ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

กีฏวิทยา	กีฏวิทยา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง ความหลากหลายของ *Bacillus thuringiensis* ในจังหวัดกระบี่
และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Krabi Province
and Their Efficiencies in Insect Pest Control

นามผู้วิจัย นางสาวประกาย เทพหาร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ ....
(รองศาสตราจารย์จริยา จันทร์ไพแสง, Ph.D.)

กรรมการ ....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

กรรมการ ....
(อาจารย์สุรางค์ สุธิราวุธ, Dr.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา ....
(อาจารย์สุรเชษฐ จามรมาน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

....
(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 21 **เดือน** กุมภาพันธ์ **พ.ศ.** 2549

วิทยานิพนธ์

ความหลากหลายของ *Bacillus thuringiensis* ในจังหวัดกระบี่ และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Krabi Province and Their Efficiencies in Insect Pest Control

โดย

นางสาวประกาย เทพหาร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-9844-90-4

ประกาย เทพหาร 2549: ความหลากหลายของ *Bacillus thuringiensis* ในจังหวัดกระบี่และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ จริยา จันทร์ไพแสง, Ph.D. 128 หน้า

ISBN 974-9844-90-4

แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกสร้างสารพิษที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงในรูปผลึกโปรตีน ความหลากหลายของสารพิษในผลึกโปรตีนทำให้ *B. thuringiensis* สามารถฆ่าแมลงได้หลายชนิดจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมี ในการวิจัยนี้ได้ศึกษาถึงความหลากหลายของ *B. thuringiensis* โดยเก็บตัวอย่างดินจาก เขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่ พบตัวอย่างที่มี *B. thuringiensis* 32 ตัวอย่างจากตัวอย่างดินทั้งหมด 91 ตัวอย่าง จำแนกได้ว่าเป็น *B. thuringiensis* 121 ไอโซเลทจากแบคทีเรียที่ตรวจสอบ 859 ไอโซเลท *B. thuringiensis* ทุกไอโซเลทนำมาทดสอบหาประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก โดยการทดสอบขั้นแรกด้วยสารแขวนลอยของสปอร์และผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* คัดเลือกไอโซเลทที่ทำให้หนอนผีเสื้อทั้ง 3 ชนิดตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้ 61 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สอง โดยใช้ความเข้มข้นของสารแขวนลอยสปอร์ และผลึกโปรตีนที่ความเข้มข้น 10^3 10^5 และ 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร ได้ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JCPT7, JCPT16, JCPT18, JCPT64, JCPT68, JCPT74 และ JCPT89 นำมาวิเคราะห์ชนิดของยีน *cry* ที่มีผลต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera ได้แก่ยีนในกลุ่ม *cry*I, *cry*II และ *cry*V ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส จากการตรวจสอบยีน *cry* บนโครโมโซมของทั้ง 7 ไอโซเลท พบยีน *cry* จำนวน 8 ชนิด โดยจัดอยู่ในกลุ่มยีน *cry*I จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ยีน *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*9A, *cry*9B และในกลุ่มยีน *cry*II 1 ชนิด คือ *cry*2A ขณะที่บนพลาสมิดของ 7 ไอโซเลท พบยีนในกลุ่ม *cry*I จำนวน 6 ชนิด คือยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I และในกลุ่ม *cry*II คือ *cry*2A จากข้อมูลข้างต้นนี้ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการนำ *B. thuringiensis* ที่แยกได้ในประเทศไทยไปศึกษาเพิ่มเติม และพัฒนาให้มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ทดแทนสารเคมีในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

ประกาย เทพหาร	จริยา จันทร์ไพแสง	14 / ก.พ. / 2006
ลายมือชื่อนิสิต	ลายมือชื่อประธานกรรมการ	

Prakai Thaphan 2006: Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Krabi Province and Their Efficiencies in Insect Pest Control. Master of Science (Agriculture), Major Field: Entomology, Department of Entomology. Thesis Advisor: Associate Professor Jariya Chanpaisaeng, Ph.D. 128 pages.
ISBN 974-9844-90-4

Bacillus thuringiensis is a gram-positive soil bacterium characterized by its ability to produce crystal protein during sporulation. The diversity of *B. thuringiensis* insecticidal protein that is effective against a range of important pests makes *B. thuringiensis* the most interesting microbial insecticidal alternative to chemical agent. In this research, we collected soil samples from national park and wildlife sanctuary in Krabi province. *B. thuringiensis* were detected in 32 soil sample from 91 samples. From a total of 859 bacterial colonies, 121 isolates were identified as *B. thuringensis.* All isolates of *B. thuringiensis* were screened for their insecticidal activity against *Spodoptera litura, S. exigua* and *Plutella xylostella.* The preliminary test using spore - crystal suspension showed two level of mortality at 100% and lower. Sixty-one isolates that demonstrated their toxicity at 100% of mortality were selected for final screening test using spore-crystal mixture at the concentrations of 10^3, 10^5 and 10^7 cfu/ml. Seven isolates of *B. thuringiensis* named JCPT7, JCPT16, JCPT18, JCPT64, JCPT68, JCPT74 and JCPT89 were chosen due to their highly toxicity to *P. xylostella* . The detection of *cry* gene of these isolates was done by a method based on polymerase chain reaction (PCR). The PCR result indicated that *cry*1 named *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*9A, *cry*9B and *cry*2 named *cry*2A were on chromosome and *cry*1 named *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, and *cry*2 named *cry*2A were on plasmid DNA. This study introduced the promising *B. thuringiensis* isolates collected from soil samples which could be developed as the effective biocontrol agent for Lepidoptera pest in the future.

P. Thaphan
Student's signature

J. Champaisaeng 14 / 02 / 2006
Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์จริยา จันทร์ไพแสง ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษาที่ให้การอบรมสั่งสอน คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำ รวมทั้งความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษาวิจัยและการตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์สุรางค์ สุธิราวุธ กรรมการที่ปรึกษาวิชารองที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ศรีสม สุวรรณวงศ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้เพื่อความสมบูรณ์แห่งวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนาวงศ์ ที่ช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการเก็บตัวอย่างดิน และขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิประสาทวิชาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้ทุนพัฒนาอาจารย์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในความต้องการของวิทยาเขตกระบี่

ขอขอบคุณภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร และภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆน้องๆ ภาควิชากีฏวิทยาและภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้การต้อนรับ และความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความอบอุ่นและกำลังใจ ขอขอบคุณคุณชุมพล ราชณุวงษ์ และคุณสุพจน์ เอื้อวงศ์ ที่คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษาและให้การสนับสนุนทุกอย่างเป็นอย่างดี

ประกาย เทพหาร

ตุลาคม 2548

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	36
อุปกรณ์	36
วิธีการ	40
ผลและการวิจารณ์	45
สรุป	86
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ภาคผนวก	102
ภาคผนวก ก	103
ภาคผนวก ข	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่จำแนกตาม H-serotype	12
2	การเรียกชื่อยีน *cry* และ*cyt* ระบบใหม่เทียบกับชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบเดิม	23
3	รายชื่อ toxin-protein ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของยีน *cry*	35
4	ไพร์เมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน *cry*	39
5	แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน พิกัด ตำแหน่งเก็บ และจำนวนตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่	46
6	แสดงจำนวนโคโลนีที่นำมาตรวจสอบและค่า Bt indexของ *Bacillus thuringiensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่	47
7	การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามลักษณะรูปร่าง และรูปแบบการอยู่ร่วมกันของสปอร์และผลึกโปรตีน	52
8	การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)	57
9	การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)	58
10	การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*)	59
11	ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})	60
12	ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})	62
13	ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})	64

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบบนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่แยกได้จากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าและเขตห้ามล่าสัตว์ป่า ในจังหวัดกระบี่	69
15	ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบบนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ของไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่แยกได้จากป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่	70

ตารางผนวกที่		
ข1	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม	106
ข2	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล อ.เกาะลันตา	107
ข3	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากสวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้	109
ข4	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากสวนอุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี	111
ข5	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากหน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง อ.ปลายพระยา	112
ข6	พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	114
ข7	จำนวนหนอนกระทู้ผัก(*Spodoptera litura*) ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง	116
ข8	จำนวนหนอนกระทู้หอม(*Spodoptera exigua*)ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง	121
ข9	จำนวนหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง	126

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่		หน้า
1	แสดงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่	37
2	แสดงพื้นที่พื้นที่เก็บตัวอย่างดินจากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่	38
3	ลักษณะรูปร่าง และการอยู่ร่วมกันของสปอร์ และผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis* ที่แยกได้	53
4	โครโมโซมดีเอ็นเอของ *Bacillus thuringiensis* ที่สกัดได้จากการดัดแปลงวิธีของ Harwood and Cutting (1990)	66
5	พลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ที่สกัดได้จากการดัดแปลงวิธีของ Birnboin and Doly (1979)	67
6	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac และ *cry*1Ad บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	74
7	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Ae, *cry*1B, *cry*1C และ *cry*1D บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	75
8	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G และ *cry*1H บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	76
9	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1I, *cry*1J, *cry*1K และ *cry*2A บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	77
10	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*9A , *cry*9B, *cry*9C และ *cry*9D บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	78
11	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*5, *cry*12, *cry*13A และ *cry*14 บนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	79
12	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac และ *cry*1Ad บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	80
13	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Ae, *cry*1B, *cry*1C และ *cry*1D บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	81

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G และ *cry*1H บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	82
15	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1I, *cry*1J, *cry*1K และ *cry*2A บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	83
16	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*9A, *cry*9B, *cry*9C และ *cry*9D บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	84
17	ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*5, *cry*12, *cry*13A และ *cry*14 บนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR	85

ความหลากหลายของ *Bacillus thuringiensis* ในจังหวัดกระบี่ และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Diversity of *Bacillus thuringiensis* in Krabi Province and Their Efficiencies in Insect Pest Control

คำนำ

ในปัจจุบันการกำจัดศัตรูพืชทำได้หลายวิธี นอกจากการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแล้ว การใช้จุลินทรีย์ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการควบคุมแมลงมีหลายกลุ่ม ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย เชื้อรา และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์ ของจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในทางการเกษตร อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียและชื่อว่า *Bacillus thuringiensis* (Ferre *et al*., 1995) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมแมลงทั้งใน ทางการเกษตร ป่าไม้ และ สาธารณสุข (Lambert and Peferoen, 1992) เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย ไม่มีพิษตกค้างจึงปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม สามารถใช้ร่วมกับการป้องกำจัดศัตรูพืชวิธีอื่น เช่นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เชื้อรา และสารเคมีบางชนิด

Bacillus thuringiensis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบได้ทั่วไป เช่น ดิน เศษซากพืช และซากสัตว์รวมไปถึงบริเวณผิวใบพืช (Ohba and Aizawai, 1978) ในระยะที่สร้างสปอร์จะสร้างผลึกโปรตีนหรือ delta-endotoxin ที่มีฤทธิ์ในการทำลายแมลงในกลุ่มผีเสื้อ แมลงวัน และด้วง การเข้าทำลายจะเกิดขึ้นหลังจากที่สภาพความเป็นด่างในกระเพาะอาหารแมลง (pH 10-12) ละลายผลึกโปรตีนให้เป็นสารพิษเข้าทำลายเซลล์บุกระเพาะอาหารให้บวมและแตกออก ส่งผลให้เซลล์ของ *B. thuringiensis* และสารพิษเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิต แมลงจะหยุดกินอาหารเป็นอัมพาต และตายในที่สุด (Rajamohan *et al*., 1996) ความสามารถในการเข้าทำลายจะถูกกำหนดโดยยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนหรือยีน *cry* ซึ่งยีน *cry* แต่ละกลุ่มมีขนาด และความสามารถในการทำลายแมลงได้แตกต่างกัน (Dulmage, 1981) โดยยีน *cry*I มีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในอันดับ (Order) Lepidoptera ซึ่งจัดเป็นกลุ่มแมลงที่เป็นศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังรวมไปถึงยีน *cry*2 ยีน *cry*5 ยีน *cry*12 ยีน *cry*13A และยีน *cry*14

