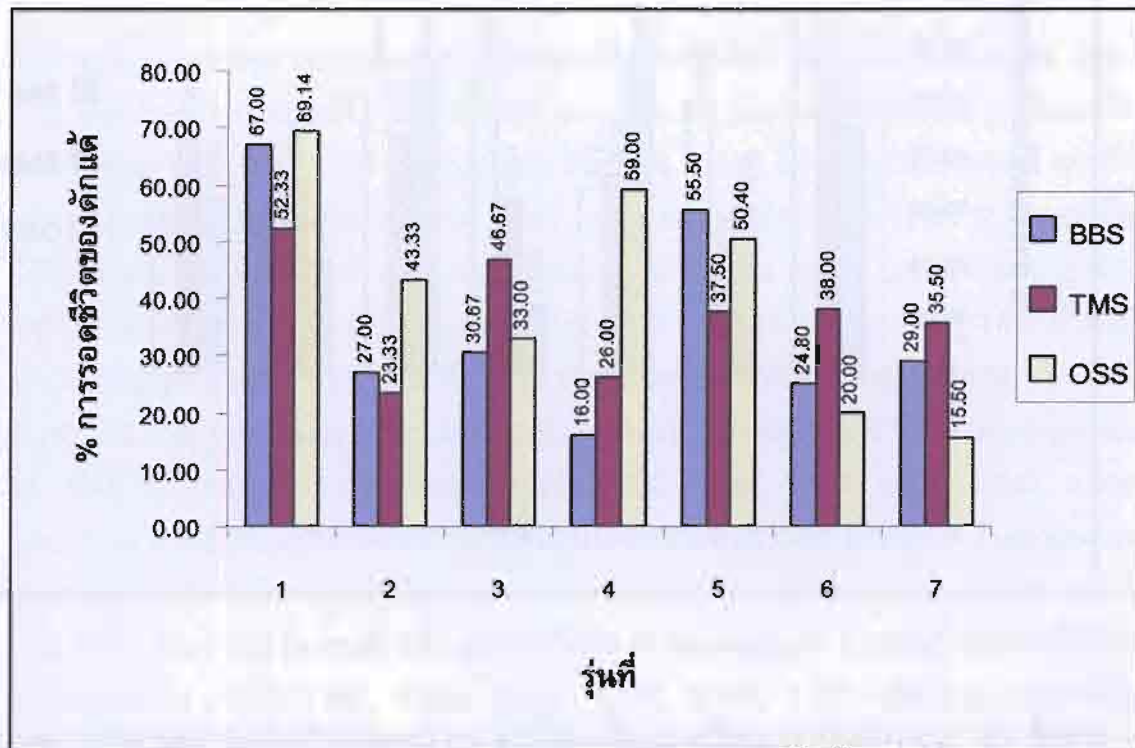
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ที่ระดับ LC_{50} กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ในห้องปฏิบัติการ พบว่าระดับความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 ที่ทำให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.762×10^{-2} cfu/ml (ตารางที่ 2.2) เมื่อทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่า LC_{50} เท่ากับ 8.574×10^{-1} cfu/ml (ตารางที่ 2.4) และเมื่อทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.68 cfu/ml (ตารางที่ 2.6) ส่วนระดับความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 ที่ทำให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 4.670×10^{-2} cfu/ml (ตารางที่ 2.3) ทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.099×10^2 cfu/ml (ตารางที่ 2.5) และเมื่อทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS มีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.37×10^1 cfu/ml (ตารางที่ 2.7)

2.2.2 ผลการทดสอบการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *Bacillus thuringiensis*

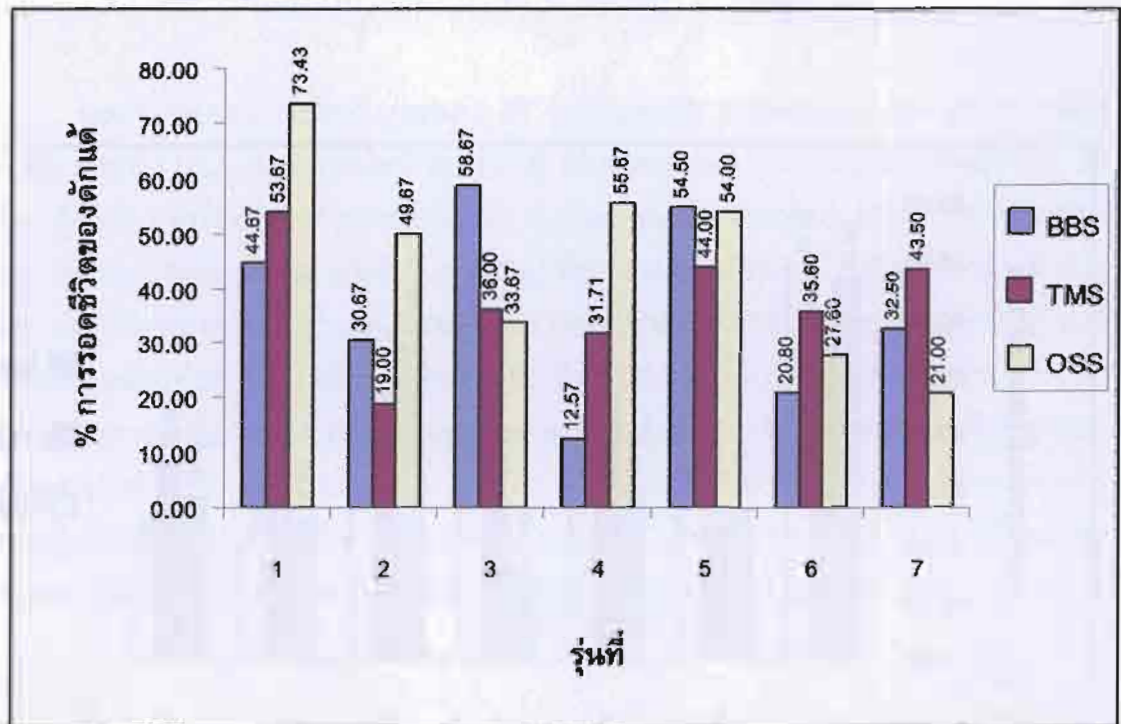
ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 67.00, 27.00, 30.67, 16.00, 55.50, 24.80 และ 29.00 ตามลำดับ ทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 52.33, 23.33, 46.67, 26.00, 37.50, 38.00 และ 35.50 ตามลำดับ และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 69.14, 43.33, 33.00, 59.00, 50.40, 20.00 และ 15.50 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.4 และภาพที่ 2.5)

ส่วนผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 44.67, 30.67, 58.67, 12.57, 54.50, 20.80 และ 32.50 ตามลำดับ ทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 53.67, 19.00, 36.00, 31.71, 44.00, 35.60 และ

43.50 ตามลำดับ และทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนไผ่ฝักสายพันธุ์ OSS ได้ทั้งหมด 7 รุ่น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของแมลงเป็นร้อยละในรุ่นที่ 1-7 คือ 73.43, 49.67, 33.67, 55.67, 54.00, 27.60 และ 21.00 ตามลำดับ (ตารางผนวก 1.5 และภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.5 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของดักแด้ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 ต่อหนอนไผ่ฝักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) 7 รุ่น สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) 7 รุ่น และหนอนไผ่ฝักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) 7 รุ่น ที่ระดับ 10 เปอร์เซนต์ (LC_{10})



ภาพที่ 2.6 เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของดักแด้ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพการทำลายของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 ต่อ หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) 7 รุ่น สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) 7 รุ่น และหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) 7 รุ่น ที่ระดับ 10 เปอร์เซนต์ (LC_{10})

2.2.3 ผลการคำนวณอัตราความต้านทาน (Resistance Ratio) และค่าHeritability

2.2.3.1 อัตราความต้านทาน (Resistance Ratio)

ผลการเลี้ยงหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS เพื่อเพิ่มปริมาณและเพื่อการทดสอบกับ *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (LC₁₀) อย่างต่อเนื่อง ทั้งหมด 7 รุ่น พบว่าอัตราความต้านทาน (Resistance Ratio ; RR) คำนวณได้จาก ผลหารระหว่างค่า LC₅₀ของประชากรหนอนที่ได้รับคัดเลือก (selected population) กับค่า LC₅₀ ของประชากรหนอนที่ไม่ได้รับคัดเลือก (nonselected population) ในแต่ละรุ่น หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 0.273, 0.286, 13.096, 4.067, 2.310, 2.825 และ 0.954 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.2) และเมื่อได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 0.424, 0.541, 2.403, 0.972, 1.494, 0.429 และ 0.648 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.3) หนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 0.0007, 0.174, 11.817, 5.262, 26.309, 0.479 และ 0.481 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.4) และเมื่อได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 0.086, 0.757, 1.354, 0.812, 0.147, 0.354 และ 31.58 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.5) ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 2.853, 1.531, 2.368, 1.061, 0.008, 1.019 และ 1.754 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.6) และเมื่อได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีอัตราความต้านทาน เท่ากับ 0.467, 0.022, 0.328, 1.174, 0.140, 0.111 และ 1.25 ตามลำดับ (ตารางที่ 2.7)

จะเห็นได้ว่าการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *B. thuringiensis* ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลที่ไม่คงที่ โดยจากการศึกษาชนิดของ *cry* gene ทำให้ทราบว่าใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีจำนวน 7 ชนิด คือ *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I* และ *cry2A* และใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีจำนวน 6 ชนิด คือ *cry1Ab*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1I* และ *cry2A* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Salama and Matter (1991) พบว่า การทดสอบ *B. thuringiensis* ที่มีสารพิษ (toxin) หลายชนิด กับหนอน *Spodoptera littoralis* จะมีการพัฒนาความต้านทานต่อสารพิษแต่ละตัวนั้นมากและไม่คงที่ในรุ่นแรกๆ เช่นเดียวกับการทดลองของ Tabashnik *et al.* (1995) ที่ศึกษาความต้านทานของหนอนใยผัก 3 ประชากรกับ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* โดยทดสอบ 21-40 ช่วงรุ่น และในประเทศไทย โสภณและคณะ (2546) แยกเฉพาะสารพิษ *Cry1Ac* ของ *B. thuringiensis* Berliner ออกมาเพื่อทดสอบหาการพัฒนาความต้านทานของหนอนเจาะสมอฝ้าย (BKBT) โดยทำการคัดเลือก 29 ช่วงอายุขัย พบว่าหนอนเจาะสมอฝ้ายมีความต้านทานถึง 160 เท่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อ่อนแอ (BK77)

โดยความต้านทานเกิดในระดับปานกลางในการคัดเลือก 14 ครั้งแรก และความต้านทานมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลงประมาณ 4-5 เท่า โดยหนอนเจาะสมอฝ้ายสามารถพัฒนาความต้านทานต่อ delta-endotoxins ของ *B. thuringiensis* ได้เมื่อแมลงได้รับสารพิษชนิดนี้อย่างต่อเนื่อง เป็นระยะเวลานานติดต่อกัน

การศึกษาอัตราความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ JC590 ยังไม่ได้ผลตามที่ตั้งเป้าหมายไว้ อุปสรรคสำคัญคือการเพิ่มปริมาณของหนอนใยผักให้พอเพียงสำหรับการทดสอบทดสอบหาค่า LC_{10} และ LC_{50} ต่อเนื่องให้ได้มากกว่า 5 รุ่นนั้น มีผลกระทบจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น การปรับตัวของหนอนใยผักจากสภาพแปลงปลูกมาอยู่ในห้องปฏิบัติการมีผลให้หนอนใยผักบางส่วนอ่อนแอและไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตซึ่งผู้วิจัยได้ควบคุมปริมาณความชื้นและช่วงแสงให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอน แตงเบียนและเชื้อโปรโตซัว (ซึ่งทำให้เกิดโรคกันขาว) ทำให้หนอนใยผักตายเป็นจำนวนมาก และการควบคุมประสิทธิภาพ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ที่อยู่ในรูปเชื้อสด ให้คงที่ในทุกๆ การทดลองซึ่งทำได้ยากมาก ทำให้ผู้วิจัยต้องใช้เวลาานกว่าที่กำหนดไว้ในแผน และไม่สามารถเลี้ยงหนอนใยผักให้ได้จำนวนรุ่นมากพอที่จะให้ผลอัตราความต้านทานที่คงที่ ซึ่งปกติในช่วงรุ่นแรกอัตราความต้านทานไม่คงที่มักจะขึ้นๆลงๆ จนกว่าจะผ่านรุ่นที่ 5 ไปแล้วจึงเริ่มเห็นผลชัดเจน ผู้วิจัยได้เลี้ยงหนอนใยผักและทดสอบให้ได้ถึง 7 รุ่น เพื่อข้อมูลจะได้นำไปเข้าสู่การคำนวณและผลที่ได้สามารถอ่านและแปลผลในระดับที่เชื่อถือได้ ตามเกณฑ์ที่จะบอกอัตราความต้านทานได้ ควรทำการทดสอบหนอนใยผักให้ได้มากกว่า 20 รุ่น และได้ค่า RR ก่อนข้างคงที่ รวมทั้งช่วงเวลาที่ทำการทดลองนี้ใกล้ถึงระยะสิ้นสุดโครงการ ผู้วิจัยมีความจำเป็นต้องยุติการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลเท่าที่ได้ เพื่อรายงานผลการวิจัย

ตารางที่ 2.2 หนอนใยผักสายพันธุ์บางตัวของ (BBS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	1.762x10 ⁻²	5.709x10 ⁶	1.762x10 ⁻²	5.709x10 ⁶	1
1	LC ₁₀	300	33.00	3.399x10 ¹	7.042x10 ⁵	1.246x10 ²	1.297x10 ⁶	0.273
2	LC ₁₀	300	73.00	1.759x10 ³	7.028x10 ⁵	6.145x10 ³	6.329x10 ⁷	0.286
3	LC ₁₀	300	69.33	1.131 x10 ⁴	3.110x10 ⁶	8.636x10 ²	7.151x10 ⁵	13.096
4	LC ₁₀	350	84.00	1.055x10 ²	1.032x10 ⁵	2.594x10 ¹	4.559x10 ⁴	4.067
5	LC ₁₀	200	44.50	1.055x10 ²	1.032x10 ⁵	4.566x10 ¹	1.050x10 ⁶	2.310
6	LC ₁₀	250	75.20	5.190x10 ³	1.265x10 ⁷	1.837 x10 ³	5.599x10 ⁸	2.825
7	LC ₁₀	200	71.00	1.418x10 ³	8.695x10 ⁷	1.487x10 ³	1.695	0.954

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio(LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

ตารางที่ 2.3 หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	4.670x10 ⁻²	1.471x10 ¹³	4.670x10 ⁻²	1.471x10 ¹³	1
1	LC ₁₀	300	55.33	1.587x10 ³	3.493x10 ⁷	3.744x10 ³	7.448x10 ⁶	0.424
2	LC ₁₀	300	69.33	1.162x10 ⁴	1.716x10 ⁶	2.147x10 ⁴	5.988x10 ⁷	0.541
3	LC ₁₀	300	41.33	3.273x10 ²	7.120x10 ⁵	1.362x10 ²	1.983x10 ⁶	2.403
4	LC ₁₀	350	87.43	2.116x10 ¹	5.351x10 ⁵	2.177x10 ¹	2.736x10 ⁴	0.972
5	LC ₁₀	200	45.50	2.076x10 ³	9.821x10 ⁵	1.390x10 ³	2.210x10 ⁷	1.494
6	LC ₁₀	250	79.20	3.704 x10 ³	3.849x10 ⁷	8.635x10 ³	7.151x10 ⁶	0.429
7	LC ₁₀	200	67.50	1.395x10 ³	3.146x10 ⁷	2.152x10 ³	9.692x10 ¹³	0.648

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio (LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

ตารางที่ 2.4 หนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	8.574x10 ⁻¹	9.970x10 ⁵	8.574x10 ⁻¹	9.970x10 ⁵	1
1	LC ₁₀	300	47.67	2.200x10 ⁻²	4.451x10 ⁵	3.274x10 ¹	3.700x10 ⁴	0.0007
2	LC ₁₀	300	76.67	1.815x10 ³	1.660x10 ⁵	1.040x10 ⁴	1.191x10 ⁷	0.174
3	LC ₁₀	300	53.33	1.043x10 ⁴	8.080x10 ⁵	8.826x10 ²	3.364x10 ⁶	11.817
4	LC ₁₀	350	73.43	1.815x10 ²	1.660x10 ⁴	3.449x10 ¹	1.233x10 ⁵	5.262
5	LC ₁₀	200	62.50	1.759x10 ²	7.028x10 ⁴	6.686	1.101x10 ⁶	26.309
6	LC ₁₀	250	62.00	1.527x10 ³	4.866x10 ⁵	3.188x10 ³	1.070x10 ⁶	0.479
7	LC ₁₀	200	64.50	1.174x10 ³	3.041x10 ⁶	2.441x10 ³	3.602x10 ⁸	0.481

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio (LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

ตารางที่ 2.5 หนอนใยผักสายพันธุ์ทำม่วง (TMS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	4.099x10 ²	8.785x10 ⁵	4.099x10 ²	8.785x10 ⁵	1
1	LC ₁₀	300	46.33	1.472x10 ²	1.817x10 ⁵	1.700x10 ³	1.718x10 ⁶	0.086
2	LC ₁₀	300	81.00	6.351x10 ³	1.699x10 ⁵	8.387x10 ³	5.850x10 ⁶	0.757
3	LC ₁₀	300	64.00	2.900x10 ³	5.198x10 ⁶	2.076x10 ³	9.821x10 ⁵	1.397
4	LC ₁₀	350	68.28	2.243x10 ²	1.245x10 ⁶	2.761x10 ²	1.987x10 ⁵	0.812
5	LC ₁₀	200	56.00	4.729x10 ²	1.781x10 ⁶	3.215x10 ³	9.830x10 ⁷	0.147
6	LC ₁₀	250	64.40	1.028x10 ⁴	6.902x10 ⁶	2.902x10 ⁴	1.624x10 ⁸	0.354
7	LC ₁₀	200	56.50	1.363x10 ³	5.068x10 ⁶	4.316x10 ¹	6.902x10 ¹¹	31.58

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio (LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

ตารางที่ 2.6 หนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ(OSS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC.Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	2.68	8.27x10 ⁵	2.68	8.27x10 ⁵	1
1	LC ₁₀	350	30.29	1.01 x10 ¹	1.11x10 ⁵	3.54	2.05x10 ⁵	2.853
2	LC ₁₀	300	26.00	5.42	1.05x10 ⁴	3.54	2.59x10 ⁵	1.531
3	LC ₁₀	300	33.00	1.21 x10 ⁴	4.07x10 ⁴	5.11x10 ²	8.57x10 ⁴	2.378
4	LC ₁₀	300	31.00	4.34	1.92x10 ⁴	4.09	1.51x10 ⁴	1.061
5	LC ₁₀	250	30.00	0.37	2.56x10 ⁴	4.38x10 ¹	1.86x10 ⁵	0.008
6	LC ₁₀	250	19.60	1.07x10 ¹	3.27x10 ⁵	1.05 x10 ¹	6.85x10 ⁴	1.019
7	LC ₁₀	200	35.60	2.14x10 ¹	2.17x10 ⁴	1.22x10 ³	2.57 x10 ⁴	1.754

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio(LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

ตารางที่ 2.7 หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (OSS) ที่ได้รับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 และระดับความต้านทานของประชากรที่ได้รับการคัดเลือกและไม่ได้รับการคัดเลือก

SG ^{1/}	LC.Used ^{2/}	No. Used	% Mort. ^{3/}	Selected population		Nonselected population		RR ^{4/}
				LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	LC ₅₀ (cfu/ml)	LC ₉₅ (cfu/ml)	
P	-	-	-	1.37x10 ¹	2.04x10 ⁶	1.37x10 ¹	2.04x10 ⁶	1
1	LC ₁₀	350	26.57	1.76	3.36x10 ⁵	3.77	9.21x10 ⁵	0.467
2	LC ₁₀	300	23.00	0.68	4.43x10 ⁴	3.05x10 ¹	7.15x10 ⁴	0.022
3	LC ₁₀	300	34.00	1.34x10 ¹	8.49x10 ⁴	4.08x10 ¹	1.95x10 ⁵	0.328
4	LC ₁₀	300	29.67	5.47	1.07x10 ⁵	4.66	1.79x10 ⁶	1.174
5	LC ₁₀	250	24.40	1.63	1.53x10 ⁵	1.16x10 ¹	1.47x10 ⁵	0.140
6	LC ₁₀	250	23.20	6.81	4.28x10 ⁵	6.13x10 ¹	6.44x10 ⁴	0.111
7	LC ₁₀	200	21.00	1.55x10 ¹	1.02x10 ⁵	1.24x10 ¹	3.27x10 ⁵	1.25

^{1/} Selection generation; ^{2/} Lethal concentration of *B. thuringiensis* used for selection; ^{3/} Mortality of *Plutella xylostella* from imposing selection (%);

^{4/} Resistance ratio (LC₅₀ of selected population / LC₅₀ of nonselected population)

2.2.3.2 ค่า Heritability (h^2)

ค่าพารามิเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณการประมาณค่า Heritability ของหนอนใยผัก สายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 แสดงไว้ในตารางที่ 2.8-2.13 การประมาณค่า Heritability คำนวณได้จากความชัน (slope) ของเส้นแนวโน้ม (regression line) ระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR)

จากการทดสอบหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ 0.047 และ -0.009 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์เส้นแนวโน้ม มีสมการเส้นแนวโน้ม คือ $\Sigma R = 0.412 + 0.047\Sigma S$ ($r^2 = 0.087$, $P = 0.630$) และ $\Sigma R = 0.502 - 0.009\Sigma S$ ($r^2 = 0.012$, $P = 0.860$) (ตารางที่ 2.14 และ 2.15) ตามลำดับ การทดสอบหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ 0.074 และ -0.081 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์เส้นแนวโน้ม มีสมการเส้นแนวโน้ม คือ $\Sigma R = -0.141 + 0.074\Sigma S$ ($r^2 = 0.032$, $P = 0.771$) และ $\Sigma R = 1.546 - 0.081\Sigma S$ ($r^2 = 0.494$, $P = 0.186$) (ตารางที่ 2.16 และ 2.17) ตามลำดับ ส่วนการทดสอบหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ -0.074 และ 0.012 ตาราง ANOVA สำหรับวิเคราะห์เส้นแนวโน้ม มีสมการเส้นแนวโน้ม คือ $\Sigma R = 0.037 - 0.074\Sigma S$ ($r^2 = 0.139$, $P = 0.537$) และ $\Sigma R = -0.592 + 0.012\Sigma S$ ($r^2 = 0.008$, $P = 0.885$) (ตารางที่ 2.18 และ 2.19) ตามลำดับ

Devriendt and Maetouret (1976) รายงานค่า h^2 ของหนอนใยผักที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการในฝรั่งเศสมีค่า 0.047 ในขณะที่การทดลองของ Tabashnik *et al.* (1991) มีรายงานค่า h^2 ของหนอนใยผัก 3 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากประชากรในแปลงที่มีความต้านทานปานกลางในฮาวาย มีค่า 0.14, 0.17 และ 0.18 ตามลำดับ ส่วนในประเทศไทยมีรายงานค่า h^2 ของหนอนใยผักที่เก็บจากแปลงในเขตบางแค ซึ่งเป็นแหล่งที่มีการใช้สารเคมีกำจัดแมลงสูงอีกพื้นที่หนึ่งว่ามีค่า h^2 เท่ากับ 0.14 (Li, 1994)

ค่า Heritability เป็นค่าที่บอกความสามารถในการถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูก ค่า Heritability มากแสดงว่ามีโอกาสในการถ่ายทอดยีนไปสู่รุ่นลูกได้มากกว่าค่าน้อย และจากการทดลองในครั้งนี้ ผลที่ได้จากการทดลองยังไม่คงที่ จึงอาจส่งผลให้การนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทำให้ได้ผลที่ไม่แน่นอน

ตารางที่ 2.8 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

SG	Log $\bar{X}$	σ	i	S	ΣS	R	ΣR
P	-	5.181	0.491	2.544	2.544	-	-
1	-0.565	2.439	1.225	2.988	5.532	-	-
2	-0.543	1.582	1.145	1.811	7.343	0.022	0.022
3	1.117	1.484	1.521	2.257	9.600	1.66	1.682
4	0.609	1.818	0.712	1.294	10.894	-0.508	1.174
5	0.363	1.818	1.276	2.320	13.214	-0.246	0.928
6	0.451	3.333	1.180	3.933	17.147	0.088	1.016
7	-0.021	8.547	-	-	-	-0.472	0.544

SG = Selection generation; Log $\bar{X}$ = Log LC₅₀ ของ selected population – Log LC₅₀ ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; i = Selection intensity; S = Selection differential ;

ΣS = Cumulative selection differential; R = Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.9 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

SG	Log $\bar{X}$	σ	i	s	ΣS	R	ΣR
P	-	8.849	0.885	7.831	7.831	-	-
1	-0.372	2.004	1.145	2.294	10.125	-	-
2	-0.267	1.319	0.664	0.876	11.001	0.105	0.105
3	0.381	2.033	1.644	3.342	14.343	0.648	0.753
4	-0.012	2.674	0.730	1.952	16.295	-0.393	0.36
5	0.174	1.626	1.378	2.241	18.536	0.186	0.546
6	-0.368	1.773	1.108	1.964	20.500	-0.542	0.004
7	-0.188	2.119	-	-	-	0.18	0.184

SG = Selection generation; $\text{Log } \bar{X} = \text{Log } LC_{50}$ ของ selected population – $\text{Log } LC_{50}$ ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; i = Selection intensity ; s = Selection differential ;

ΣS = Cumulative selection differential; R = Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.10 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

SG	Log $\bar{X}$	σ	I	S	ΣS	R	ΣR
P	-	3.690	0.761	2.808	2.808	-	-
1	-0.173	2.618	1.312	3.435	6.243	-	-
2	-0.758	1.192	0.852	1.016	7.259	-0.585	-0.585
3	1.072	1.148	1.235	1.417	8.676	1.830	1.245
4	0.721	1.192	1.011	1.205	9.881	-0.351	0.894
5	1.420	1.582	1.002	1.585	11.466	0.699	1.593
6	-0.320	1.522	1.048	1.595	13.061	-1.740	-0.147
7	-0.318	2.075	-	-	-	0.002	-0.145

SG = Selection generation; Log $\bar{X}$ = Log LC₅₀ ของ selected population – Log LC₅₀ ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; I = Selection intensity; S = Selection differential ;

ΣS = Cumulative selection differential; R = Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.11 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใบฝักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

SG	Log $\bar{X}$	σ	i	S	ΣS	R	ΣR
P	-	2.024	0.740	1.498	1.498	-	-
1	-1.062	1.880	1.428	2.685	4.183	-	-
2	-0.121	0.867	1.039	0.901	5.084	0.941	0.941
3	0.132	1.976	1.124	2.221	7.305	0.253	1.194
4	-0.090	2.278	0.896	2.041	9.346	-0.222	0.972
5	-0.832	2.174	1.047	2.276	11.622	-0.742	0.230
6	-0.451	1.718	0.904	1.553	13.175	0.381	0.611
7	1.499	2.169	-	-	-	1.950	2.561

SG = Selection generation; Log $\bar{X}$ = Log LC₅₀ ของ selected population – Log LC₅₀ ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; i = Selection intensity; S = Selection differential;

ΣS = Cumulative selection differential; R = Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.12 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า Heritability ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

SG	Log $\bar{X}$	σ	i	S	ΣS	R	ΣR
P	-	3.333	0.509	1.696	1.696	-	-
1	0.455	2.457	0.907	2.228	3.924	-	-
2	0.185	2.000	1.097	2.194	6.118	-0.270	-0.270
3	0.119	2.141	0.948	2.030	8.148	-0.066	-0.336
4	0.026	2.217	0.792	1.756	9.904	-0.093	-0.429
5	-2.073	2.941	1.400	4.117	14.021	-2.099	-2.528
6	0.008	2.725	1.538	4.191	18.212	2.081	-0.447
7	15.5	1.828	-	-	-	0.236	-0.211

SG = Selection generation; Log $\bar{X}$ = Log LC_{50} ของ selected population – Log LC_{50} ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; i = Selection intensity; S = Selection differential ;

ΣS = Cumulative selection differential; R = Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.13 ค่าพารามิเตอร์สำหรับใช้คำนวณค่า heritability ของหนอนในฝักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ต่อความต้านทาน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

SG	Log $\bar{X}$	σ	i	S	ΣS	R	ΣR
P	-	3.145	0.448	1.409	1.409	-	-
1	-0.331	3.215	0.803	2.582	3.991	-	-
2	-1.652	2.924	1.084	3.170	7.161	-1.321	-1.321
3	-0.484	2.309	0.692	1.598	8.759	1.168	-0.153
4	0.070	2.611	0.863	2.253	11.012	0.554	0.401
5	-0.852	3.021	1.211	3.658	14.670	-0.922	-0.521
6	-0.954	2.915	1.372	3.999	18.669	-0.102	-0.623
7	0.097	2.320	-	-	-	1.051	0.428

SG = Selection generation; $\text{Log } \bar{X}$ = Log LC_{50} ของ selected population – Log LC_{50} ของ nonselected population;

σ = Standard deviation ของ regression line ; i = Selection intensity ; S = Selection differential ;

ΣS = Cumulative selection differential; R= Response to selection; ΣR = Cumulative response to selection

ตารางที่ 2.14 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.126	0.126	0.285	0.630
Error	3	1.325	0.442		
C Total	4	1.451			

Estimated slope : 0.047 Standard error : 0.089

Estimated intercept : 0.412 Standard error : 1.076

Residual sum of square : 1.325

R squared : 0.087

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = 0.412 + 0.047 \Sigma S$$

ตารางที่ 2.15 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.005	0.005	0.037	0.860
Error	3	0.376	0.125		
C Total	4	0.381			

Estimated slope : -0.009 Standard error : 0.048

Estimated intercept : 0.502 Standard error : 0.790

Residual sum of square : 0.376

R squared : 0.012

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = 0.502 - 0.009 \Sigma S$$

ตารางที่ 2.16 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนโยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.112	0.112	0.101	0.771
Error	3	3.338	1.113		
C Total	4	3.451			

Estimated slope : 0.074

Standard error : 2.377

Estimated intercept : -0.141

Standard error : 0.231

Residual sum of square : 3.338

R squared : 0.032

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = -0.141 + 0.074 \Sigma S$$

ตารางที่ 2.17 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนโยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.279	0.279	2.923	0.186
Error	3	0.286	0.095		
C Total	4	0.565			

Estimated slope : -0.081

Standard error : 0.048

Estimated intercept : 1.546

Standard error : 0.464

Residual sum of square : 0.286

R squared : 0.494

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = 1.546 - 0.081 \Sigma S$$

ตารางที่ 2.18 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.520	0.520	0.484	0.537
Error	3	3.224	1.075		
C Total	4	3.744			

Estimated slope : -0.074 Standard error : 0.107

Estimated intercept : 0.037 Standard error : 1.293

Residual sum of square : 3.224

R squared : 0.139

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = 0.037 - 0.074 \Sigma S$$

ตารางที่ 2.19 ANOVA จากการวิเคราะห์แนวโน้มระหว่าง cumulative selection differential (ΣS) และ cumulative response to selection (ΣR) ของหนอนใยผักสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) ที่ทดสอบกับ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC590

Source of variation	Degree of freedom	Sum of squares	Mean of squares	F value	Prob>F
Model	1	0.013	0.013	0.025	0.885
Error	3	1.593	0.530		
C Total	4	1.606			