ความหลากหลายของสารพิษที่สร้างโดย *B. thuringiensis* จะเพิ่มความสามารถในการเข้าทำลายแมลงได้หลายชนิด ส่งผลถึงการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับ *B. thuringiensis* มากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีการแยกและจำแนก *B. thuringiensis* และพบสายพันธุ์ใหม่จากดินในนาข้าว และเศษวัสดุพืชจากเขตป่าสมบูรณ์ในอุทยานแห่งชาติ (Chanpaisaeng *et al*., 1993: จริยาและคณะ, 2544) จุดประสงค์ในการศึกษานี้ มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงความหลากหลายของสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่พบในจังหวัดกระบี่ ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีสภาพภูมิประเทศอุดมสมบูรณ์ มีความชื้นตลอดทั้งปี โดยไอโซเลท *B. thuringiensis* ทั้งหมดที่ได้จะนำมาทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง จากนั้นนำมาตรวจหาชนิดของยีน *cry* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซโพลีเมอเรส ซึ่งอาจมีโอกาสได้สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่เป็นสายพันธุ์ไทยแท้ และมีประสิทธิภาพดีในการควบคุมศัตรูพืช

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาความหลากหลายของ *B. thuringiensis* ในเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่

2. ทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* ที่แยกได้กับแมลงศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ 3 ชนิดได้แก่ หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) หนอนกระทู้หอม (*S. exigua*) และหนอนใยผัก *(Plutella xylostella*)

3. ตรวจสอบยีน *cry* ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction , PCR)

การตรวจเอกสาร

1. ประวัติการศึกษา *Bacillus thuringiensis*

ในปี ค.ศ. 1915 Berliner ได้ค้นพบ *Bacillus thuringiensis* เป็นครั้งแรกที่เมือง Thuringia ประเทศเยอรมันนี โดยการแยกเชื้อจากหนอนผีเสื้อ Mediteranian flour moth (*Ephestia kuhniella*) จึงตั้งชื่อสปีชีส์ว่า thuringiensis ตามชื่อเมืองที่พบ แต่เชื้อนี้ได้ถูกค้นพบโดย Ishiwata ตั้งแต่ปี ค.ศ.1902 โดยการแยกแบคทีเรียจากหนอนไหมที่เป็นโรคท้องร่วง และตั้งชื่อเชื้อที่พบว่า *Bacillus sotto* แต่ Ishiwata ได้จดบันทึกสั้นและไม่สมบูรณ์เมื่อเทียบกับการบันทึกของ 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

ในปี 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) แบคทีเรียนี้ได้รับความนิยมในการกำจัดแมลงศัตรูพืชมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อ E.A Steinhaus นำ *B. thuringiensis* ฉีดพ่นในแปลงอัลฟาฟาเพื่อควบคุมหนอนอัลฟาฟา (alfalfa caterpillars) ทำให้จำนวนของหนอนลดลงจนต่ำกว่าระดับเศรษฐกิจ ภายในระยะเวลาอันสั้น พร้อมทั้งศึกษาถึงความปลอดภัยกับสภาพแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ จนเป็นที่ยอมรับ และมีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดนี้มากขึ้น

สายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่มีศักยภาพสูงสุด คือสายพันธุ์ *kurstaki* ที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อ Mediteranian flour moth ในปี ค.ศ. 1962 ที่ประเทศฝรั่งเศส (Dulmage and Aizawa, 1982) และปี ค.ศ. 1967 ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา Dulmage แยกเชื้อจากหนอนเจาะสมอสีชมพู (*Pectinophora gossypiella)* ได้สายพันธุ์ HD-1 (Dulmage, 1970) ส่งผลให้มีการค้าขายผลิตภัณฑ์

B. thuringiensis ของหลายบริษัทรวมถึงบริษัท Abbott ที่ขายผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* สายพันธุ์ HD-1 ที่มีศักยภาพสูงโดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Dipel และสายพันธุ์นี้ยังคงมีสารออกฤทธิ์สำคัญในผลิตภัณฑ์ *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)* ในปีค.ศ. 1983 นำมาทดสอบพบว่าเกิดพิษค่อนข้างรุนแรงกับตัวอ่อนด้วงวงศ์ Chysomelidae และในปี ค.ศ. 1990 สายพันธุ์นี้ถูกนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ *B. thuringiensis* ที่มีพิษต่อด้วงจำหน่ายในสหรัฐอเมริกา เพื่อใช้ควบคุมตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle (Chilcott and Wigley, 1994) การศึกษา *B. thuringiensis* ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน มีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่มากขึ้น โดยมีฤทธิ์กับแมลงนอกเหนือจากกลุ่มหนอนผีเสื้อ หนอนด้วง เช่น มีฤทธิ์ต่อหนอนแมลงวัน แมลงในอันดับ Hymenoptera และ Mallopaga (Rajamohan *et al*., 1998)

2. <u>สัณฐานวิทยาของ *Bacillus thuringiensis*</u>

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) ลักษณะของโคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5.0 -10.0 มิลลิเมตร) กลม บางชนิดรูปร่างไม่แน่นอน ในช่วงของการเจริญเติบโตจะสร้างสปอร์ (endospore) และผลึกโปรตีนในด้านตรงข้ามกันของเซลล์ โดยสปอร์จะมีความคงทนในสภาพธรรมชาติ (Buchanan and Bibbon, 1974)

ผลึกโปรตีนสามารถเห็นได้ชัดเจนภายใต้กล้อง phase contrast microscopy โดยมีรูปร่างปิรามิดคู่ (bipyramidal shape) ซึ่งมีขนาด 130 กิโลดาลตัน แต่ในบางสายพันธุ์จะสร้างผลึกโปรตีนรูปกลม (spherical shape) หรือรูปลูกบาศก์ (cubiodal 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)

3. <u>การคงอยู่ในดินของ *Bacillus thuringiensis*</u>

สารอาหารที่มีอยู่ในดิน เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของ *B. thuringiensis* (West *et al*., 1985) จากการศึกษาถึงธาตุอาหารที่มีผลต่อการสร้างผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* พบว่า sucrose lactose และ inulin จะช่วยสนับสนุนการสร้างสปอร์โดยแหล่งคาร์โบไฮเดรตของ *B. thuringiensis* ได้แก่หางนม และกากน้ำตาล ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างผลึกโปรตีนขณะที่ glycerol glucose maltose dextrin และแป้ง จะทำให้มีการสร้างผลึกโปรตีนน้อย สำหรับแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ peptone ที่เป็นแหล่งสนับสนุนที่ดีที่สุดในการสร้างผลึกโปรตีน และสปอร์ (Içgen *et al*. 2002)

การคงอยู่ในดินของ *B. thuringiensis* และผลึกโปรตีนได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อม ซึ่งได้แก่ ปัจจัยทางกายภาพเช่น แสงแดด อุณหภูมิ และความชื้น (Leong *et al*., 1980) แต่ Kinslinger and McGaughey (1979) ได้รายงานว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อการอยู่รอดของ *B. thuringiensis* แต่จะมีผลต่อการงอกของสปอร์ และทำให้ความสามารถในการคงอยู่ของ *B. thuringiensis* ในโรงเก็บเมล็ดพันธุ์พืชลดลง ตามปกติสปอร์ของ *B. thuringiensis* สามารถมีชีวิตยาวนานได้ในดิน โดยมีอายุประมาณ 100-200 วัน (Hansen *et al*., 1996) ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจะมีผลต่อการงอก และการอยู่รอดของสปอร์เช่น การฉีดพ่น *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* ในแปลงทดลองกะหล่ำปลี พบว่าจำนวนสปอร์ของ *B. thuringiensis* บนผิวใบจะมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 16 โมง ขณะที่บนผิวดินมีการคงอยู่นานกว่าโดยมีครึ่งชีวิตเท่ากับ 100 วัน (Pedersen *et al*., 1995) นอกจากนี้สภาพทางเคมีของผิวใบพืช เช่น ระดับของ pH ที่เป็นกรด หรือการมีเอนไซม์ protease หรือ allelochemical จะทำให้เกิดการสลายตัวของผลึกโปรตีน (Burges and John, 1998)

B. thuringiensis มีการกระจายตัวอย่างกว้างขวางในหลายพื้นที่ ตามที่นักวิทยาศาสตร์หลายท่านได้รายงานไว้ เช่น Martin and Traver (1989) ได้แยก *B. thuringiensis* จากตัวอย่างดินทวีปอัฟริกา เอเชีย ยุโรป อเมริกาใต้ และเกาะใกล้เคียง พบ *B. thuringiensis* ทั้งหมด 27,000 ไอโซเลทซึ่งได้มาจากดิน 1000 ตัวอย่าง นอกจากนี้มีผู้ทำการสำรวจ *B. thuringiensis* จากหลายๆประเทศ เช่น ปากีสถาน (Khan *et al*., 1995) บังกลาเทศ (Hossain *et al*., 1997) สเปน (Iriarte *et al*., 1998) สวีเดน (Landen *et al*., 1994) อัฟริกา (Zelazny *et al*., 1994) อินโดนีเซีย (Hastowo *et al*., 1992) จีน (Chang *et al*., 1994) และญี่ปุ่น (Ohba and Aizawa, 1986) เป็นต้น

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาถึงการกระจายตัวตามธรรมชาติของ *B. thuringiensis* โดยมีการแยกจาก ตัวอย่างดิน รำข้าว และหนอนกอข้าวที่เก็บจากพื้นที่ปลูกข้าวทั่วประเทศ รวบรวมได้ทั้งหมด 299 ไอโซเลท จัดจำแนกได้ 14 serotype ได้แก่ *kurstaki, alesti, kenyae, galleriae, canadensis, entomocidus, aizawai, kumamotoensis, tochigiensis, toworti, neoleonensis, mexicanensis, leesis* และสายพันธุ์ใหม่ 1 ไอโซเลทคือ *chanpaisis* (Chanpaisaeng *et al*., 1993) ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 จริยา และคณะ ได้แยก *B. thuringiensis* จากตัวอย่างดิน และเศษวัสดุพืชที่รวบรวมจากเขตป่าสมบูรณ์ในอุทยานแห่งชาติทั่วประเทศ ทั้งหมด 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)

4 . <u>สารพิษที่สร้างโดย *Bacillus thuringiensis*</u>

B. thuringiensis สามารถสร้างสารพิษในการป้องกันกำจัดแมลงได้หลายชนิดโดยแบ่งสารพิษออกเป็นกลุ่มดังนี้

1. Alpha exotoxin (α-exotoxin) หรือ lecithinase C หรือ phospholipase C โดยมีรายงานเกี่ยวกับ alpha exotoxin ครั้งแรกในปี ค.ศ.1959 ว่าเป็นเอนไซม์ที่ละลายได้ในน้ำ ทนความร้อน สามารถย่อยสลายเซลล์ทุกชนิดและเป็นพิษกับแมลงเมื่อได้รับพิษโดยการกินเข้าไป สารพิษนี้ *B. thurigiensis* สร้างขึ้นขณะที่เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ แล้วขับออกนอกเซลล์ มีรายงานว่าเป็นพิษกับหนูและหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (Dulmage, 1981)

2. Beta-exotoxin (β-exotoxin) หรือ thuringiensin, thermostable toxin, fly toxin เป็นสารประกอบ จำพวกอะดีนินนิวคลีโอไทด์ (Aronson *et al*., 1986) ทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำหน้าที่ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (Beebee and Bond, 1973) มีพิษค่อนข้างสูงกับแมลงหลายอันดับคือ Lepidoptera Diptera Hymenoptera Hemiptera Isoptera และOrthoptera สารพิษ Beta-exotoxin ไม่สามารถผ่านผนังกระเพาะอาหารของแมลงได้ เพราะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ phosphatases ในกระเพาะอาหารของแมลง (Mac Connell, 1959) เมื่อแมลงได้รับพิษนี้ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยเฉพาะส่วนของปาก หนวด และปีก โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะพบในระยะลอกคราบ ดักแด้ และในขณะที่มีการเจริญเติบโต (Tanada and Kaya, 1993)