Estimated slope : 0.012 Standard error : 0.078

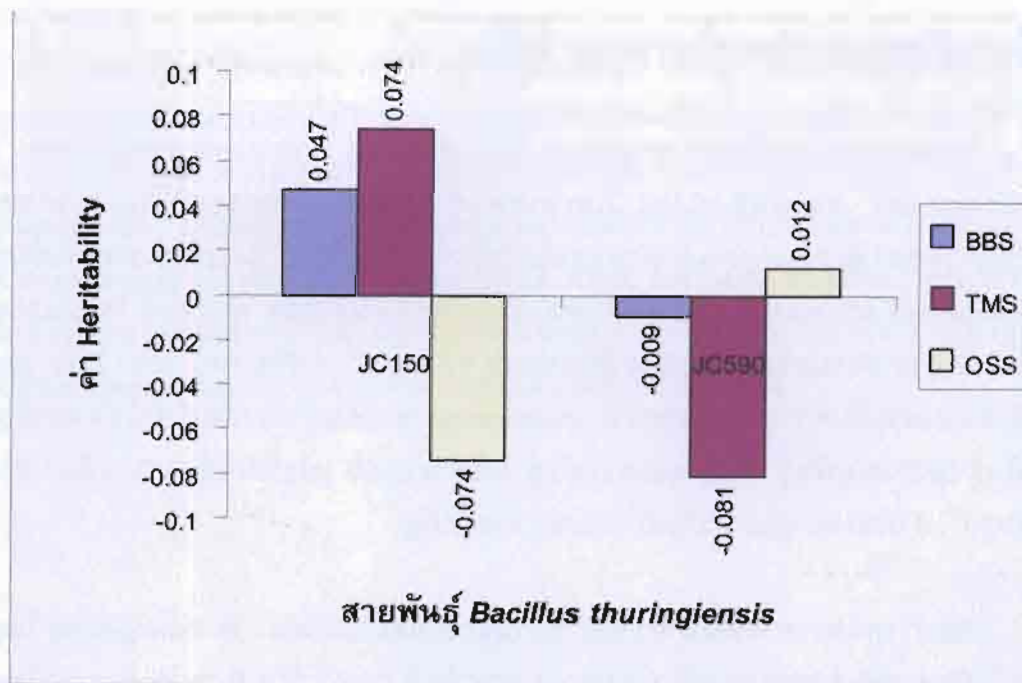
Estimated intercept : -0.592 Standard error : 0.999

Residual sum of square : 1.593

R squared : 0.008

Regression line : $Y = A + \text{Slope} * (X)$

$$\Sigma R = -0.592 + 0.012 \Sigma S$$



ภาพที่ 2.7 ค่า Heritability ทนไนฟักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) สายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) และสายพันธุ์อ่อนแอ (OSS) จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC 590

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและวงจรชีวิตของหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS เพื่อหาแนวทางในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณให้ได้จำนวนมากเพียงพอสำหรับงานทดลอง โดยมีวงจรชีวิตเฉลี่ย 20-36 วัน ระยะไข่ 1-3 วัน ระยะหนอน 5-12 วัน ระยะดักแด้ 2-5 วัน และตัวเต็มวัย 10-16 วัน หนอนใยผักที่เลี้ยงจะมีช่วงอายุในแต่ละวัยมักไม่แน่นอน โดยจะผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม เช่น อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น ช่วงแสง เป็นต้น และมีวงจรชีวิตแตกต่างกันออกไปตามแต่ละพื้นที่

การพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS ต่อ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้แบ่งออกเป็น การทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ต่อหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ ซึ่งระดับความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 ที่ทำให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 1.762×10^{-2} , 8.574×10^{-1} และ 2.68 cfu/ml ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC 590 ที่ทำให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) มีค่าเท่ากับ 4.670×10^{-2} , 4.099×10^2 และ 1.37×10^1 cfu/ml ตามลำดับ

และการทดสอบการพัฒนาความต้านทานของหนอนใยผักต่อ *B. thuringiensis* โดยให้หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS สายพันธุ์ TMS และสายพันธุ์ OSS ได้รับ *B. thuringiensis* ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (LC_{10}) อย่างต่อเนื่องได้ทั้งหมด 7 รุ่น

เมื่อคำนวณหาอัตราความต้านทาน (RR) หนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีค่าเท่ากับ 0.273, 0.286, 13.096, 4.067, 2.310, 2.825 และ 0.954 ตามลำดับ และที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีค่าเท่ากับ 0.424, 0.541, 2.403, 0.972, 1.494, 0.429 และ 0.648 ตามลำดับ ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีค่าเท่ากับ 0.0007, 0.174, 11.817, 5.262, 26.309, 0.479 และ 0.481 ตามลำดับ ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีค่าเท่ากับ 0.086, 0.757, 1.354, 0.812, 0.147, 0.354 และ 31.58 ตามลำดับ ส่วนหนอนใยผักสายพันธุ์ OSS ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 มีค่าเท่ากับ 2.853, 1.531, 2.368, 1.061, 0.008, 1.019 และ 1.754 ตามลำดับ ที่ได้รับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 มีค่าเท่ากับ 0.467, 0.022, 0.328, 1.174, 0.140, 0.111 และ 1.25 ตามลำดับ

ค่า Heritability (h^2) จากการทดสอบหนอนโยผักสายพันธุ์ BBS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ 0.047 และ -0.009 หนอนโยผักสายพันธุ์ TMS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ 0.074 และ -0.081 ส่วนหนอนโยผักสายพันธุ์ OSS กับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ JC590 ได้ค่า h^2 เท่ากับ -0.074 และ 0.012

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการเลี้ยงหนอนโยผักในห้องปฏิบัติการเพื่อเพิ่มปริมาณให้พอเพียงสำหรับการทดสอบต่าง ๆ นั้นไม่เป็นไปตามเป้าหมาย มีผลกระทบจากปัจจัยทั้งด้านกายภาพและชีวภาพหลายอย่างทำให้ผู้วิจัยต้องใช้เวลา นานกว่าที่กำหนดไว้ในแผน และไม่สามารถเลี้ยงหนอนโยผักให้ได้จำนวนรุ่นมากพอที่จะให้ผลอัตราความต้านทานที่คงที่ ซึ่งปกติในช่วงรุ่นแรกอัตราความต้านทานไม่คงที่มักจะขึ้น ๆ ลง ๆ จนกว่าจะผ่านรุ่นที่ 5 ไปแล้วจึงเริ่มเห็นผลชัดเจน แต่ผลการทดลองนี้ก็พอจะคาดการณ์ได้ว่าอัตราการพัฒนาความต้านทานของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยจะมีแนวโน้มการพัฒนาความต้านทานต่อหนอนโยผักได้ช้ามาก ทำให้เรามีโอกาสที่จะใช้ *B. thuringiensis* ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูไปได้อีกนาน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จริยา จันทรไพแสง, ปทุมพร ฉิมเอนก และ เลาณา เขาวนาดีชัย. 2544 ก. ความหลากหลายของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- จริยา จันทรไพแสง, พัฒนา ศรีฟ้า และปทุมพร ฉิมเอนก. 2544 ข. การควบคุมหนอนใยผัก *Plutella xylostella* ด้วย *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ไทย. การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 5 อารักขาพืช: ผลิตอาหารเพื่อประชากรโลก ภาคบรรยาย. ระหว่างวันที่ 21-23 พฤศจิกายน 2544 ณ โรงแรมเฟลิกซ์เวิร์ดแคว จังหวัดกาญจนบุรี. 179-184 น.
- โสภณ อูไรชื่น, J.M. Vassal และ M. Vaissayre. 2546. ความต้านทานของหนอนเจาะสมอฝ้ายที่มีต่อ δ -endotoxin ของ *Bacillus thuringiensis* Berliner, น.90-100. ใน รายงานการประชุมการอารักขาพืช ครั้งที่ 6 หนึ่งศตวรรษแห่งการอารักขาพืชในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- Delucchi, V., M. Tadic, and M. Bogavac. 1954. Mass rearing of *Apanteles plutellae* Kurdj. (Hymenoptera; Braconidae) and *Angitia tibialis* Grav. (Hymenoptera; Ichneumonidae), endoparasite of *Plutella maculipennis* Curt. and biological note on the parasites. **Plant Prot.** (Belgrade). 21: 20-41.
- Devriendt, M. and D. Martouret. 1976. Absence de resistance a *Bacillus thuringiensis* chez teigne de crucifers, *Plutella maculipennis* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Entomophaga**. 21: 189-199.
- Estada, U. and J. Ferre. 1992. Laboratory selection of *Tricoplusia ni* for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab d-endotoxin. Presented at **Annu. Meet. Soc. Invertebr. Pathol.** 25th, Heidelberg.
- Feitelson, J.S., J. Payne and L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. **Bio/Tech**. 10:271-275.

- Finney, D.J. 1971. **Probit analysis**, 3rd ed. Cambridge University Press Cambridge.
- Gould, F., A. Martinez-Ramirez, A. Anderson, J. Ferre, F. J. Silva & W. J. Moar. 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** .89: 7986-7988.
- Huang, F., R.A. Higgins, and L.T. Buschman. 1997. Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **J. Econ. Entomol.** 90: 1137-1143.
- Kinsinger, R.A. and W.H. McGaughey. 1979. Susceptibility of population of Indian meal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis* isolates (Lepidoptera:Pyralidae). **J. Econ. Entomol.** 72: 346-349.
- Li, T. 1994. **Machanism of *Bacillus thuringiensis* resistance in diamondback moth, (Lepidoptera: Yponomeutidae)** M.S. thesis, Kasetsart Univ., Bangkok,Thailand.
- McGarr, R.L., H.T. Dulmage and D.A. Wolfenbarger. 1972. Field tests with HD-1, delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, and with chemical insecticides for control of the tobacco budworm and the bollworm in 1970. **J. Econ. Entomol.** 65:897-899.
- McGaughey, W.H.and M.E. Whalon. 1992. Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Science** 258: 1451-1455.
- Moar, W.J., Pusztai-Carey, H. Van Faassen, R. Frutos, C. Rang, K. Luo, and M.J. Adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Appl. Environ. Microbio.** 61: 2086-2092.
- Müller-Cohn, J., J. Chaufaux, C. Buisson, N. Gilois, V. Sanchis, and D. Lereclus. 1996. *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to Cry1C and cross-resistance to other *Bacillus thuringiensis* crystal toxins. **J. Econ. Entomol.** 89: 791-797.

- Noppun, V., T. Miyata and T. Saito. 1986. Laboratory selection for resistance with phenothoate and fenvalerate in the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Crop Prot.** 5 (5): 323-327.
- Oppert, B., K. J. Kramer, R.W. Beeman, D. Johnson and W. H. McGaughey. 1997. Proteinase mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **J. Biol. Chem.** 272: 23473-23476.
- Salama, H.E. and M.M. Matter. 1991. Tolerance level to *Bacillus thuringiensis* Berliner in the cotton leafworm *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lep., Noctuidae). **J. Appl. Entomol.** 111: 225-230.
- Siegfried, B.D. 2006. Bt transgenic plants and the potential for resistance evolution. Agbiosafety. Available Source: <http://agbiosafety.unl.edu/resistancet.shtml>, February 12, 2006.
- Tabashnik, B.E., F.R. Groeters, N. Finson, and M.W. Johnson. 1994. Instability of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Biocontrol Sci. and Tech.** 4: 419-426.
- Tabashnik, B.E. N. Finson, M.W. Johnson and D.G. Heckel. 1995. Prolonged selection effects stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.** 88: 219-224.
- Tabashnik, B.E., N. Finson and M.W. Johnson. 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) population. **J. Econ. Entomol.** 84(1): 49-55.
- Van Rie, J., H.V. Mellaert and M. Peferoen. 1992. Mechanism of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plodia interpunctella* and *Plutella xylostella*. In : **Molecular mechanisms to insecticide resistance : diversity among insects**, C.A. Mullin and J.G. Scott, Eds., America Chemical Society, Washington DC.

บทที่ 3 ความแรงของสารออกฤทธิ์ *Bacillus thuringiensis*

การตรวจเอกสาร

B. thuringiensis เป็นแบคทีเรียที่แยกเชื้อได้ในปี ค.ศ. 1911 ต่อมาจึงพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้ก่อโรคกับหนอนผีเสื้อ จากนั้นปี ค.ศ. 1953 Hannay พบว่าผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคของแบคทีเรียชนิดนี้ จากนั้นจึงพบว่าผลึกโปรตีนเป็นแหล่งของสารพิษ ซึ่งเป็นโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่ในขณะนั้นยังไม่มีเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ปริมาณของสารนี้ได้ ต่อมาในเดือนมกราคมปี ค.ศ. 1961 ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ได้รับการขึ้นทะเบียนภายใต้บทบัญญัติของ Federal Insecticide Fungicide and Rodenticide การวิจัยในขณะนั้นชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* จะขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตต่อกรัมของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ดังนั้นอัตราการใช้และการแสดงถึงประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* จึงขึ้นอยู่กับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตต่อกรัม ต่อมาเมื่อมีข้อเสนอว่าประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ขึ้นอยู่กับความสามารถของการกระจายไปยังเป้าหมายด้วย ปี ค.ศ. 1966 ในการประชุมนานาชาติ Insect Pathology and Microbial Control ที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ ได้ตั้งระบบมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* โดยใช้ *B. thuringiensis* E-61 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากสถาบัน Pasteur กรุงปารีส ประเทศฝรั่งเศส ที่มีค่าความแรง 1000 IU ต่อมิลลิกรัม นอกจากนี้ยังใช้ *B. thuringiensis* strain (HD-1-5-1971) ซึ่งใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา มีค่าความแรง 18,000 IU/mg กับหนอนคืบกะหล่ำเป็น *B. thuringiensis* มาตรฐานเพื่อการเปรียบเทียบ และมีข้อเสนอว่าความสามารถในการฆ่าแมลงของ *B. thuringiensis* ทุกผลิตภัณฑ์ควรทำให้เป็นมาตรฐานโดยการทดสอบประสิทธิภาพ (Bioassay) ตามขั้นตอนที่ถูกต้อง (Miller, 1971)

มาตรฐานของผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* อยู่บนพื้นฐานของประสิทธิภาพการฆ่าหนอน เพื่อนำค่าที่ได้ทำผลึกกากกับผลิตภัณฑ์ และขอขึ้นทะเบียน โดยผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่ต้องการขึ้นทะเบียนควรมีการแสดงค่าความแรงในรูปของ IU ต่อมิลลิกรัมต่อผลิตภัณฑ์ ซึ่งในปัจจุบัน การวัดค่าความแรง (potency) ของสารออกฤทธิ์ของ *B. thuringiensis* แต่ละชนิดว่ามีระดับความแรงของสารออกฤทธิ์อยู่จำนวนเท่าใด โดยทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ (bioassay) กับหนอนคืบกะหล่ำ (cabbage looper, *Trichoplusia ni*) เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานที่รู้จำนวนค่าความแรงแน่นอน ความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* ที่ทำให้หนอนคืบกะหล่ำตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC₅₀) จะนำมาคำนวณหาค่าความแรงของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด โดยมีหน่วยเป็น IU/mg (International unit/milligram)

$$\text{ค่าความแรงของ Bt ตัวอย่าง} = \frac{\text{LC}_{50} (\text{Bt มาตรฐาน}) \times \text{ค่าความแรงของ Bt มาตรฐาน}}{\text{LC}_{50} (\text{Bt ตัวอย่าง})}$$

ผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* บางชนิดมีสารออกฤทธิ์ทำลายหนอนชนิดอื่นๆ เช่น หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *Spodoptera exigua*) หนอนเจาะยอดยาสูบ (tobacco budworm, *Heliothis virescens*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หรือหนอนใยผัก (diamondback moth, *Plutella xylostella*) ได้ดีกว่าสารออกฤทธิ์ทำลายหนอนคืบกะหล่ำ จึงได้มีการทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อหาค่าความแรงกับหนอนชนิดต่างๆ เหล่านั้น ซึ่งค่าที่ได้มีหน่วยเป็น SU (*Spodoptera* Unit) ในการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้หอม และ DBM Unit (Diamondback Moth Unit) เมื่อทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผัก (จริยา และคณะ, 2547)

นอกจากนี้ ยังมีผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* บางชนิด ที่จะระบุเป็นค่า % AI (Active ingredient) อาจทำให้เกิดความสับสนกับค่าความแรงที่มีหน่วยเป็น IU/mg ดังนั้น Environment Protection Agency (EPA) แห่งสหรัฐอเมริกา จึงได้มีการกำหนดค่าความสัมพันธ์ของหน่วยวัดทั้งสองไว้ดังนี้

$$100\% \text{ AI (Bt kurstaki)} = 500,000 \text{ IU/mg}$$

การทดลองเพื่อหาค่าความแรงกับสายพันธุ์มาตรฐาน เช่น การหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* serotype H-14 ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำยุง โดยเลี้ยงในถังหมัก และปั่นเพื่อแยกสปอร์และผลึกโปรตีน นำส่วนที่ได้ผสมกับ cassava-molasses-palm olein-chacoal เพื่อเป็นสารนำพา และสารเคลือบ จึงเรียกลูตรนี้ว่า CMPC-2 ศึกษาค่าความแรงในปีที่ 0, 1, และ 2 โดยเก็บที่ 32±4 องศาเซลเซียส ค่าความแรงที่ได้คือ 964, 3876.6 และ 931 ITU ต่อลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* โดยเปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐาน IPS-78 ที่มีค่าความแรง 1000 IU พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างค่าความแรงของ CMPC-2 และ IPS-78 ที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ (Ejiofor and Okafor, 1991)

นอกจากนี้การใช้ *B. thuringiensis* ในปริมาณมาก หรือการฉีดพ่นทางอากาศครอบคลุมพื้นที่กว้างเช่นการควบคุมหนอนผีเสื้อในป่าไม้ จะมีหน่วยเป็น BIU (Billion International Unit) เช่น การทดลองของ West et al. (1997) ฉีดพ่น *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, ABG6387 และ ABG6414 ฉีดพ่นทางอากาศ เพื่อทำลายหนอนผีเสื้อ eastern hemlock looper ที่ทำลายต้นสน balsam fir โดย ABG6387 มีค่าความแรง 19.3-24.1 BIU อัตราฉีดพ่น 1.34-1.96 ลิตรต่อเฮกตาร์ และ ABG6414 มีค่าความแรง 33.2-36.0 BIU อัตราการฉีดพ่น 1.67-1.8 ลิตรต่อเฮกตาร์ พบว่า การลดลงของจำนวนหนอนในการทดลองที่มีการฉีดพ่น ABG6387 มี 27-91 เปอร์เซนต์ ภายใน 10 วันหลังฉีดพ่น และเพิ่มเป็น 90-100 เปอร์เซนต์ 8 วันหลังการฉีดพ่นครั้งที่สอง ขณะที่ในการทดลองที่ฉีดพ่น ABG6414 มีการลดลงของจำนวนหนอน 76-93 เปอร์เซนต์

ภายใน 10 วันหลังการทดสอบและเพิ่มเป็น 98-100 เปอร์เซ็นต์ 7 วันหลังการฉีดพ่นครั้งที่ 2 นอกจากนี้ Bauce et al. (2004) รายงานว่าการฉีดพ่น *B. thuringiensis* ทางอากาศเพื่อควบคุม หนอนผีเสื้อ spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) ที่ทำลายสน balsam fir (*Abies balsamea*) ในตะวันตกเฉียงใต้ของรัฐ Québec ใช้ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* มีค่าความแรง 15 , 30 และ 50 BIU ต่อเฮกตาร์

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

3.1.1 การเตรียม พืชอาหารสำหรับใช้เลี้ยงหนอนใยผัก

พืชที่ใช้สำหรับเลี้ยงหนอนใยผัก คือ คენห่า ผักกวางตุ้งและปลู่ ซึ่งปลูกขยายจำนวนในกระถางดิน และได้เพิ่มระบบการปลูกผักแบบไม่ใช้ดิน (Hydroponic) เข้ามาช่วยในการขยายและเพิ่มปริมาณผัก โดยจะเพาะกล้าค่นห่าและกวางตุ้งในถ้วยพลาสติก ใช้วัสดุปลูก (Perlite + Vermiculite) ประมาณ 4-5 วัน แล้วจึงย้ายกล้าพืชลงปลูกในระบบ Hydroponic จะปลูกพืชทั้ง 2 วิธีนี้ไปพร้อมกันเพื่อให้มีพืชอาหารพร้อมที่จะใช้เลี้ยงหนอนใยผักได้พอเพียงตลอดเวลา

3.1.2 การรวบรวมหนอนใยผักจากแปลงปลูกผักของเกษตรกร

ทำการรวบรวมหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) จากแปลงปลูกผักของเกษตรกรในอำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรีและสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) จากแปลงปลูกผักในอำเภท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ช่วงเริ่มต้นโครงการวิจัย ความถี่ในการเก็บ คือ 2 สัปดาห์ต่อครั้ง ช่วงที่ไม่มีการระบาดจะขยายเวลาเป็นเดือนละ 1 ครั้ง และช่วงที่มีการระบาดจะออกเก็บสัปดาห์ละ 2 ครั้ง จนกระทั่งปริมาณหนอนใยผักในห้องเลี้ยงแมลงมีเพียงพอสำหรับการทดลอง

3.1.3 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

หนอนใยผักที่เก็บรวบรวมมาได้จากแปลงเกษตรกร จะนำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในห้องเลี้ยงแมลง ภายใต้อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ช่วงแสงที่เหมาะสมคือได้รับแสงสว่าง 16 ชั่วโมง และช่วงมืด 8 ชั่วโมง คิดเป็นอัตราส่วน 2:1 มีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงด้วยใบผักที่ปลูกในสภาพปลอดสารเคมี โดยทางปฏิบัติจะเลี้ยงหนอนใยผักรุ่น F_1 ให้ปรับตัวในสภาพห้องเลี้ยงแมลงและมีปริมาณมากพอจึงเริ่มจัดชุดทดลอง ซึ่งเริ่มจากดักแด้ของรุ่น F_1 นำดักแด้ที่เก็บรวบรวมได้ประมาณ 30-50 ตัว มาใส่ในกรงเลี้ยงแมลง ซึ่งทำด้วย acrylic ใช้ถุงน่องขึงไว้ตรงทางเปิดเข้าออกเพื่อกันไม่ให้ผีเสื้อบินออกระหว่างเปลี่ยนกล้าพืชอาหาร และใส่กล้าผักกาดหัวอายุ 4-5 วัน จำนวน 3-4 ถ้วย เพื่อให้เป็นพืชอาหารที่ผีเสื้อหนอนใยผักใช้วางไข่ ดักแด้ใช้เวลา 1-2 วัน จึงออกเป็นตัวเต็มวัย