3. Delta-endotoxin (δ-endotoxin) เป็นสารพิษที่ไม่ทนต่อความร้อน (heat labile) สร้างในช่วงที่เซลล์มีการสร้างกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) และพร้อมที่จะสร้างสปอร์ (Heimpel, 1963) รูปร่างของผลึกโปรตีนสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคกับกลุ่มของแมลง เช่น ปิรามิดคู่มีผลในการควบคุมหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera ในขณะที่รูปกลม และรูปลูกบาศก์ มีผลในการควบคุมแมลงในอันดับ Lepidoptera และ Diptera (Tanada and Kaya, 1993) ผลึกโปรตีนประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีนเกาะกันเป็นรูปดัมเบลล์ยาว 15 นาโนเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุล 230,000 ดาลตัน และประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 1 สาย หรือหลายๆ สาย โดยมีขนาดตั้งแต่ 120 จนถึง 160 กิโลดาลตัน ซึ่ง 20-30 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่เกิดขึ้นในระยะสร้างสปอร์จะถูกนำมาสร้างผลึกโปรตีน (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 สภาพที่เป็นด่างจะสลายผลึกโปรตีน เกิดการทำลายพันธะ disulfide จากนั้นปล่อย protoxin ออกมา นอกจากนี้การสลายผลึกโปรตีนเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ protease เช่น trypsin และ chymotrypsin ที่อยู่ในกระเพาะอาหารของแมลง (Bouciaus and Pendland, 1974)

4. Gamma exotoxin เป็นสารพิษที่ไม่ทนความร้อน สลายตัวได้ง่ายเมื่อสัมผัสอากาศออกซิเจน และแสงแดด พบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส สารพิษนี้จะสลายตัวภายใน 10-15 นาที กลไกในการเข้าทำลายแมลงยังไม่เป็นที่รู้กันแน่ชัด (ทิพย์วดี, 2535)

5. Louse-factor เป็นสารพิษที่มีลักษณะคล้ายผงแป้ง ที่เป็นส่วนประกอบของสปอร์และผลึกโปรตีนของ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (HD-1) ซึ่งสายพันธุ์นี้ไม่สร้าง Beta-exotoxin สารพิษชนิดนี้ แสดงความเป็นพิษต่อเหาที่อาศัยอยู่กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 4 ชนิดได้แก่ *Bovicola bovis*, *B. crassipes*, *B. limbata* และ *B. ovis* (Heimpel, 1963)

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)

5. กลไกการเข้าทำลายแมลงของ *Bacillus thuringiensis*

เมื่อแมลงได้รับผลึกโปรตีน สภาพความเป็นด่างในกระเพาะอาหารจะสลายผลึกโปรตีนได้ protoxin และน้ำย่อยโปรตีน (protease) จะย่อย protoxin ได้สารพิษ เข้าทำลายเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร โดยกลไกการเข้าทำลายแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ทำให้เกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร (gut paralysis) และทำให้เกิดอัมพาตทั่วตัว (general paralysis)

1. การเกิดอัมพาตที่กระเพาะอาหาร แมลงจะแสดงอาการหลังจากที่มีการย่อยผลึกโปรตีน เนื่องจากกระเพาะอาหารของแมลงถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้แมลงหยุดกินอาหาร อาเจียน ท้องเสีย แมลงจะตายภายใน 24-48 ชั่วโมง ในกรณีของแมลงที่ได้รับพิษน้อยสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติภายใน 1-2 วันหลังจากได้รับผลึกโปรตีนเข้าไป ในช่วงที่เป็นอัมพาตนี้สปอร์ของแบคทีเรียจะงอกและเจริญเป็นเส้นใยแทงทะลุไปยังช่องว่างลำตัวแมลง (Burges and Hussey, 1971)

2. การเกิดอัมพาตทั่วตัว เนื่องจากเกิดรอยแยกของผนังบุกระเพาะอาหาร ทำให้อาหารของเหลว และเอนไซม์ต่างๆ ที่มีอยู่ภายในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสภาพเป็นด่างไหลมาปะปนกับน้ำเลือดในช่องว่างของลำตัวแมลงซึ่งมีสภาพเป็นกรด เกิดความไม่สมดุลของระดับโพแทสเซียม

อิออน (K^+) และเลือดมีความเป็นด่างมากขึ้น ทำให้แมลงหยุดกินอาหาร เคลื่อนไหวเชื่องช้า เป็นอัมพาต และตายในที่สุด *B. thuringiensis* บางสายพันธุ์ที่สร้าง exotoxin ที่ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว ด้วยอาการที่เรียกว่า toxemia สารพิษแต่ละชนิด มีกลไกในการทำลายแมลงต่างกัน ในแมลงบางชนิดสารพิษที่ได้จาก *B. thuringiensis* จะไม่เป็นอันตรายแต่เมื่อผ่านเข้าสู่กระแสเลือด จะทวีจำนวนมากจนเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) (ทิพย์วดี, 2535; Knowles, 1993) ความแตกต่างระหว่างชนิดยีนที่ทำให้เกิดพิษ ปริมาณของยีนที่แสดงออก และคุณสมบัติของสารพิษที่สร้างขึ้นมาเหล่านี้ล้วนมีอิทธิพลต่อความรุนแรง และการแสดงความเป็นพิษของ *B. thuringiensis* (Burges and Hussey, 1971)

6. <u>การจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis*</u>

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* โดยการทำปฏิกิริยาของ antibody ที่มีต่อ flagellin แล้วแยกสายพันธุ์ต่างๆนี้ออกเป็น H-serotype วิธีนี้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงและน่าเชื่อถือ ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ทั้งหมด 69 serotypes และทำการแบ่งย่อยออกเป็น 81 serovars (Lecadet, 1999) ซึ่งแสดงไว้ที่ตารางที่ 1 ต่อมามีการจำแนก *B. thuringiensis* โดยวิเคราะห์เอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ที่สกัดได้จากเซลล์ในขณะเจริญเติบโต (vegetative cell) โดยการใช้ starch-gel electrophoresis ซึ่งรูปแบบของเอสเตอเรส สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้อย่างชัดเจนโดยมีความสอดคล้องกับการจำแนกโดยใช้ปฏิกิริยาของ antibody อย่างไรก็ตาม การจำแนกโดยวิธีนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการก่อโรคของ *B. thuringiensis* ที่นำมาทดสอบ (Norris and Burges , 1963)

วิธีการจำแนกโดยการใช้เทคนิคการตรวจหาดีเอ็นเอจากโคโลนีของแบคทีเรีย (colony hybridization) เป็นการถ่ายโอนโคโลนีของแบคทีเรียจากจานเลี้ยงเชื้อไปสู่แผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) นำไป hybridize กับโพรบ (probe) เพื่อหาตำแหน่งของโคโลนีที่มียีนนั้นอยู่ (สุรินทร์, 2543) วิธีนี้ใช้ครั้งแรกในการหา clone DNA ที่อยู่ใน *Escherichia coli* จากนั้นนำมาประยุกต์ใช้ในการแยก *B. thuringiensis* ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่เหมาะในการคัดเลือก *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. *gelechiae*, *B. thuringiensis* subsp. *thuringiensis*, *B.thuringiensis* subsp. *berliner* ซึ่งอยู่ใน serotype เดียวกัน พบว่าสายพันธุ์ *gelechiae* และ *berliner* มีตำแหน่งของยีนคล้ายกัน ขณะที่ตำแหน่งของยีนระหว่างสายพันธุ์ *thuringiensis* และ *gelechiae* มีความแตกต่างกันมาก

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่จำแนกตาม H-serotype

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

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

ตารางที่ 1 (ต่อ)

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

[a] รวมทั้ง *B. thuringiensis* subsp. *gelechiae*, *B. thuringiensis* subsp. *insectus* และ *B. thuringiensis* subsp. *berliner*

[b] *tenebrionis* มีการจำแนกเป็น *B. thuringiensis* subsp. *sandiego* (Krieg *et al.*, 1987)

[c] *B. thuringiensis* subsp. *caucasicus* อยู่ในกลุ่ม H10a โดย Afrikyan และ Chil Akopyan ในปี ค.ศ. 1980โดยสายพันธุ์นี้แยกครั้งแรกจากหนอนไหมในปี ค.ศ. 1961 ในประเทศอาร์เมเนีย

ที่มา: Lecadet *et al.*, (1999)

7. <u>การจัดจำแนกยีน *cry* (crystal protein gene)</u>

Hofte and Whitley (1989) ได้พัฒนาระบบอนุกรมวิธานในการตั้งชื่อยีนที่สร้างโปรตีนของ *B. thuringiensis* จัดออกเป็นกลุ่มโดยใช้ความแตกต่างของกรดอะมิโน และความสามารถในการทำลายแมลงแต่ละชนิด โดยแบ่งได้ดังนี้คือ

โปรตีน Cry I

โปรตีนCryI แบ่งออกเป็น 8 กลุ่มย่อยคือ CryIA-CryIH ประกอบด้วยโพลีเปบไทด์มีขนาดโปรตีน 130-138 กิโลดาลตัน และมีพิษกับหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera โปรตีน CryIA แยกจากโปรตีน Cry อื่นๆโดยใช้ความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโน (Sequence homology) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นโปรตีน CryIAa, CryIAb และ CryIAc มีคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Hofte and whiteley, 1989) จากการนำยีน *cry*IAa 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 Cry1Ac จาก *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* และ *B. thuringiensis* subsp. *kenyae* พบว่ามีพิษกับหนอนคืบกะหล่ำ (*Tricoplusia ni*) หนอนเจาะฝักข้าวโพดและหนอนผีเสื้อยิบซี *(Lymantria dispar)* แต่มีพิษน้อยกับหนอนใยผัก และในบางครั้งกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (*Ostrinia nubilalis*) (Michel *et al.*, 1991) แต่ Jane *et al.*(1990) รายงานว่า โปรตีน Cry1Ac จาก *B. thuringiensis* strain HD 263 แสดงประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนกระทู้หอม

โปรตีน CryIC มีพิษสูงกับลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) และหนอนกินใบยาสูบ (Willium and Whiteley, 1989) แต่มีพิษต่ำเมื่อทดสอบกับตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemtineata*. 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) รายงานเพิ่มเติมว่า

โปรตีน CryIF มีความเป็นพิษมากกว่า CryIAb เมื่อทดสอบกับหนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนกระทู้หอม แต่มีพิษเท่ากันเมื่อทดสอบกับหนอนเจาะลำต้นข้าวโพด

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 เช่นหนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนผีเสื้อยิบซี นอกจากนี้มีพิษกับลูกน้ำยุงลาย ความเป็นพิษของโปรตีน CryIIA เมื่อทดสอบกับหนอนเจาะต้นข้าวโพด และหนอนผีเสื้อยิบซี แสดงความเป็นพิษเทียบเท่ากับโปรตีน CryIA (Chamber *et al*., 1991) โปรตีน CryIIB และโปรตีน CryIIC มีความเป็นพิษกับแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อบางชนิดเท่านั้น ขณะที่โปรตีน CryIIB มีพิษกับหนอนผีเสื้อหลายชนิด เช่น หนอนผีเสื้อยิบซี หนอนเจาะยอดยาสูบ และหนอนคืบกะหล่ำ (Dankocsik *et al*., 1990)

โปรตีน CryIII

กลุ่มโปรตีน CryIII ประกอบด้วยโปรตีน CryIIIA โปรตีนCryIIIB โปรตีนCryIIIC และโปรตีน CryIIID ทั้ง 4 ชนิดนี้มีแสดงความเป็นพิษกับตัวอ่อนด้วง Colorado potato beetle มีเพียงโปรตีน CryIIIC เท่านั้นที่มีพิษกับหนอนเจาะกินรากข้าวโพด (*Diabrotica undecimpunctata*) (Chilcott and Wigley, 1994) Sick *et al*. (1990) รายงานว่า ยีน *cry*IIIA สร้างโปรตีนขนาด 129 กิโลดาลตัน เมื่อถูกย่อยโดยน้ำย่อย proteolytic ในกระเพาะอาหารจะเกิดเป็นสารพิษที่มีขนาด 72 กิโลดาลตัน ขณะที่ยีน *cry*IIIB จะสร้างโปรตีนขนาด 74 กิโลดาลตัน ระหว่างโปรตีน CryIIIA และโปรตีน CryIIIB มีความเหมือนกันของกรดอะมิโน 69 เปอร์เซ็นต์ ยีน *cry*IIID 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 (Lembert and Peferone, 1992)

โปรตีน CryIV

Chang *et al*. (1994) รายงานว่า *B. thuringiensis* var. *israelensis* และ *B. thuringiensis* var. *morrisoni* (PG-14) ทั้งสองไอโซเลทนี้สร้างผลึกโปรตีนรูปไข่ ขนาด 27, 72, 128 และ 130 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีน CytA, CryIVD, CryIVB และ CryIVA ตามลำดับ โปรตีน CryIVA มีพิษรุนแรงกับลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles gambiae*) แต่มีพิษเล็กน้อยกับลูกน้ำยุงรำคาญ *(Culex quinquefaciatus*) โปรตีน CryIVA และ CryIVB ทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงความเป็นพิษเท่ากันเมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงลาย และลูกน้ำยุงก้นปล่อง แต่โปรตีน CryIVAจะมีพิษสูงกว่า CryIVB เมื่อทดสอบกับลูกน้ำยุงรำคาญ (Crickmore and Ellar, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน CryIVB มีพิษกับหนอนแมลงวันแมงมุม (*Tipula oleracea)* และลูกน้ำยุงก้นปล่อง *(A. stephensi)* ซึ่งเป็นพาหะนำโรคไข้มาลาเรีย

โปรตีน CryV

โปรตีน CryV มีพิษกับกลุ่มไส้เดือนฝอย โดยมีขนาดของโปรตีน 140-150 กิโลดาลตัน ต่อมา Tailor *et al*. (1992) รายงานว่า พบโปรตีน CryV ซึ่งได้จาก *B. thuringiensis* 4835 มีขนาด 81.2 กิโลดาลตันมีพิษกับแมลงในกลุ่ม Lepidoptera และ Coleoptera และในปี 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)*

โปรตีน CytA และCytB

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

จากการค้นพบยีน *cry* ใหม่ๆ มากขึ้น Clickmore *et al.* (1998) ได้ปรับปรุงระบบการเรียกชื่อยีน *cry* โดยอาศัยการกระจายตัวทางวิวัฒนาการ และความคล้ายคลึงกัน (similarity) ของลำดับกรดอะมิโน delta-endotoxin ของ *B. thuringiensis* แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มยีน *cry* และกลุ่มยีน *cyt* ใช้ตัวเลขอารบิคแทนชื่อ subfamily โดยใน subfamily เดียวกันจะมีผลต่อแมลงในอันดับเดียวกัน และมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนน้อยกว่าร้อยละ 45 และอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่แทนชื่อ group ภายใน group เดียวกันมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 45-75 อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก ถ้าเป็นอักษรเดียวกันมีความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนร้อยละ 75-95 ส่วนตารางที่ 2 และตารางที่ 3 แสดงการเรียกชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบใหม่เปรียบเทียบกับชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบเดิม โดยข้อมูลการจำแนกสืบค้นจากเวบไซต์ http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/

8. <u>การศึกษายีน *cry* โดยใช้วิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)</u>

ในกลุ่มของโปรตีน Cry ตั้งแต่ CryI ถึง CryV กลุ่มโปรตีน CryI เป็นกลุ่มที่มีการศึกษามากที่สุด เนื่องจากเป็นกลุ่มที่ทำลายหนอนผีเสื้อศัตรูพืช ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของพืชผักเศรษฐกิจหลายชนิด จากการค้นพบผลึกโปรตีนจาก *B. thuringiensis* เพิ่มมากขึ้น วิธีการจัดจำแนกโดยใช้รูปร่าง ขนาดของผลึกโปรตีน และความเป็นพิษกับแมลง ไม่สามารถจำแนกชนิดของยีน *cry* ได้อย่างชัดเจน จึงมีการจำแนก และศึกษายีน *cry* ของ *B. thuringiensis* ด้วยวิธีการต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อการจำแนก *B. thuringiensis* ดังนั้นเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมนำมาใช้เพื่อจำแนกยีน *cry* ของ *B. thuringiensis* และมีประสิทธิภาพสูงเชื่อถือได้

PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในหลอดทดลอง โดยอาศัยองค์ประกอบสำคัญดังนี้ คือ ดีเอ็นเอแม่แบบ (template), thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide (dNTP) ทั้งหมด 4 ชนิด ไพร์เมอร์ และบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียม ไพร์เมอร์ 2 ตัวจะจับกับส่วนของดีเอ็นเอซึ่งผ่านกระบวนการเสียสภาพ (denature) ด้วยความร้อน จากการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จากนั้นจะหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนทำให้ดีเอ็นเอที่ได้ แยกออกจากกันเพื่อให้ไพร์เมอร์เข้ามาจับอีกครั้ง เมื่อลดอุณหภูมิลง การทำงานจะดำเนินเป็นขั้นตอนต่อเนื่องกัน 20-30 รอบจนได้ amplified product หรือที่เรียกว่า amplican เป็นดีเอ็นเอสายใหม่ที่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก (Taylor, 1991)

Carozzi *et al.* (1991) ใช้เทคนิค PCR ในการจำแนกความแตกต่างของ Delta-endotoxin โดยใช้ specific primer 12 ตัวในการวิเคราะห์ และศึกษาความแตกต่างระหว่าง 3 กลุ่มใหญ่ของ toxin gene คือยีน *cry*I, *cry*III และยีน *cry*IV ซึ่งเป็นกลุ่มหลักของผลึกโปรตีน *B. thuringiensis* ที่มีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Lepidoptera, Coleoptera และ Diptera ตามลำดับ ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับวิธีทดสอบประสิทธิภาพกับแมลง (bioassay) และสามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ ต่อมามีการประยุกต์ใช้ Arbitrary primer polymerase chain reaction (AP-PCR) ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* ที่จำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า โดยไม่ใช้ไพร์เมอร์จำเพาะ (specific primer) แต่ใช้ไพร์เมอร์ที่มีแตกต่างกันของเปอร์เซนต์เบส G+C ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ 90, 60, 45 และ 30 เปอร์เซ็นต์โมล G+C (Brousseau *et al.* , 1993)

การทดลองของ Kuo และChak ในปีค.ศ. 1996 ได้ออกแบบไพร์เมอร์ จำนวน 2 คู่ โดยออกแบบมาจากส่วนอนุรักษ์ (conserve region) ของ *cry*I gene ที่ทราบลำดับเบสแล้ว คือไพร์เมอร์ K5un2 และไพร์เมอร์ K3un2 สำหรับการจัดจำแนกและเพิ่มปริมาณยีน *cry*I ด้านปลาย 3’ ไพร์เมอร์ K5un3 และไพร์เมอร์ K3un3 ใช้ในการจัดจำแนกและเพิ่มปริมาณยีน *cry*I ด้านปลาย 5’ เพื่อใช้จำแนกชนิดของยีน *cry*I โดยใช้วิธี Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP) ร่วมกับวิธี PCR รูปแบบที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของ *cry*I gene ผลการศึกษา *B. thuringiensis* 20 สายพันธุ์ พบยีน *cry*I 14 ชนิด และชนิดใหม่อีก 7 ชนิด

ในปี 1997 Juarez-Perez *et al.* ได้จัดจำแนกยีน *cry* โดยใช้เทคนิค PCR 2 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกจัดจำแนกกลุ่มของยีน *cry*I โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 ชนิดคือ ไพร์เมอร์I(+) และไพร์เมอร์I(-) ทำ PCR กับยีน *cry*IA(a), *cry*IA(b), *cry*IC, *cry*ID, *cry*IE, *cry*IG, *cry*IIA และ *cry*IIIA โดยเกิดแถบขนาด 1.5-1.6 กิโลเบสกับยีนกลุ่ม *cry*I แต่ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอกับยีนในกลุ่ม *cry*IIA และ *cry*IIIA จากนั้นจึงทำ PCR ขั้นตอนที่สองกับไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cry*IA, *cry*IA(a), *cry*IA(b), *cry*IA(c), *cry*IA(d), *cry*IB, *cry*IC, *cry*ID, *cry*IE, *cry*IF และ *cry*IG ทำ PCR ด้วย 3 ไพร์เมอร์ ได้แก่ I(+) และ I(-) ร่วมกับไพร์เมอร์ใดไพร์เมอร์หนึ่ง เพื่อจัดจำแนกชนิดของยีน *cry*I ให้ละเอียดยิ่งขึ้น ผลจากการทำ PCR เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะกับยีนนั้น โดยมีขนาด 1.5-1.6 กิโลเบส ในการศึกษานี้ยังตรวจพบยีน *cry*IB ชนิดใหม่ด้วย

เมื่อมีการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะสามารถตรวจสอบยีน *cry* ได้หลายชนิด และให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูง เชื่อถือได้ จึงทำให้เกิดการศึกษาเกี่ยวกับยีน *cry* มากขึ้นในหลายประเทศ เช่น YongAn *et al.* (2003) ได้ศึกษาถึง *cry*-type gene ของ *B. thuringiensis* 72 ไอโซเลท จากป่าใน 8 เขตของประเทศจีนได้แก่ cool temperate zone, temperate zone, warm temperate zone north subtropical zone, subtropical zone, south subtropical zone, high plateau subtropical zone และ tropical zone โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับ RFLP และ SDS-PAGE พบ *cry* gene 3 ชนิดได้แก่ *cry*1, *cry*2 และ *cry*1I โดยยีน *cry*1 สร้างโปรตีนขนาด 130 กิโลดาลตัน ขณะที่ยีน *cry*2 จะสร้างโปรตีนขนาด 60 กิโลดาลตัน ไอโซเลทที่มียีน *cry*1Aa, *cry*1Ac และ *cry*2A มีพิษสูงเมื่อทดสอบกับ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนผีเสื้อยิบซี *Clostera anachoretar* และ *Dendrolimus punctatus*

การศึกษาเกี่ยวกับการกระจายตัวของยีน *cry* และความสัมพันธ์กับพื้นที่ที่ทำการเก็บตัวอย่างเป็นหัวข้อหนึ่งที่นำมาศึกษาวิจัย เช่นการศึกษาการกระจายตัว และความหลากหลายของยีน *cry* ใน *B. thuringiensis* สายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศโคลัมเบีย ซึ่งเป็นประเทศที่ตั้งอยู่ทางตอนเหนือของทวีปอเมริกาใต้ และเป็นประเทศหนึ่งที่มีความสำคัญทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเก็บตัวอย่างทั้งหมด 108 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* 264 ไอโซเลท นำมาตรวจสอบยีน *cry*1, *cry*3, *cry*7 และ*cry*8 โดยใช้เทคนิค multiple PCR ร่วมกับไพรเมอร์ทั่วไป (general primer) และไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ (specific primer) พบยีน *cry*1 137 ไอโซเลท ยีน *cry*3, *cry*7 และ *cry*8 53 ไอโซเลท นอกจากนี้พบว่ายีน *cry*1Aa และ *cry*1C เป็นยีนที่มีความถี่ในการพบมากที่สุด แสดงให้เห็นว่ากลุ่มยีน *cry*1 เป็นกลุ่มยีนที่พบมากที่สุด และมีการกระจายตัวสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการกระจายตัวของ *cry* gene ในหลายพื้นที่

จากการรายงานถึงความหลากหลายของยีน *cry* ในแต่ละประเทศ และแนวโน้มของการค้นพบยีน *cry* ชนิดใหม่ๆมากขึ้น ทำให้เกิดโอกาสในการที่จะค้นพบ และคัดเลือกยีน *cry* ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืช จาก *B. thuringiensis* สายพันธุ์ท้องถิ่น ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม และชนิดของแมลงที่มีการระบาดในประเทศนั้นๆ ดังนั้นในการศึกษาวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาถึงความหลากหลายของ *B. thuringiensis* ในจังหวัดกระบี่ ซึ่งเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่ทางใต้ของประเทศไทย ได้รับอิทธิพลลมมรสุมจากทะเลอ่าวไทย และทะลอันดามัน มีความชุ่มชื้นตลอดปี และมีความอุดมสมบูรณ์ของพืชพันธุ์ และสิ่งมีชีวิตต่างๆ แม้ว่าในประเทศไทยเคยมีการศึกษาความหลากหลายของ *B. thuringiensis* มาบ้างแล้วก็ตาม แต่การศึกษาทางด้านความหลากหลาย และการ

คัดเลือกสายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูง ต้องทำการศึกษาวิจัย ค้นหาเชื้ออยู่เสมอ เนื่องจาก *B. thuringiensis* มีความสัมพันธ์กับแมลงอย่างใกล้ชิด เมื่อแมลงมีการปรับตัวและสร้างความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* เมื่อใด *B. thuringiensis* ก็พัฒนาสารพิษให้สามารถฆ่าแมลงได้เช่นเดิม ซึ่งเป็นวิวัฒนาการร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด นอกจากนี้สายพันธุ์ *B. thuringiensis* ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในปัจจุบัน เป็นสายพันธุ์ที่ถูกพัฒนา และผลิตจากต่างประเทศ มักเสียเปรียบเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่หมาะสม โดยเฉพาะประเทศไทยมีภูมิอากาศร้อน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการกำจัดแมลง และพัฒนาสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ นำมาใช้ภายในประเทศอย่างต่อเนื่อง เพื่อความปลอดภัยต่อเกษตรกร ผู้บริโภค และสภาพแวดล้อมตลอดไป