เมื่อออกเป็นตัวเต็มวัยให้น้ำหวาน (น้ำผึ้งหรือน้ำหวานความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์) เป็นอาหาร ซึ่งตัวเต็มวัยใช้เวลาวางไข่ 3-5 วัน ช่วงเวลาที่ตัวเต็มวัยเพศเมียวางไข่จะเปลี่ยนต้นกล้า

ทุกๆ 2 วัน โดยนำต้นกล้าที่วางไข่แล้วออก และใส่ต้นกล้าใหม่ให้จนกว่าตัวเต็มวัยทั้งหมดตาย ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่จะใช้ต้นกล้าค่นำเป็นอาหาร จนเจริญเข้าสู่ระยะหนอนวัย 2 ย้ายหนอนไปเลี้ยงบนใบพืชอาหารในกล่องพลาสติกที่รองก้นกล่องด้วยกระดาษ เปลี่ยนใบพืชและกระดาษรองทุกวัน หนอนวัยสุดท้ายส่วนใหญ่จะเข้าดักแด้ที่บริเวณผากล่องและที่กระดาษรอง เก็บรวบรวมดักแด้ และปล่อยให้ออกเป็นตัวเต็มวัยเพื่อขยายพันธุ์รุ่นต่อไป

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ระดับที่ทำลายหนอนใยผักให้ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

เนื่องจาก *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เป็นสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่พบในประเทศไทย และได้ผ่านการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพต่าง ๆ แล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการนำไปกำจัดแมลงศัตรูผัก ซึ่งคณะวิจัยมีความตั้งใจที่จะศึกษาวิจัยจนถึงขั้นได้ผลิตภัณฑ์เพื่อให้เกษตรกรได้ใช้อย่างทั่วถึง ด้วยเหตุผลดังกล่าวผู้วิจัยจึงไม่ต้องการส่ง *B. thuringiensis* ทั้งสองสายพันธุ์เพื่อเทียบ ATCC serial code และเทียบค่า IU มาตรฐานเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ JC 150 และ สายพันธุ์ JC 590 และที่สำคัญคือการร่วมปรึกษาร่วมกับ Dr. Dirk A AVE ตำแหน่ง Global Development ของ Valent Bioscience Corporation (email: dirk.ave@valent.com) ซึ่งเป็นบริษัทใหญ่ที่ผลิต *B. thuringiensis* และนำเข้ามายำหน่ายในประเทศไทย ให้การยืนยันว่า IU ของ แบคทีเรียสปิน และ ฟลอร์แบค เป็นค่าที่แน่นอนและสามารถนำมาเทียบหาค่า IU ของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ได้

เตรียม *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 สายพันธุ์ JC590 และ *B. thuringiensis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้ารูปแบบผง (แบคทีเรียสปิน) และรูปแบบน้ำเข้มข้น (ฟลอร์แบค) โดย streak เชื้อบนอาหาร NA บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 72 ชั่วโมง เตรียมสารแขวนลอยสปอร์และผลึกโปรตีน โดยใช้ความเข้มข้น 5 ระดับคือ 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 cfu/ml ทดสอบกับหนอนใยผักทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยให้กินใบผักที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ความเข้มข้น 5 ระดับดังกล่าว ตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายหลังจากให้กินใบผักที่จุ่มสารละลาย *B. thuringiensis* ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม Probit analysis เพื่อใช้เป็นค่าคำนวณหาค่า IU ต่อไป ในการทดลองนี้ผลิตภัณฑ์ทางการค้าทั้ง 2 รูปแบบ นำมา streak ก่อนการนำไปใช้ทุกครั้งเพื่อลดความผิดพลาดและความแตกต่างของรูปแบบเชื้อที่ใช้ทดสอบระหว่างเชื้อสดกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

3.3 การคำนวณหาค่า International Toxicity Unit

จากค่า LC_{50} ที่ได้จากข้อ 2 นำมาคำนวณหาค่า International Toxicity Unit ได้จากสูตร

$$\text{ค่าความแรงของ Bt ตัวอย่าง} = \frac{LC_{50} (\text{Bt มาตรฐาน}) \times \text{ค่าความแรงของ Bt มาตรฐาน}}{LC_{50} (\text{Bt ตัวอย่าง})}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ระดับที่ทำลายหนอนใยผักให้ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

การทดสอบหาค่า LC_{50} ของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.246 \times 10^2 - 1.156 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.85 \times 10^2 - 2.1474 \times 10^4$ cfu/ml ส่วน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 เมื่อทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $2.37 \times 10^2 - 3.744 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $2.00 \times 10^2 - 5.6242 \times 10^4$ cfu/ml (ตามตารางที่ 3.1) ส่วน *B. thuringiensis* ผลิตภัณฑ์ทางการค้าในรูปแบบผง (TW1) ได้ทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $0.478 \times 10^2 - 2.762 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $3.35 \times 10^2 - 2.076 \times 10^4$ cfu/ml และผลิตภัณฑ์ทางการค้าในรูปแบบน้ำเข้มข้น (TW2) ทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.76 \times 10^2 - 1.300 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.20 \times 10^2 - 4.4357 \times 10^4$ cfu/ml

3.2 ผลการคำนวณหาค่า International Toxicity Unit

การหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ สายพันธุ์ JC590 โดยการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนใยผัก สายพันธุ์ BBS และสายพันธุ์ TMS ผลการทดลองพบว่า การทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบผง (TW1) โดยทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 25,473 - 57,945.94 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 12,236.8 - 28,429 IU/ml ขณะที่เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบน้ำเข้มข้น (TW2) ซึ่งทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 3,438.53 - 22,265.5 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรงระหว่าง 3,308 - 38,964 IU/ml

ในการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับ TW1 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน โดยทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 14,975.6 - 53,600 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 2,293.3 - 34,970.40 IU/ml ขณะที่การเปรียบเทียบโดยใช้ TW2 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

ทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 3,228.29 -10,776.37 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 2,642.6 -7,302 IU/ml

ค่า LC_{50} และค่าความแรงที่ได้ในแต่ละครั้งของการทดลองมีค่าต่างกันทั้งนี้เกิดจากปัจจัยหลายประการ เช่น ปัจจัยจากเชื้อทดสอบ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เป็นเชื้อสด การควบคุมความสม่ำเสมอของเชื้อในการเลี้ยงแต่ละครั้งจึงเป็นไปได้ค่อนข้างยาก ส่งผลถึงปริมาณของสารพิษที่จะนำมาทดสอบมีความแตกต่างกันในแต่ละครั้งของการทดสอบกับหนอนใยผัก และหนอนใยผักที่นำมาทดสอบ เป็นหนอนที่เก็บมาจากแปลงปลูกเกษตรกร มาเลี้ยงขยายในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ปลอดจากสารเคมี และตัวเบียนธรรมชาติ ซึ่งในแต่ละรุ่นของหนอนใยผักมีความแข็งแรงไม่เท่ากัน และบางรุ่นอาจมีความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* เป็นทุนเดิมจึงส่งผลให้การตายของหนอนไม่เท่ากันด้วย

จะเห็นได้ว่าการเปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ทางการค้าคือ แบคโทสปิน และฟลอร์แบค ซึ่งผ่านการพัฒนาคุณสมบัติให้ถึงระดับที่ดีที่สุดแล้ว ย่อมมีส่วนได้เปรียบเมื่อเทียบกับเชื้อสด *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 กับ *B. thuringiensis* TW1 และ TW2 ในการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS พบว่า ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ทางการค้า TW1 และ TW2 เมื่อเทียบกับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ไม่มีความแตกต่างกัน ขณะที่การทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ พบว่าค่าความแรงของ *B. thuringiensis* TW1 เทียบกับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ *B. thuringiensis* TW2 เทียบกับ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 ไม่มีความแตกต่างกัน แต่พบว่ามีค่าความแตกต่างกันของค่าความแรงระหว่าง *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 และ *B. thuringiensis* TW2

ตารางที่ 3.1 ผลการทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำลายของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 , สายพันธุ์ JC590 และสายพันธุ์การค้ารูปแบบผง TW1 (แบคทีเรีย) และรูปแบบน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แมค) ที่ทำลายหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS) และสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS) ให้ตายที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC50) (cfu/ml)

สายพันธุ์ <i>Bacillus thuringiensis</i>	หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS)				หนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS)			
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4
JC150	1.246×10^2	3.11×10^2	3.335×10^2	1.156×10^3	1.85×10^2	3.528×10^3	2.1474×10^4	1.417×10^3
JC590	6.67×10^2	2.37×10^2	2.75×10^3	3.744×10^3	2.00×10^2	1.828×10^3	5.6242×10^4	3.673×10^3
TW1 รูปแบบผง (แบคทีเรีย)	0.478×10^2	2.59×10^2	2.762×10^3	1.027×10^3	3.35×10^2	2.813×10^3	2.076×10^4	2.126×10^3
TW2 รูปแบบน้ำเข้มข้น (ฟลอร์แมค)	5.73×10^2	1.76×10^2	1.300×10^3	1.164×10^3	1.20×10^2	1.428×10^3	4.4357×10^4	1.395×10^3

ตารางที่ 3.2 ค่าความแรง* (Potency) (IU/ml) ของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150, สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์การคำนวณของ TW1 (แบคโทสปิน) และรูปแบบน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอรัมเบค) ที่ทำลายหนอนใยผักสายพันธุ์บางตัวของ (BBS)

สายพันธุ์ <i>Bacillus thuringiensis</i>	หนอนใยผักสายพันธุ์บางตัวของ (BBS)							
	รูปแบบผง TW1 (แบคโทสปิน)				รูปแบบน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอรัมเบค)			
	ทดสอบครั้งที่ 1	2	3	4	1	2	3	4
JC150	57,945.94	25,473	30,941.78	48,011	5,513.51	3,438.53	22,265.5	8,368.03
JC590	53,600	49,190.37	14,975.6	18,522.2	5,100	6,640.04	10,776.37	3228.29

* ค่าความแรงของ Bt ตัวอย่าง = LC_{50} (Bt มาตรฐาน) x ค่าความแรงของ Bt มาตรฐาน**

LC_{50} (Bt ตัวอย่าง)

** ค่าความแรงของสายพันธุ์การคำนวณรูปแบบผง TW1 (แบคโทสปิน) = 32,000 IU/mg

ค่าความแรงของสายพันธุ์การคำนวณน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอรัมเบค) = 8,500 IU/mg

ตารางที่ 3.3 ค่าความแรง* (Potency) (IU/ml) ของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150, สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์การคำนวณผง TW1 (แบคทีเรีย) และรูปแบบน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอไรเบค) ที่ทำลายหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS)

สายพันธุ์ <i>Bacillus thuringiensis</i>	หนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (TMS)							
	รูปแบบผง TW1 (แบคทีเรีย)				รูปแบบน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอไรเบค)			
ทดสอบครั้งที่	1	2	3	4	1	2	3	4
JC150	12,236.8	26,649.52	26,443	28,429	38,964	4,810.3	3,308	8,558.82
JC590	2,293.3	34,970.46	32,058	8797.78	7,302	6,312.2	4,009.4	2,642.6