<u>ตารางที่ 2</u> การเรียกชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบใหม่เทียบกับชื่อยีน *cry* และ *cyt* ระบบเดิม

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*1Aa1	*cry*IA(a)	*kurstaki* HD1	M11250
*cry*1Aa2	*cry*IA(a)	*sotto*	M10917
*cry*1Aa3	*cry*IA(a)	*aizawai* IPL7	D00348
*cry*1Aa4	*cry*IA(a)	*entomocidus*	X13535
cry1Aa5	*cry*IA(a)	Bt FU-2-7	D17518
*cry*1Aa6	*cry*IA(a)	*kurstaki* NRD-12	U43605
*cry*1Aa7		Bt C12	AF081790
*cry*1Aa8			I26149
*cry*1Aa9		*dendrolimus* T84A1	AB026261
*cry*1Aa10		*kurstaki* HD1-02	AF154676
*cry*1Aa11		*kurstaki*	Y09663
*cry*1Aa12		Bt Ly30	AF384211
*cry*1Aa13		*sotto*	AF510713
*cry*1Aa14		unpublished	AY197341
*cry*1Ab1	*cry*IA(b)	*berliner* 1715	M13898
*cry*1Ab2	*cry*IA(b)	*kurstaki*	M12661
*cry*1Ab3	*cry*IA(b)	*kurstaki* HD1	M15271
*cry*1Ab4	*cry*IA(b)	*kurstaki* HD1	D00117
*cry*1Ab5	*cry*IA(b)	*berliner* 1715	XO4698
*cry*1Ab6	*cry*IA(b)	*kurstaki* NRD-12	M37263
*cry*1Ab7	*cry*IA(b)	*aizawai* IC1	X13233
*cry*1Ab8	*cry*IA(b)	*aizawai* IPL7	M16463
*cry*1Ab9	*cry*IA(b)	*aizawai* HD133	X54939
*cry*1Ab10	*cry*IA(b)	*kurstaki* HD1	A29125
*cry*1Ab11		Bt A20	112419
*cry*1Ab12		*kurstaki* S93	AF057670
*cry*1Ab13		Bt c005	AF254640

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*1Ab14		Native Chilean Bt	U94191
*cry*1Ab15		Bt B-Hm-16	AF358861
*cry*1Ab16		Bt AC-11	AF375608
*cry*1Ab17		Bt WB9	AAT46415
*cry*1Ab-like		*kunthala* Rx24	AF327924
*cry*1Ab-like		*kunthala* Rx28	AF327925
*cry*1Ab-like		*kunthala* Rx27	AF327926
*cry*1Ac1	*cry*IA(c)	*kurstaki* HD73	M11068
*cry*1Ac2	*cry*IA(c)	*kenyae*	M35524
*cry*1Ac3	*cry*IA(c)	Bt BTS89A	X54159
*cry*1Ac4	*cry*IA(c)	*kurstaki* PS85A1	M73249
*cry*1Ac5	*cry*IA(c)	*kurstaki* PS81GG	M73248
*cry*1Ac6	*cry*IA(c)	*kurstaki* NRD-12	U43606
*cry*1Ac7	*cry*IA(c)	*kurstaki* HD73	U87793
*cry*1Ac8	*cry*IA(c)	*kurstaki* HD73	U87397
*cry*1Ac9	*cry*IA(c)	Bt DSIR732	U87372
*cry*1Ac10		*kurstaki* YBT-1520	AJ002514
*cry*1Ac11			AJ130970
*cry*1Ac12		Bt A20	112418
*cry*1Ac13		*kurstaki* HD1	AF148644
*cry*1Ac14		Bt Ly30	AF492767
*cry*1Ac15		Bt from Taiwan	AY122057
*cry*1Ad1	*cry*IA(d)	*aizawai*	M73250
*cry*1Ad2		Bt PS81RR1	A27531
*cry*1Ae1	*cry*IA(e)	*alesti*	M65252
*cry*1Af1	*icp*	Bt NTO423	U82003

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source	Accession Number
*cry*1Ag1			AF081248
*cry*1Ah1			AF281866
*cry*1Ai1			AY174873
*cry*1A-like		*kunthala* nags3	AF327927
*cry*1Ba1	*cry*IB	*thuringiensis* HD2	X06711
*cry*1Ba2		*entomocidus* HD110	X95704
*cry*1Ba3			AF368257
*cry*1Ba4		*entomocidus* HD9	AF363025
*cry*1Bb1	ET5	EG 5847	L32020
*cry*1Bc1	*cry*IB(c)	*morrisoni*	Z26442
*cry*1Bd1	*cry*E1	*wuhanensis* HD525	U70726
*cry*1Bd2		Bt 834	AY138457
*cry*1Be1		Bt PS158C2	AF077326
*cry*1Be2			AAQ52387
*cry*1Bf1			AX189649
*cry*1Bf2			AAQ52380
*cry*1Bg1			AY176063
*cry*1Ca1	*cry*IC	*entomocidus* 60.5	XO7518
*cry*1Ca2	*cry*IC	*aizawai* 7.29	X13620
*cry*1Ca3	*cry*IC	*aizawai* PS18I	M73251
*cry*1Ca4	*cry*IC	*entomocidus* HD110	A27642
*cry*1Ca5	*cry*IC	*aizawai* 7.29	X96682
*cry*1Ca6(1)	*cry*IC	Bt AF-2	AF215647
*cry*1Ca7	*cry*IC		AY015492
*cry*1Ca8			AF362020
*cry*1Ca9		Bt G10-01A	AY078160
*cry*1Ca10			AF540041

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*1Cb1	*cry*IC(b)	*galleriae* HD29	M97880
*cry*1Cb2			AY007686
*cry*1Da1	*cry*ID	*aizawai* HD 68	X54160
*cry*1Da2			I76415
*cry*1Db1	PrtB	BTS00349A	Z22511
*cry*1Db2		Bt-B-Pr-88	AF358862
*cry*1Ea1	*cry*IE	*kenyae* 4F1	X53985
*cry*1Ea2	*cry*IE	*kenyae*	X56144
*cry*1Ea3	*cry*IE	*kenyae* PS81F	M73252
*cry*1Ea4	*cry*IE(b)	*kenyae* LBIT-147	U94323
*cry*1Ea5			A15535
*cry*1Ea6			AF202501
*cry*1Eb1	*cry*IE(b)	*aizawai* PS81A2	M73253
*cry*1Fa1	*cry*IF	*aizawai* EG6346	M63897
*cry*1Fa2	*cry*IF	*aizawai* PS81I	M73254
*cry*1Fb1	PrtD	BTS00349A	Z22512
*cry*1Fb2		*morrisoni* INA67	AB012288
*cry*1Fb3		*morrisoni*	AF062350
*cry*1Fb4			I73895
*cry*1Fb5		Bt-B-Pr-88	AF336114
*cry*1Ga1	PrtA	BTS0349A	Z22510
*cry*1Ga2	*cry*IM	*wuhanensis*	Y09326
*cry*1Gb1	*cry*H2	*wuhanensis* HD525	U70725
*cry*1Gb2		Bt-B-Pr-88	AF288683
*cry*1Gc			AAQ52381
*cry*1Ha1	PrtC	Bt BTS02069AA	Z22513
*cry*1Hb1		*morrisoni* BF190	U35780

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*1H-like		Bt JC291	AF182196
*cry*1Ia1	*cry*V	*kurstaki*	X62821
*cry*1Ia2	*cry*V	*kurstaki*	M98544
*cry*1Ia3	*cry*V	*kurstaki* HD1	L36338
*cry*1Ia4	*cry*V	Bt AB88	L49391
*cry*1Ia5	*cry*V159	Bt 61	Y08920
*cry*1Ia6		*kurstaki* S101	AF076953
*cry*1Ia7			AF278797
*cry*1Ia8			AF373207
*cry*1Ia9		Bt Ly30	AF521013
*cry*1Ia10		*thuringiensis*	AY262167
*cry*1Ia11		*kurstaki* BNS3	AJ315121
*cry*1Ib1	*cry*V465	*entomocidus* BP465	U07642
*cry*1Ic1		Bt C18	AF056933
*cry*1Ic2			AAE71691
*cry*1Id1	NRcryV		AF047579
*cry*1Ie1		Bt BTC007	AF211190
*cry*1If1			AAQ52382
*cry*1I-like			I90732
*cry*1Ja1	ET4	Bt EG 5847	L32019
*cry*1Jb1	ET1	Bt EG5092	U31527
*cry*1Jc1			I90730
*cry*1Jc2			AAQ52372
*cry*1Jd1			AX189651
*cry*1Ka1		*morrisoni* BF190	U28801
*cry*1La1		*kurstaki* K1	AAS60191
*cry*1-like			I90729

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*2Aa1	*cry*IIA	*kurstaki*	M31738
*cry*2Aa2	*cry*IIA	*kurstaki* HD1	M23723
*cry*2Aa3		*sotto*	D86064
*cry*2Aa4		*kenyae* HD549	AF047038
*cry*2Aa5		Bt SL39	AJ132464
*cry*2Aa6		Bt YZ71	AJ132465
*cry*2Aa7		Bt CY29	AJ132463
*cry*2Aa8		*dongbei* 66	AF252262
*cry*2Aa9			AF273218
*cry*2Aa10			AF433645
*cry*2Aa11			AAQ52384
*cry*2Ab1	*cry*IIB	*kurstaki* HD1	M23724
*cry*2Ab2	*cry*IIB	*kurstaki* HD1	X55416
*cry*2Ab3		Bt BTC002	AF16466
*cry*2Ab4		Bt B-Pr-88	AF336115
*cry*2Ab5			AF441855
*cry*2Ab6		Bt WZ-7	AY297091
*cry*2Ac1	*cry*IIC	*shanghai* S1	X57252
*cry*2Ac2			AY007687
*cry*2Ac3			AAQ52385
*cry*2Ad1		Bt BR30	AF200816
*cry*2Ae1			AAQ52362
*cry*3Aa1	*cry*IIIA	*san diego*	M22472
*cry*3Aa2	*cry*IIIA	*tenebrionis*	J02978
*cry*3Aa3	*cry*IIIA		Y00420
*cry*3Aa4	*cry*IIIA	*tenebrionis*	M30503
*cry*3Aa5	*cry*IIIA	*morrisoni* EG2158	M37207

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*3Aa6	*cry*IIIA	*tenebrionis*	U10985
*cry*3Aa7		Bt 22	AJ237900
*cry*3Ba1	*cry*IIIB2	*tolworthi* 43F	X17123
*cry*3Ba2	*cry*IIIB	Bt PGSI208	A07234
*cry*3Bb1	*cry*IIIBb	Bt EG4961	M89794
*cry*3Bb2	*cry*IIIC(b)	Bt EG5144	U31633
*cry*3Bb3			I15475
*cry*3Ca1	*cry*IIID	*kurstaki* BtI109P	X59797
*cry*4Aa1	*cry*IVA	*israelensis*	Y00423
*cry*4Aa2	*cry*IVA	*israelensis* HD522	D00248
*cry*4Aa3		*israelensis*	AL731825
*cry*4Ba1	*cry*IVB	*israelensis* 4Q2-72	X07423
*cry*4Ba2	*cry*IVB	*israelensis*	X07082
*cry*4Ba3	*cry*IVB	*israelensis*	M20242
*cry*4Ba4	*cry*IVB	*israelensis* HD522	D00247
*cry*4Ba5		*israelensis*	AL731825
*cry*5Aa1	*cry*VA(a)	*darmstadiensis* PS17	L07025
*cry*5Ab1	*cry*VA(b)	*darmstadiensis* PS17	L07026
*cry*5Ac1			I34543
*cry*5Ba1	PS86Q3	Bt PS86Q3	U19725
*cry*6Aa1	*cry*VIA	Bt PS52A1	L07022
*cry*6Aa2		Bt YBT1518	
*cry*6Ba1	*cry*VIB	Bt PS69D1	L07024
*cry*7Aa1	*cry*IIIC	*galleriae* PGSI245	M64478
*cry*7Ab1	*cry*IIICb	*dakota* HD511	U04367
*cry*7Ab2	*cry*IIIC(c)	*kumamotoensis* 867	U04368
*cry*8Aa1	*cry*IIIE	*kumamotoensis*	U04364

<u>ตารางที่ 2</u> (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*8Ba1	*cry*IIIG	*kumamotoensis*	U04365
*cry*8Bb1			AX543924
*cry*8Bc1			AX543926
*cry*8Ca1	*cry*IIIF	*japonensis* (buibui)	U04366
*cry*8Ca2		Bt HBF-1	AAR98783
*cry*8Da1		*galleriae*	AB089299
*cry*8Da2		*Bt*	BD133574
*cry*8Da3		*Bt*	BD133575
*cry*8Ea1		*Bt* 185	AY329081
*cry*8Fa1		*Bt* 185	AY551093
*cry*9Aa1	*cry*IG	*galleriae*	X58120
*cry*9Aa2	*cry*IG	Bt DSIR517	X58534
*cry*9A-like			AAQ52376
*cry*9Ba1	*cry*X	*galleriae*	X75019
*cry*9Ca1	*cry*IH	*tolworthi*	Z37527
*cry*9Ca2			AAQ52375
*cry*9Da1	N141	*japonensis* N141	D85560
*cry*9Da2		*japonensis*	AF042733
*cry*9Ea1		*aizawai* SSK-10	AB011496
*cry*9Ea2		Bt-B-Hm-16	AF358863
*cry*9Eb1			AX189653
*cry*9Ec1		*galleriae*	AF093107
*cry*9-like		*galleriae*	AF093107
*cry*10Aa1	*cry*IVC	*israelensis*	M12662
*cry*10Aa2		*israelensis* ONR-60A	E00614
*cry*10Aa3		*israelensis*	AL73185
*cry*11Aa1	*cry*IVD	*israelensis*	M13737

<u>ตารางที่ 2</u> (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*11Aa2	cryIVD	*israelensis*	M22860
*cry*11Aa3		*israelensis*	
*cry*11Ba1	Jeg80	*jegathesan* 367	X86902
*cry*11Bb1	94kDa	*medellin*	AF017416
*cry*12Aa1	*cry*VB	Bt PS33F2	L07027
*cry*13Aa1	*cry*VC	Bt PS63B	L07023
*cry*14Aa1	*cry*VD	*sotto*PS80JJ1	U13955
*cry*15Aa1	34kDa	*thompsonii*	M76442
*cry*16Aa1	cbm71	*Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* CH18	X94146
*cry*17Aa1	cbm72	*Clostridium bifermentans* subsp. *malaysia* CH18	X99478
*cry*18Aa1	*cry*BP1	*Paenibacillus popilliae*	X99049
*cry*18Ba1		*Paenibacillus popilliae*	AF169250
*cry*18Ca1		*Paenibacillus popilliae*	AF169251
*cry*19Aa1	Jeg65	*jegathesan* 367	YO7603
*cry*19Ba1		*higo*	D88381
*cry*20Aa1	86kDa	*fukuokaensis*	U82518
*cry*21Aa1			I32932
*cry*21Aa2			I66477
*cry*21Ba1		Bt *roskildiensis*	AB088406
*cry*22Aa1			I34547
*cry*22Aa2		Bt	AX472772
*cry*22Ab1		Bt EG4140	AAK50456
*cry*22Ab2		Bt	AX472764
*cry*22Ba1		Bt	AX472770
*cry*23Aa1		Bt	AF03048

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*24Aa1	Jeg72	*jegathesan*	U88188
*cry*25Aa1	Jeg74	*jegathesan*	U88189
*cry*26Aa1		*finitimus* B-1166	AF122897
*cry*27Aa1	*cyt*M	*higo*	AB023293
*cry*28Aa1		*finitimus* B-1161	AF132928
*cry*28Aa2		*finitimus*	AF285775
*cry*29Aa1			AJ251977
*cry*30Aa1			AJ251978
*cry*30Ba1		*entomocidus*	BAD00052
*cry*31Aa1		Bt 84-HS-1-11	AB031065
*cry*31Aa2			
*cry*32Aa1		*yunnanensis*	AY008143
*cry*32Ba1		Bt	BAB78601
*cry*32Ca1		Bt	BAB78602
*cry*32Da1		Bt	BAB78603
*cry*33Aa1		*dakota*	AAL26871
*cry*34Aa1		Bt PS80JJ1	AAG50341
*cry*34Aa2		Bt EG5899	AAK64560
*cry*34Aa3			AY536899
*cry*34Aa4			AY536897
*cry*34Ab1		Bt PS149B1	AAG41671
*cry*34Ac1		Bt PS167H2	AAG50118
*cry*34Ac2		Bt EG9444	AAK64562
*cry*34Ac3			AY536896
*cry*34Ba1		Bt EG4851	AAK64565
*cry*34Ba2			AY536900
*cry*34Ba3			AY536898

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cry*35Aa1		Bt PS80JJ1	AAG50342
*cry*35Aa2		Bt EG5899	AAK64561
*cry*35Aa3			AY536895
*cry*35Aa4			AY536892
*cry*35Ab1		Bt PS149B1	AAG41672
*cry*35Ab2		Bt EG9444	AAK64563
*cry*35Ab3			AY536891
*cry*35Ac1		Bt PS167H2	AAG50117
*cry*35Ba1		Bt EG4851	AAK64566
*cry*35Ba2			AY536894
*cry*35Ba3			AY536893
*cry*36Aa1		Bt	AAK64558
*cry*37Aa1		Bt	AAF76376
*cry*38Aa1		Bt	AAK64559
*cry*39Aa1		*aizawai*	BAB72016
*cry*40Aa1		*aizawai*	BAB72018
*cry*40Ba1		Bun1-14	BAC77648
*cry*41Aa1			AB116649
*cry*41Ab1			AB116651
*cry*42Aa1			AB116652
*cry*43Aa1		*P.lentimorbus semadara*	AB115422
*cry*43Aa2		*P. popilliae popilliae*	AB176668
*cry*43Ba1		*P.lentimorbus semadara*	AB115422
*cry*43-like		*P.lentimorbus semadara*	AB115422
*cry*44Aa		*entomocidus* INA288	BAD08532
*cyt*1Aa1	*cyt*A	*israelensis*	X03182
*cyt*1Aa2	*cyt*A	*israelensis*	X04338

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Name	Previous Name	Source Strain	Accession Number
*cyt*1Aa3	*cyt*B	*morrisoni*	Y00135
*cyt*1Aa4	*cyt*A	*morrisoni*	M35968
*cyt*1Aa5		*israelensis*	
*cyt*1Ab1	*cyt*M	*medellin*	X98793
*cyt*1Ba1		*neoleoensis*	U37196
*cyt*1Ca1		*israelensis*	AL731825
*cyt*2Aa1		*kyushuensis*	Z14147
*cyt*2Aa2	*cyt*B	*darmstadiensis*73E10	AF472606
*cyt*2Ba1	*cyt*B	*israelensis* 4Q2	U52043
*cyt*2Ba2		*israelensis* PG14	AF020789
*cyt*2Ba3		*fukuokaensis*	AF022884
*cyt*2Ba4		*morrisoni* HD12	AF022885
*cyt*2Ba5		*morrisoni* HD518	AF022886
*cyt*2Ba6		*tenebrionis*	AF034926
*cyt*2Ba7		Bt T301	AF215645
*cyt*2Ba8		Bt T36	AF215646
*cyt*2Ba9		*israelensis*	AL731825
*cyt*2Bb1		*jegathesan*	U82519
*cyt*2Bc1		*medellin*	CAC80987
*cyt*2Ca1		Bt	AAK50455

ที่มา: Crickmore *et al.* (2548)

<u>ตารางที่ 3</u> รายชื่อ toxin-protein ที่ไม่จัดอยู่ในกลุ่มของยีน *cry*

Name	Subspecies or variety of original description	Accession	Reference	Reason
40kDa	*thompsonii*	AAA22332	Brown and Whitley 1992	No reported toxicity
cryC35	*cameroun*	CAA63374	Juarez-Perez *et al*. 1995	No reported toxicity
cryTDK	*mexicanensis*	BAA13073	Hashimoto 1996	s-layer proteins, not toxin?
cryC53	*cameroun*	CAA67205	Juarez-Perez *et al*. 1996	No reported toxicity
p21med	*medellin*	CAA67329	Thiery *et al*. 1997	chaperone, not toxin?
NT32KD	*Dakota*	AAL26870	Kim *et al*. 2001	No reported toxicity
vip3A(a)	unspecified	AAC37036	Estruch *et al*. 1996	Not a crystal protein
vip3A(b)	unspecified	AAC37037	Estruch *et al*. 1996	Not a crystal protein

ที่มา: Crickmore *et al*. (2548)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดินและเศษวัสดุพืช

เก็บรวบรวมตัวอย่างดินและเศษวัสดุพืชที่ย่อยสลายตัวแล้วจำนวน 10-20 ตัวอย่างต่อหนึ่งพื้นที่ จากเขตป่าสมบูรณ์ ป่าอนุรักษ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่ 6 พื้นที่ แสดงในภาพที่ 1 และภาพที่ 2 มีดังนี้

1. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม อำเภอคลองท่อม เก็บตัวอย่างดินใน 2 พื้นที่ ได้แก่ บริเวณเส้นทางชมธรรมชาติป่าพรุ และสระมรกต

2. หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง อำเภอปลายพระยา เก็บตัวอย่างดิน 6 พื้นที่ได้แก่ เขื่อนแรก บางสัน บางสันป่าสวนยาง หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน อ่าวมันช้าง และที่ทำการเขตหน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง

3. อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจา และสวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้ อำเภอเขาพนม เก็บตัวอย่างดิน 2 พื้นที่ได้แก่ บริเวณสวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้ และป่าเชิงเขาน้ำตกห้วยโต้

4. เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล อำเภอเกาะลันตา เก็บตัวอย่างดิน 2 พื้นที่ ได้แก่ อ่างเก็บน้ำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล และป่าโกงกาง

5. อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี อำเภออ่าวลึก

6 หาดนพรัตน์ธาราอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี อำเภอเมือง

2. เครื่อง GPS (Garmin 12XL)

3. ไพร์เมอร์ (Primer)

ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *cry* ที่มีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera (Porcar and Juarez-Perez, 2003) ดังแสดงในตารางที่ 4

<u>ภาพที่ 1</u> แสดงตำแหน่งที่เก็บตัวอย่างดินในพื้นที่เขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่

<u>ภาพที่ 2</u> แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างดินจากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่ 6 พื้นที่

ก เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม ข อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี

ค หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง ปลายพระยา ง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล

จ อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี ฉ อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจาและสวนอุทยานน้ำตกห้วยโต้

<u>ตารางที่ 4</u> ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *cry*

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
*cry*1Aa	1Aa (TTCCCTTTATTTGGGAATGC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1Ab	1Ab(CGGATGCTCATAGAGGAGAA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1Ac	1Ac (GGAAACTTTCTTTTTAATGG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1Ad	1Ad (ACCCGTACTGATCTCAACTA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1Ae	1Ae (CTCTACTTTTTATAGAAACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1B	1B (GGCTACCAATACTTCTATTA)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1C	1C (ATTTAATTTACGTGGTGTTG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1D	1D (CAGGCCTTGACAATTCAAAT)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1E	1E (TAGGGATAAATGTAGTACAG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1F	1F (GATTTCAGGAAGTGATTCAT)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1G	1G (GCTTCTCTCCAAACAACG)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1H	1H (ACTCTTTTCACACCAATAAC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1I	V(+)(ATGAAACTAAAGAATCCAGA)	V(-) (AGGATCCTTGTGTTGAGATA)
*cry*1J	1J (GCGCTTAATAATATTTCACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*1K	1K (TGATATGATATTTCGTAACC)	I(-) (MDATYTCTAKRTCTTGACTA)
*cry*2A	II(+)(TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT)	II(-) (AACTCCATCGTTATTTGTAG)
*cry*5	(TAAGCAAAGCGCGTAACCTC)	(GCTCCCCTCGATGTCAATG)
*cry*9A	(GTTGATACCCGAGGCACA)	(GGGCTTCCAATAACATCTTTT)
*cry*9B	(TCATTGGTATAAGAGTTGGTGATAGAC)	(CCGCTTCCAATAACATCTTTT)
*cry*9C	(CTGGTCCGTTTCAATCC)	(CCGCTTCCAATAAACATCTTT)
*cry*9D	(CCGAGCTCTATGAATCGAAATAATCAAAATGAAT)	(CCTCCTAGACACAGGGATGATTTCAATTC)
*cry*12	(CTCCCCCAACATTCCATCC)	(AATTACTTACACGTGCCATACCTG)
*cry*13A	cry13A(d) (CTTTGATTATTTAGGTTTAGTTCAA)	cry13A(r) (TTGTAGTACAGGCTTGTGATTC)
*cry*14	(ATAATGCGCGACCTACTGTTGT)	(TGCCGTTATCGCCGTTATT)