* ค่าความแรงของ Bt ตัวอย่าง = LC_{50} (Bt มาตรฐาน) x ค่าความแรงของ Bt มาตรฐาน**

LC_{50} (Bt ตัวอย่าง)

** ค่าความแรงของสายพันธุ์การคำนวณผง TW1 (แบคทีเรีย) = 32,000 IU/mg
 ค่าความแรงของสายพันธุ์การคำนวณน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอไรเบค) = 8,500 IU/mg

ตารางที่ 3.4 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแรงของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) กับหนอนใยผักสายพันธุ์บางบัวทอง (BBS)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig. ¹
JC150 & TW1	Between Groups	147676891.970	1	147676891.970	1.307	.296
	Within Groups	677911698.112	6	112985283.019		
	Total	825588590.082	7			
JC590 & TW1	Between Groups	8586720.244	1	8586720.244	.042	.844
	Within Groups	1216376668.450	6	202729444.742		
	Total	1224963388.693	7			
JC150 & TW2	Between Groups	3899824.028	1	3899824.028	.108	.753
	Within Groups	216244359.356	6	36040726.559		
	Total	220144183.384	7			
JC590 & TW2	Between Groups	8518747.261	1	8518747.261	1.651	.246
	Within Groups	30954743.380	6	5159123.897		
	Total	39473490.641	7			

¹ α 0.005 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10

ตารางที่ 3.5 ผลวิเคราะห์ทางสถิติของค่าความแรงของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 เทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าชนิดผง TW1 (แบคโทสปิน) และชนิดน้ำเข้มข้น TW2 (ฟลอร์แบค) กับหนอนใยผักสายพันธุ์ท่าม่วง (TMS)

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig. ¹
JC150 & TW1	Between Groups	146561581.153	1	146561581.153	5.181	.063
	Within Groups	169720838.165	6	28286806.361		
	Total	316282419.318	7			
JC590 & TW2	Between Groups	311007536.226	1	311007536.226	2.310	.179
	Within Groups	807642961.977	6	134607160.330		
	Total	1118650498.204	7			
JC150 & TW2	Between Groups	58538905.031	1	58538905.031	.412	.544
	Within Groups	851551623.268	6	141925270.545		
	Total	910090528.299	7			
JC590 & TW2	Between Groups	23577157.805	1	23577157.805	10.446	.018
	Within Groups	13541980.350	6	2256996.725		
	Total	37119138.155	7			

¹ α 0.005 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10

สรุปผลการทดลอง

การทดสอบหาค่า LC_{50} ของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.246 \times 10^2 - 1.156 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $1.85 \times 10^2 - 2.1474 \times 10^4$ cfu/ml ส่วน *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 ทดสอบหาค่า LC_{50} กับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $2.37 \times 10^2 - 3.744 \times 10^3$ cfu/ml และทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS ได้ค่า LC_{50} ระหว่าง $2.00 \times 10^2 - 5.6242 \times 10^4$ cfu/ml

เมื่อนำมาหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ สายพันธุ์ JC590 พบว่าการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบผง (TW1) โดยทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 25,473 - 57,945.94 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 12,236.8 - 28,429 IU/ml ขณะที่เปรียบเทียบกับ *B. thuringiensis* มาตรฐานรูปแบบน้ำชั้น (TW2) ซึ่งทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 3,438.53 - 22,265.5 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรงระหว่าง 3,308 - 38,964 IU/ml

ในการทดสอบประสิทธิภาพเพื่อหาค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 เปรียบเทียบกับ TW1 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน โดยทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 14,975.6 - 53,600 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 2,293.3 - 34,970.40 IU/ml ขณะที่การเปรียบเทียบโดยใช้ TW2 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ BBS มีค่าความแรง 3,228.29 - 10,776.37 IU/ml ส่วนการทดสอบกับหนอนใยผักสายพันธุ์ TMS มีค่าความแรง 2,642.6 - 7,302 IU/ml

สรุปได้ว่าค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 เท่ากับ 12,236.8 - 28,429 IU/ml และ 3,308 - 38,964 IU/ml ในขณะที่ค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC590 เท่ากับ 2,293.3 - 34,970.40 IU/ml และ 2,642.6 - 7,302 IU/ml เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์การค้าแบคโทสปิน และฟลอร์แบค ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติในระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างค่าความแรงของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 กับผลิตภัณฑ์การค้าแบคโทสปินและฟลอร์แบค ดังนั้นจึงจัดได้ว่า *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และ สายพันธุ์ JC590 ให้ค่า IU ในเกณฑ์ที่ดีมากถึงแม้ว่า *B. thuringiensis* ที่ใช้ทดสอบยังเป็นเชื้อสด และมีผลกระทบต่อความไม่คงที่ของค่าที่ได้อยู่บ้าง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จรียา จันทรไพแสง, ยุพา มงคลสุข, สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ และประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์. 2547. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการโครงการถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้แบคทีเรียบีที จากงานวิจัยสู่เกษตรกร. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- Bauce, É., N. Carisey, A. Dopont and K. Van Frankenhuyzen. 2004. *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* aerial spray prescriptions for Balsam Fir stand protection against spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). Acta Crystallographica Section D: **Biological Crystallography**. 60:1315-1318.
- Ejiofor, A.O. and N. Okafor. 1991. Formulation of flowable liquid concentrate of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 spore and crystals as mosquito larvicide. **Journal of Applied Bacteriology**. 71:202-206.
- Miller, L.E. 1971. Notice to manufacturers, formulators, distributors, and registrants of economic poisons. Available Source: [http://www. Pest law.com/x/notice/epa/PR-71-6. html](http://www.Pestlaw.com/x/notice/epa/PR-71-6.html), January 27, 2005.
- West, R.J., D. Thompson, K.M.S. Sundaram, A. Sundaram, A. Rethakaran and R. Mickle. 1997. Efficacy of aerial applications of *Bacillus thuringiensis* Berliner and tebufenozide against the eastern hemlock looper (Lepidoptera: Geometridae). **Canadian Entomologist**. 129: 613-626.

บทที่ 4 คุณสมบัติทางชีวโมเลกุลของ *Bacillus thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงศัตรูผัก

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันการควบคุมศัตรูพืชโดยใช้ *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะสูงต่อแมลงเป้าหมาย สามารถควบคุมแมลงได้อย่างกว้างขวาง สามารถทดแทนการใช้สารเคมีได้เป็นอย่างดี ยีนที่ควบคุมการสร้าง delta-endotoxin ที่เป็นพิษต่อแมลงมีหลายชื่อได้แก่ ยีน delta-endotoxin , ยีน crystal protein (cry) และยีน insecticidal crystal protein (icp) ในปี 1993 Chilcot and Wigley จำแนกชนิดของยีน cry โดยใช้คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา ความเป็นพิษอย่างจำเพาะเจาะจงต่ออันดับของแมลง รูปร่างและขนาดของผลึกโปรตีนเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือยีน cry และยีน cyt ต่อมามีการพบผลึกโปรตีนจาก *B. thuringiensis* เพิ่มมากขึ้น วิธีการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติความเป็นพิษ รูปร่าง และขนาดของผลึกโปรตีนไม่สามารถจำแนกชนิดของยีน cry ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น Carozzi *et al.* (1991) ในปี 1998 Crickmore *et al.* ได้ปรับปรุงระบบการเรียกชื่อยีน cry โดยอาศัยการกระจายตัวทางวิวัฒนาการ ความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับกรดอะมิโน และโปรแกรมทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ในการเรียกชื่อยีน ข้อมูลการจัดจำแนกสามารถสืบค้นได้จากเว็บไซต์ http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ และในปี 1993 Carlson and Klosto พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนใน *B. thuringiensis* อาจพบทั้งบนโครโมโซม และพลาสมิด ในบางสายพันธุ์พบว่ายีนดังกล่าวปรากฏเฉพาะบนโครโมโซม แต่ส่วนใหญ่จะพบอยู่บนพลาสมิด ยีน cry ส่วนใหญ่เป็น monocistronic คือ มีรหัสพันธุกรรมที่สร้างโปรตีนเพียงชนิดเดียว บางยีนอาจอยู่ในรูปของ polycistronic ได้

ในกลุ่มของยีน cry ยีน cryI มีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากยีน cryI มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera ซึ่งจัดเป็นแมลงที่มีชนิดมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ยีน cryI สร้างผลึกโปรตีนน้ำหนัก 130-140 กิโลดาลตัน สร้างผลึกรูปปรัมาติดคู่ในระหว่างการสร้างสปอร์ของ *B. thuringiensis* ในระยะนี้โปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูป protoxin ที่ละลายได้ในกระเพาะส่วนกลางของแมลงที่มีสภาพเป็นต่างจากนั้น protoxin จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60-70 ดาลตัน จากรายงานของ Hofte and Whiteley (1989) พบว่าการย่อย protoxin สามารถย่อยได้ด้วยโปรติเอสหลายชนิดในหลอดทดลอง

บทที่ 4 คุณสมบัติทางชีวโมเลกุลของ *Bacillus thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงศัตรูผัก

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันการควบคุมศัตรูพืชโดยใช้ *Bacillus thuringiensis* (Bt) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ มีความจำเพาะสูงต่อแมลงเป้าหมาย สามารถควบคุมแมลงได้อย่างกว้างขวาง สามารถทดแทนการใช้สารเคมีได้เป็นอย่างดี ยีนที่ควบคุมการสร้าง delta-endotoxin ที่เป็นพิษต่อแมลงมีหลายชื่อได้แก่ ยีน delta-endotoxin , ยีน crystal protein (cry) และยีน insecticidal crystal protein (icp) ในปี 1993 Chilcot and Wigley จำแนกชนิดของยีน cry โดยใช้คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา ความเป็นพิษอย่างจำเพาะเจาะจงต่ออันดับของแมลง รูปร่างและขนาดของผลึกโปรตีนเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือยีน cry และยีน cyt ต่อมามีการพบผลึกโปรตีนจาก *B. thuringiensis* เพิ่มมากขึ้น วิธีการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติความเป็นพิษ รูปร่าง และขนาดของผลึกโปรตีนไม่สามารถจำแนกชนิดของยีน cry ได้อย่างชัดเจน ดังนั้น Carozzi et al. (1991) ในปี 1998 Crickmore et al. ได้ปรับปรุงระบบการเรียกชื่อยีน cry โดยอาศัยการกระจายตัวทางวิวัฒนาการ ความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับกรดอะมิโน และโปรแกรมทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ในการเรียกชื่อยีน ข้อมูลการจัดจำแนกสามารถสืบค้นได้จากเว็บไซต์ http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ และในปี 1993 Carlson and Klosto พบว่ายีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนใน *B. thuringiensis* อาจพบทั้งบนโครโมโซม และพลาสมิด ในบางสายพันธุ์พบว่ายีนดังกล่าวปรากฏเฉพาะบนโครโมโซม แต่ส่วนใหญ่จะพบอยู่บนพลาสมิด ยีน cry ส่วนใหญ่เป็น monocistronic คือ มีรหัสพันธุกรรมที่สร้างโปรตีนเพียงชนิดเดียว บางยีนอาจอยู่ในรูปของ polycistronic ได้

ในกลุ่มของยีน cry ยีน cryI มีบทบาทสำคัญในการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากยีน cryI มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera ซึ่งจัดเป็นแมลงที่มีชนิดมากที่สุดในกลุ่มแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ยีน cryI สร้างผลึกโปรตีนน้ำหนัก 130-140 กิโลดาลตัน สร้างผลึกรูปปิรามิดคู่ในระหว่างการสร้างสปอร์ของ *B. thuringiensis* ในระยะนี้โปรตีนดังกล่าวอยู่ในรูป protoxin ที่จะละลายได้ในกระเพาะส่วนกลางของแมลงที่มีสภาพเป็นต่างจากนั้น protoxin จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ซึ่งเป็นสารพิษที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60-70 ดาลตัน จากรายงานของ Hofte and Whiteley (1989) พบว่าการย่อย protoxin สามารถย่อยได้ด้วยโปรติเอสหลายชนิดในหลอดทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

4.1.1 การสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Harwood and Cutting (1990) โดยเฉพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน นำอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 2 มิลลิลิตรเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม lysis buffer ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายส่วนใส (supernatant) ทิ้ง แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เติมผง lysozyme จำนวน 0.002 กรัม ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 20% sarkosyl ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ แล้วเติม phenol:chloroform (24:1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม 3M sodium acetate pH 5.2 0.1 เท่าของปริมาตรและ absolute ethanol 2.5 เท่าของปริมาตร พลิกหลอดกลับไปมาช้าๆ แช่ใน -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน) เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร เติม Rnase ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำซ้ำตั้งแต่ขั้นตอนการเติม phenol จนละลายตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตรวจสอบปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

4.1.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Birnboim and Doly (1979) โดยเฉพาะเลี้ยง *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 คืน นำเซลล์ *B. thuringiensis* 2 มิลลิลิตรเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำฟอสเฟอรัส TSE ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติม solution A ที่มี egg white lysozyme (เตรียมเมื่อจะใช้) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนเซลล์แตก (นานประมาณ 30 นาทีหรือสารละลายขุ่น) แล้ววางบนน้ำแข็ง เติม solution B (เตรียมเมื่อจะใช้) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 4 นาที แล้วเติม solution C (ที่เย็น) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ตูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol:chloroform 1:1 จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 นาที ตูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ตูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol ผสมให้เข้ากันและเก็บในน้ำแข็ง 20 นาที (ถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนให้เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน) นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol ทำตะกอนให้แห้งภายใต้สุญญากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE 50 ไมโครลิตรนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตรวจสอบปริมาณด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต และเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *cry* จาก *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 โดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกลุ่ม *cry* โดยใช้ไพรเมอร์ที่แสดงดังตารางที่ 4.1 เอนไซม์ DNA polymerase และเครื่อง Thermal cycl โดยเติมน้ำฟอสเฟอรัสเฉพาะสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR buffer) 1X, dNTPs mix ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สารละลายดีเอ็นเอ

ต้นแบบจากโครโมโซมดีเอ็นเอ (พลาสมิด) ของ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วย สุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง denaturation 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ, denaturation 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing 45 องศาเซลเซียส 45 วินาที extension 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และ extension 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ DNA marker *Lambda HindIII / EcoRI* (บริษัท Fermentus, Lithuania) หรือ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus, Lithuania)

4.3 การหาลำดับเบสของยีน *cry* gene ที่พบใน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590

นำผลิตภัณฑ์อุณหภูมิสูงที่ได้ออกจากการทำ PCR ในข้อ 4.2 มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ pure PCR NucleoSpin kit (Macherey Nagel, Germany) แล้วทำการเชื่อมชิ้นดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอพาหะ pGem-T Easy Vector (บริษัท Promega, USA) ได้รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ ถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* DH5 α จากนั้นนำ *E. coli* DH5 α ที่มีรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอไปเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มี ampicilline, x-gal และ IPTG บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน เมื่อได้โคโลนี นำโคโลนีมาตรวจสอบการมีอยู่ของรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอโดยวิธีปฏิกิริยาอุณหภูมิสูงและปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

นำโคโลนีที่ตรวจสอบพบชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการไปหาลำดับเบส โดยส่งวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (BSU) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กรุงเทพฯ

4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *crystal protein* ที่พบใน *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590

นำลำดับเบสที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ที่หน่วยบริการชีวภาพมาเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ของหน่วยงาน National Institute of Health (NIH) ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยโปรแกรม BLAST-N และ BLAST-X เพื่อตรวจสอบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูล เพื่อระบุชนิดของยีนที่พบ

ตารางที่ 4.1 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *cry*

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
5' end of <i>cry</i> gene	K5Un3 (CAATGCGTACCTTACAATTGTTTAAAGTATT)	K3Un3(CCTCCTGTAAATCCTGGTCCT)
3' end of <i>cry</i> gene	K5Un2 (AGG ACCAGGATTACAGGAGG)	K3Un2 (GCTGTGACACGAAGGATATAGCCA)
<i>cry</i> 1Aa	1Aa (TTCCCTTTATTGGGAATGC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1Ab	1Ab(CGGATGCTCATAGAGGAGAA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1Ac	1Ac (GGAACTTTCTTTTAAATGG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1Ad	1Ad (ACCCGTACTGATCTCAACTA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1Ae	1Ae (CTCTACTTTTATAGAAACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1B	1B (GGCTACCAATACTTCTATTA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1C	1C (ATTTAATTACGTGGTGTG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1D	1D (CAGGCCTTGACAATTCAAAT)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1E	1E (TAGGGATAAATGTAGTACAG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1F	1F (GATTTCAGGAAGTGATTCAT)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1G	1G (GCTTCTCTCCAAACAACG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1H	1H (ACTCTTTTCACACCAATAAC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1I	V(+)(ATGAACTAAAGAATCCAGA)	V(-) (AGGATCCTTGTTGAGATA)
<i>cry</i> 1J	1J (GCGCTTAATAATATTCACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 1K	1K (TGATATGATATTCGTAACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
<i>cry</i> 2A	II(+)(TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT)	II(-) (AACTCCATCGTTATTTGTAG)
<i>cry</i> 9A	9Ad(GTTGATACCCGAGGCACA)	9Ar(CCGCTTCCAATAACATCTTTT)
<i>cry</i> 9B	9Bd(CTATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC)	9Br(CCGCTTCCAATAACATCTTTT)
<i>cry</i> 9C	9Cd(CTGGTCCGTTCAATCC)	9Cr(CCGCTTCCAATAACATCTTTT)
<i>cry</i> 9D	(CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT)	(CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC)
<i>cry</i> 5	(TAAGCAAAGCGGTAACTC)	(GCTCCCTCGATGTCAATG)
<i>cry</i> 12	(CTCCCCAACATTCCATCC)	(AATTACTTACACGTGCCATACCTG)
<i>cry</i> 13A	<i>cry</i> 13A(d)(CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA)	<i>cry</i> 13A(r)(TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC)
<i>cry</i> 14	(ATAATGCGCGACCTACTGTTGT)	(TGCCGTTATCGCCGTTATT)

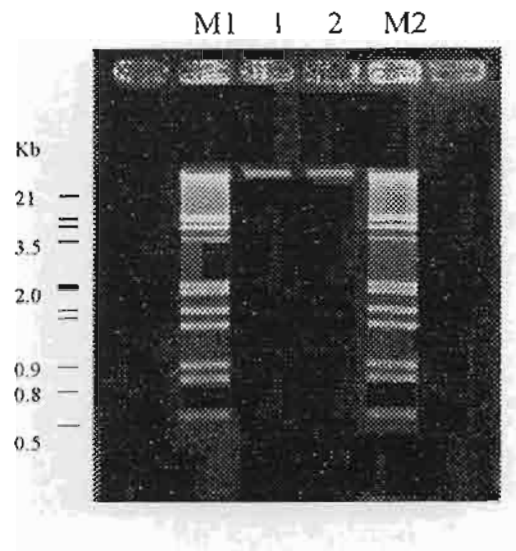
หมายเหตุ M แทน A หรือ C, D แทน A G หรือ T, Y แทน T หรือ C, K แทน G หรือ T, R แทน A หรือ G

ที่มา : Juarez-Perez *et al.* (2003)

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การสกัดพลาสมิดและโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590

ในการวิจัยนี้ได้เลือกศึกษา *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนใยผัก ที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera ได้ดีเทียบได้กับสายพันธุ์ทางการค้า (จริยา และคณะ, 2544) โดยศึกษายีน *cry1* เป็นหลัก เนื่องจากว่า ยีน *cry1* เป็นยีนที่สร้างผลึกโปรตีน Cry1 ที่มีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อ โดยเลี้ยง *B. thuringiensis* สายพันธุ์ JC150 และสายพันธุ์ JC590 แล้วสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Harwood and Cutting (1990) และสกัดพลาสมิดซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Birnboim and Doly (1979) จากภาพที่ 4.1 และ 4.2 เมื่อตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า โครโมโซมดีเอ็นเอเกิดแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว แต่พลาสมิดเกิดแถบดีเอ็นเอมากกว่าหนึ่งแถบ แสดงว่า พลาสมิดมีการฉีกขาดของดีเอ็นเอบางส่วนทำให้เกิดลักษณะของดีเอ็นเออย่างน้อย 3 แบบ กล่าวคือ แบบที่ 1 ลักษณะสายคู่วงแหวนปิดขดตัวซ้อนทับกันในรูป supercoiled ซึ่งเป็นลักษณะของโครโมโซมดีเอ็นเอ และพลาสมิดของแบคทีเรียที่สกัดได้อย่างสมบูรณ์ไม่มีการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ แบบที่ 2 ลักษณะสายคู่วงแหวนเปิด ซึ่งเป็นลักษณะของพลาสมิดที่มีการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ 1 สาย และแบบที่ 3 ลักษณะสายคู่เส้นตรง ซึ่งเป็นลักษณะของพลาสมิดที่มีการฉีกขาดของสายดีเอ็นเอ 2 สาย (Surzycki, 1999) นำโครโมโซมดีเอ็นเอและ พลาสมิดที่สกัดได้มาศึกษาการเกิด cross contamination ระหว่างกัน โดยเทคนิค PCR ด้วยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ (Mullins, 1993) พบว่าไม่เกิดการปนเปื้อนกันระหว่างโครโมโซมดีเอ็นเอและพลาสมิด



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของพลาสมิดและโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis*
สายพันธุ์ JC150

เลน M1 และ M2 คือดีเอ็นเอมาตรฐานแลมด้าดีเอ็นเอตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
HindIII และ *EcoRI*

เลนที่ 1 พลาสมิดที่สกัดได้จากการตัดแปลงวิธีของ Birnboim and Doly

เลนที่ 2 โครโมโซมสกัดที่ได้จากการตัดแปลงวิธีของ Harwood and Cutting