<u>หมายเหตุ</u> M แทน A หรือ C, D แทน A G หรือ T, Y แทน T หรือ C, K แทน G หรือ T,
R แทน Aหรือ G

ที่มา : Porcar and Juarez-Perez (2003)

<u>วิธีการ</u>

<u>1. การแยกแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* บริสุทธิ์</u>

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน ทำการเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกหา *B. thuringiensis* ในพื้นที่ต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เลือกบริเวณที่เก็บตัวอย่างดิน จากดินที่มีความสมบูรณ์สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ สภาพดินไม่มีน้ำขัง โดยการปาดหน้าดินบริเวณที่จะเก็บ เพื่อขจัดเศษชิ้นส่วนอื่นๆที่ไม่ต้องการ ใช้ช้อนตักดินประมาณ 5-10 กรัม ความลึกจากผิวดิน 1 นิ้ว ใส่ถุงพลาสติกปิดให้สนิทและทำการวัดพิกัดจุดเก็บดินโดยใช้เครื่อง GPS ซึ่งระบุความสูง (ELEV.) และเลขพิกัด (47N, UTM) โดยเลขพิกัดที่บันทึกไว้จะแปลผลโดยเครื่อง GPS และนำผลที่ได้เทียบกับแผนที่ก็จะทราบตำแหน่งเก็บดินได้ โดยการเก็บตัวอย่างดินนี้ ได้ออกเก็บตัวอย่างดินจากทุกพื้นที่การศึกษาระหว่างวันที่ 19-23 มีนาคม 2546

1.2 การแยกหาแบคทีเรีย *B. thuringiensis* นำตัวอย่างดินที่รวบรวมได้ ในแต่ละแหล่งมาแยกหาเชื้อ *B. thuringiensis* ในห้องปฏิบัติการภาควิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ใช้ตัวอย่างดิน 0.5 กรัม เติมน้ำที่อบฆ่าเชื้อ 4.5 มิลลิลิตร ผสมปั่นให้เข้ากันและเจือจางโดยการทำ serial dilution จนมีความเจือจางที่ 10000 และ 100000 เท่า จากนั้นนำส่วนผสมที่เตรียมได้ 100 ไมโครลิตรเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Nutrient agar, NA) โดยใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยให้ทั่วจนผิวหน้าแห้ง จากนั้นบ่มเชื้อทิ้งไว้ข้ามคืน (24 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิห้อง คัดเลือกโคโลนีที่คล้าย *Bacillus* คือ โคโลนีสีขาวขุ่น ไม่มันวาว ขอบไม่เรียบ จากนั้นย้ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) ด้วยวิธี streak plate method คว่ำจานเลี้ยงเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเชื้อเจริญได้ 12 ชั่วโมง คัดเลือก single colony ย้ายลง slant agar ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง นำมาย้อมแกรม คัดเลือกเชื้อที่เป็นแกรมบวก เพื่อตรวจดูการสร้างสปอร์ที่ 48 ชั่วโมง และการสร้างผลึกโปรตีนของเชื้อที่ 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเชื้อที่สร้างผลึกโปรตีนเพื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนผีเสื้อต่อไปในการแยก *B. thuringiensis* ของแต่ละพื้นที่ทำการวัดความหนาแน่นของ *B. thuringiensis* โดยใช้ค่า Bt index ซึ่งคำนวณได้จากจำนวนโคโลนีที่เป็น *B. thuringiensis* ต่อจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด

2. การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในห้องปฏิบัติการ

เลือกทดสอบกับหนอนผีเสื้อศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจที่ทำลายผักและผลไม้ 3 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก *(Spodoptera litura)* หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) และหนอนใยผัก *(Plutella xylostella* L.) โดยหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม ซื้อจากกลุ่มงานควบคุมแมลงทางชีวภาพกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ส่วนหนอนใยผัก ทำการเลี้ยงด้วยผักคะน้าหรือผักกาดซึ่งเป็นผักที่ปลูกในสภาพปลอดสารพิษในห้องปฏิบัติการ การทดสอบประสิทธิภาพนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนได้แก่

2.1 ขั้นตอนที่หนึ่ง เป็นการทดสอบ *B. thuringiensis* ทุกไอโซเลทเพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน 100 เปอร์เซ็นต์ เริ่มจากนำเชื้อ *B. thuringiensis* streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (NA) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ขูดเชื้อ *B. thuringiensis* ทั้งหมดที่เจริญในจานเลี้ยงเชื้อ ใส่ในหลอดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยจะมีความเข้มข้นประมาณ 10^8 -10^9 cfu/ml. ตัดอาหารเทียมเลี้ยงแมลงให้มีขนาด 0.5 × 0.5× 0.5 ลูกบาศก์นิ้ว หยดสารละลายเชื้อ *B. thuringiensis* 1 มิลลิลิตรลงบนอาหารเทียม นับหนอนลงไป 5 ตัวต่อถ้วย โดยทดสอบทั้งหมด 30 ตัวต่อไอโซเลท นับจำนวนหนอนที่ตายหลังจากได้รับเชื้อนาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง คำนวณหาการตายอย่างแท้จริง โดยใช้ Abbott’s formula (1925) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังนี้ p= c+(1-c)p’ เมื่อ c คือ อัตราการตายของแมลงใน control, p’ คือ อัตราการตายที่ได้จากการทดลอง และ p คือ อัตราการตายอย่างแท้จริง จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทที่ฆ่าหนอนตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ไว้ทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สอง

2.2 ขั้นตอนที่สอง นำไอโซเลทที่ได้ในขั้นตอนที่หนึ่ง streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นขูด *B. thuringiensis* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อลงในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจาง *B. thuringiensis* ต่อน้ำที่ฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:10, $1:10^3$ และ $1:10^5$ จากนั้นหยด *B. thuringiensis* ที่เตรียมได้ 1 มิลลิลิตรลงบนอาหารเทียมเลี้ยงแมลงขนาด 0.5 × 0.5× 0.5 ลูกบาศก์นิ้ว นับหนอนใส่ถ้วยละ 5 ตัว โดยทดสอบทั้งหมด 30 ตัวต่อความเข้มข้นในอัตราต่างๆของแต่ละไอโซเลท บันทึกจำนวนหนอนที่ตายหลังจากได้รับเชื้อนาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง คำนวณหาอัตราการตายอย่างแท้จริงด้วย Abbott’s formula (Abbott, 1925) และหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้แมลงทดสอบตายที่ 50% (LC_{50}) โดยใช้โปรแกรม Probit analysis (Raymond, 1985) ส่วนการ

ทดสอบกับหนอนใยผักใช้วิธีทดสอบตามที่รายงานข้างต้นนี้ แต่ใช้ใบผักกาดหรือใบผักคะน้าแทนอาหารเทียม

2.3 การนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ทำการเจือจางเชื้อ *B. thuringiensis* ในน้ำที่ฆ่าเชื้อแล้วในอัตราส่วน $1:10^5$ $1:10^6$ และ $1:10^7$ หยดสารละลาย *B. thuringiensis* ที่เตรียมได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลที่ฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ NA จนผิวหน้าอาหารแห้ง บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยจำนวนนับต้องอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี

3. การศึกษา *cry*I genes ของ *Bacillus thuringiensis*

ทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดของ *B. thuringiensis* ที่เก็บรวบรวมได้ กับหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก แล้วคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนใยผักได้ดี นำมาศึกษาชนิดของยีน *cry* ที่สร้างโปรตีน และเป็นพิษกับแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อ เนื่องจากหนอนใยผักเป็นหนอนผีเสื้อที่มีความต้านทานต่อ *B. thuringiensis* มากกว่าหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หายีน *cry*I โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.1 การสกัดโครโมโซมของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* (ดัดแปลงจากวิธีของ Harwood and Cutting, 1990) การเตรียมดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* แต่ละไอโซเลทที่แยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าทิ้งไว้ 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตจนมีความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml. จากนั้นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบเป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน ละลายตะกอนและล้างเซลล์ด้วย lysis buffer ปริมาตร 800 ไมโครลิตรจากนั้นเติมผง lysozyme 0.002 กรัม ผสมให้เข้ากันและเติม 20% sarkosyl ปริมาตร 60 ไมโครลิตร บ่มไว้ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนน้ำใสส่วนบนใส่ใน microtube หลอดใหม่ เติม phenol : chloroform (29:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนบนใส่ในหลอดใหม่เติม 0.1 เท่าของ 3 M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และ 2.5 เท่าของ absolute ethanol

ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 คืนที่ –10 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลานำหลอด เหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด 4 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เซลล์แห้งโดยใช้เครื่อง vacuum dry ละลายตะกอนด้วยน้ำ ddH_2O ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

3.2 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (ดัดแปลงจากวิธีการของ Birnboim and Dolby, 1979) การเตรียมพลาสมิดจากแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ในแต่ละไอโซเลทที่แยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อ *B. thuringiensis* ในอาหารเหลว Luria-Bertani broth (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่า 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียเจริญเติบโตจนมีความเข้มข้น 1×10^8 cfu/ml. นำมาเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใสทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ TSE 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทสารละลายใสที่อยู่ส่วนบนของหลอดทิ้ง แล้วเติม solution A ที่มี lysozyme ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้จนสารละลายขุ่น จากนั้นวางบนน้ำแข็ง เติม solution B ปริมาตร 400ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันวางบนน้ำแข็ง 4 นาที แล้วเติม solution C ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันวางบนน้ำแข็ง 5 นาที นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 6 นาที ดูดสารละลายใสในหลอด microtube หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform (1:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตรสารละลายที่ดูดมาได้ พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด เป็นเวลา 6 นาที ดูดสารละลายใสที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอด microtube หลอดใหม่ จากนั้นเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) จำนวน 1 เท่าของปริมาตร พลิกหลอดกลับไปมาเพื่อให้เข้ากัน นำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุด 2 นาที ดูดสารละลายใสใส่ในหลอด microtubeใหม่จากนั้นเติม absolute ethanol ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสส่วนบนออก แล้วเติม 80% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ส่วนที่เป็นตะกอนมาทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยบัฟเฟอร์ TE ที่ผสม RNase A ปริมาตร 1ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำซ้ำอีกครั้งตั้งแต่ขั้นตอนในการเติม phenol:chloroform (1:1) จนถึงขั้นตอนการเก็บตะกอนดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ TE จากนั้นเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *cry* จาก *B. thuringiensis* แต่ละไอโซเลทโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกลุ่ม *cry* โดยใช้ไพรเมอร์ที่แสดงดังตารางที่ 4 เอนไซม์ DNA polymerase และเครื่อง Thermal cycle โดยเติมบัฟเฟอร์เฉพาะสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR buffer) 1X, dNTPs mix ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ แต่ละไพรเมอร์ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สารละลายดีเอ็นเอต้นแบบจากโครโมโซม หรือ พลาสมิดของ *B. thuringiensis* แต่ละไอโซเลทที่คัดเลือกได้ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วย สุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ได้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 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 นาทีนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบบน 1 เปอร์เซ็นอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับ DNA marker Lamda/ *Hin*dIII / *Eco*RI (บริษัท Fermentus) หรือ 1 kb DNA Ladder (บริษัท Fermentus)

ผลและการวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างดิน

จากการเก็บรวบรวมตัวอย่างดิน และเศษวัสดุพืชที่ย่อยสลายตัวแล้ว จากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่ 6 พื้นที่ ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 91 ตัวอย่าง จากพื้นที่ต่างๆดังนี้ พื้นที่ที่ 1 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางครามได้ตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง พื้นที่ที่ 2 หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยงได้ตัวอย่างดิน 17 ตัวอย่าง พื้นที่ที่ 3 อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจา สวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้ได้ตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง พื้นที่ที่ 4 เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเลได้ตัวอย่างดิน 12 ตัวอย่าง พื้นที่ที่ 5 อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีได้ตัวอย่างดิน 20 ตัวอย่าง พื้นที่ที่ 6 หาดนพรัตน์ธาราอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพีได้ตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง จำนวนตัวอย่างดินที่เก็บในแต่ละพื้นที่จะแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับความกว้าง และความแตกต่างกันในส่วนต่างๆ ของพื้นที่ นอกจากนี้ขึ้นอยู่กับความอุดมสมบูรณ์ของดินในพื้นที่ด้วย รายละเอียดพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน ตำแหน่งเก็บ จำนวนตัวอย่างดินที่เก็บและพิกัดจุดเก็บดินของแต่ละพื้นที่แสดงในตารางผนวกที่ ข1

2. การแยกเชื้อ *Bacillus thuringiensis*

แยกเชื้อ *B. thuringiensis* จากตัวอย่างดินที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 91 ตัวอย่าง พบตัวอย่างดินที่มี *B. thuringiensis* 32 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 35.16 ซึ่งตัวอย่างดินที่มี *B. thuringiensis* ในแต่ละพื้นที่มีดังนี้ พื้นที่หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยงได้ตัวอย่างดินจำนวน 17 ตัวอย่างพบ *B. thuringiensis* 1 ตัวอย่าง จากเขื่อนแรกบางสัน พื้นที่อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจา และสวนอุทยานน้ำตกห้วยโต้ได้ตัวอย่างดินจำนวน 19 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* จำนวน 5 ตัวอย่างจากน้ำตกห้วยโต้ พื้นที่เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเลได้ตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* 1 ตัวอย่างจากอ่างเก็บน้ำเขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเล พื้นที่อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีได้ตัวอย่างดินจำนวน 14 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* 9 ตัวอย่าง พื้นที่อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี ได้ตัวอย่างดินจำนวน 12 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* 9 ตัวอย่าง ขณะที่ไม่พบ *B. thuringiensis* จากตัวอย่างดินของพื้นที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน พิกัด ตำแหน่งเก็บ และจำนวนตัวอย่างดินที่เก็บจากป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่

พื้นที่	สถานที่	พิกัดจุดเริ่มต้น	ตำแหน่งเก็บ	จำนวนตัวอย่างดิน	รวม
1	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม	47N 0529067 UTM 0875026	- ป่าพรุ - สระมรกต	6 4	10
2	หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง	47N 0492401 UTM 0946112	- เขื่อนแรกบางสัน - บางสันป่าสวนยาง - หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร - หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน - อ่าวมันช้าง - หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง	3 2 4 3 3 2	17
3	อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจา และสวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้	47N 0491267 UTM 0910298	- น้ำตกห้วยโต้ - ป่าเชิงเขาน้ำตกห้วยโต้	10 10	20
4	เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเล	47N 050469 UTM 0852897	- อ่างเก็บน้ำเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล - ป่าโกงกางเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล	8 4	12
5	อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	47N 0471217 UTM 0926897	- ป่าอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	20	20
6	อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี	47N 0478661 UTM 0889416	- สวนป่าอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	10	10
				รวม	91

ตารางที่ 6 แสดงจำนวนโคโลนีที่นำมาตรวจสอบ และค่า Bt index ของ *Bacillus thuringiensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตห้ามล่าสัตว์ป่า และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่

สถานที่	ตำแหน่งเก็บ	จำนวนโคโลนีที่นำมาตรวจสอบ	จำนวนโคโลนี *B. thuringiensis*	Bt index
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม	-ป่าพรุ	75	0	0.000
	-สระมรกต	33	0	0.000
รวม		108	0	0.000
หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง	-เขื่อนแรกบางสัน	17	0	0.000
	-บางสันป่าสวนยาง	12	1	0.083
	-หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร	28	0	0.000
	-หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน	26	0	0.000
	-อ่าวมันช้าง	16	0	0.000
	-หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง	11	0	0.000
รวม		110	1	0.009
อุทยานแห่งชาติเขาพนมเบญจาและ สวนอุทยานแห่ง ชาติน้ำตกห้วยโต้	-น้ำตกห้วยโต้	178	6	0.033
	-ป่าเชิงเขาน้ำตกห้วยโต้	23	0	0.000
รวม		201	6	0.030
เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเล	- อ่างเก็บน้ำเขตห้ามล่าพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล	120	2	0.017
	- ป่าโกงกางเขตห้ามล่าพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล	25	0	0.000
รวม		145	2	0.014
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	- ป่าอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	163	62	0.380
อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี	- สวนป่าอุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	142	50	0.352
รวมทั้งหมด		**859**	**121**	**0.141**

จากตัวอย่างดิน 91 ตัวอย่าง พบ *B. thuringiensis* จำนวน 121 ไอโซเลทจากโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบจำนวน 859 ไอโซเลท คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การค้นพบ 14.09 และพบแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ 66 ไอโซเลท โดยรายละเอียดของ *B. thuringiensis* จำนวน 121 ได้มาจากพื้นที่ต่างๆ ดังนี้ พื้นที่เขตอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีพบ *B. thuringiensis* 62 ไอโซเลทจากโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ 163 ไอโซเลท อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพีพบ *B. thuringiensis* 50 ไอโซเลท จาก 142 ไอโซเลทของโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ สวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้พบ *B. thuringiensis* 6 ไอโซเลท จากโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ 206 ไอโซเลท เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเลพบ *B. thuringiensis* 2 ไอโซเลท จากโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ 145 ไอโซเลท หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยงพบ *B. thuringiensis* 1 ไอโซเลท จากโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ 110 ไอโซเลท โดยมีเปอร์เซ็นต์การค้นพบร้อยละ 38.03, 35.21, 2.91, 1.38 และ 0.90 ตามลำดับ ขณะที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม นำโคโลนีแบคทีเรียมาตรวจสอบทั้งหมด 108 ไอโซเลท แต่ไม่พบเชื้อ *B. thuringiensis* (ตารางที่ 6)

อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีเป็นพื้นที่ที่มีเปอร์เซ็นต์การพบ *B. thuringiensis* มากกว่าพื้นที่อื่นๆ เนื่องจากมีลักษณะภูมิประเทศเป็นเทือกเขาทอดตัวในแนวเหนือใต้ แต่ละพื้นที่ย่อยมีความลาดชัน ปกคลุมด้วยป่าไม้ ป่าดงดิบ และธารน้ำตก มีความอุดมสมบูรณ์และความชื้นตลอดปี จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้ง *B. thuringiensis* ด้วย ขณะที่เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางครามเป็นพื้นที่ที่ไม่พบ *B. thuringiensis* ในตัวอย่างดินที่เก็บ อาจมีสาเหตุจากพื้นที่นี้เป็นแหล่งท่องเที่ยวมีการรบกวนระบบนิเวศในรูปแบบต่างๆ อยู่ตลอดเวลา นอกจากนี้ตัวอย่างดินของพื้นที่นี้ มีลักษณะเป็นดินทราย ซึ่ง Hossain *et al.* (1997) รายงานว่า การงอกของสปอร์และการเจริญเติบโตของ *B. thuringiensis* ถูกจำกัดในดินทราย เนื่องจากมีปริมาณของน้ำ และธาตุอาหารต่ำ ปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลให้ *B. thuringiensis* มีการกระจายตัวน้อยในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม

ค่าความถี่ในการพบ *B. thuringiensis* ซึ่งคิดเป็นค่า Bt index ในแต่ละพื้นที่มีดังนี้ ตัวอย่างดินของอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี มีค่า Bt index สูงที่สุดคือ 0.380 รองลงมาได้แก่ อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี สวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้ เขตห้ามล่าสัตว์ป่าทุ่งทะเล และหน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง มีค่า Bt index เท่ากับ 0.352, 0.030, 0.014 และ 0.009 ตามลำดับ ผลรวมของค่า Bt index ค่อนข้างต่ำคือ 0.14 ในขณะที่จำนวนไอโซเลทของ

B. thuringiensis ที่แยกได้ ในเขตอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีมีจำนวนสูงสุด เมื่อเทียบกับตัวอย่างดิน 5 พื้นที่ ค่า Bt index ที่มีความแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่นี้ DeLucca *et al.* (1981) รายงานว่าค่า Bt index ในตัวอย่างดินของสหรัฐอเมริกา มีค่าระหว่าง 0-0.2 Chilcott and Wigley (1993) รายงานว่าประเทศนิวซีแลนด์มีค่า Bt index อยู่ระหว่าง 0.2-0.5 Hossain *et al.* (1997) รายงานว่าพื้นที่เขตเกษตรกรรมของบังกลาเทศ มีค่าเฉลี่ยของ Bt index คือ 0.75 ซึ่งในแต่ละพื้นที่ค่า Bt index อยู่ระหว่าง 0.38-0.82 Vilas-Bôas and Manoel (2004) รายงานว่า ในประเทศบราซิล ดินในเขตเกษตรกรรมมีค่า Bt index เท่ากับ 0.6 และในเขต Amazonian Tropical Rainforest มีค่า Bt index เท่ากับ 0.05 เป็นต้น

B. thuringiensis พบได้ในหลายๆตัวอย่างเช่น ดิน เมล็ดพืช ผลิตภัณฑ์ในโรงเก็บ ฟางข้าว ซากแมลง ผิวใบพืช ฯลฯ ซึ่งนักวิจัยหลายท่านศึกษาวิจัย และทำการเปรียบเทียบในแต่ละแหล่ง เช่น Kim (2000) แยก *B. thuringiensis* จากโรงเรือนเลี้ยงไหม โรงเก็บผลิตผล และตัวอย่างดินพบ *B. thuringiensis* ในโรงเก็บผลผลิตมากที่สุด 40 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยโรงเรือนเลี้ยงไหม 33 เปอร์เซ็นต์ และตัวอย่างดิน 10 เปอร์เซ็นต์ Hongyu *et al.* (2000) และ Bernhard *et al.* (1997) พบว่า *B. thuringiensis* มีความหลากหลายในผลิตภัณฑ์ในโรงเก็บมากกว่าดิน แต่ Apaydin *et al.* (2005) พบว่าค่า Bt index จากตัวอย่างดินมีค่าสูงที่สุดคือ 0.4 ตามด้วยผลิตภัณฑ์ในโรงเก็บ ฟางข้าว และเมล็ดพืช เป็นแหล่งที่ไม่เหมาะในการเจริญเติบโตเมื่อเทียบกับแหล่งอื่นๆ ซึ่งให้เหตุผลว่าความแตกต่างนี้เกิดจากระดับของ Bt index ที่มีการเปลี่ยนแปลงจากพื้นที่หนึ่งไปยังพื้นที่หนึ่งและระหว่างชนิดของตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ อย่างไรก็ตามดินเป็นแหล่งอาศัยที่สำคัญของ *B. thuringiensis* ซึ่งมีสภาพแวดล้อมเปิดมีความหลากหลายและการกระจายตัวของยีนสูงอีกทั้งยังเป็นแหล่งพันธุกรรมขนาดใหญ่จึงมีการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรม เกิดโอกาสในการพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ที่ควบคุมแมลงในกลุ่มที่ไม่มีรายงานว่าอ่อนแอต่อ *B. thuringiensis* มาก่อน (Quesada-Morage *et al.*, 2004)

ค่า Bt index เป็นค่าที่ใช้วัดถึงความสำเร็จในการแยกเชื้อ *B. thuringiensis* (Apaydin *et al.*, 2005) ความแตกต่างกันของค่า Bt index ในแต่ละพื้นที่อาจเกิดจากปัจจัยทางชีวภาพ เช่น จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในดิน ชนิดของแมลงที่อาศัยอยู่ในดิน หรือปัจจัยทางกายภาพ เช่น ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ลักษณะของเนื้อดิน ปริมาณออกซิเจนและสารอาหารที่สามารถนำไปใช้ได้ รวมทั้งอุณหภูมิ และความชื้น นอกจากนี้ Bt index เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความหลากหลายของ *B. thuringiensis* ที่นักวิจัยหลายท่านได้รายงานมาก่อนหน้านี้ Vilas-Bôas and Manoel (2004) ให้ข้อเสนอแนะว่าควร

หลีกเลี่ยงการเปรียบเทียบค่า Bt index กับงานวิจัยอื่น เนื่องจากเกิดความแตกต่างของวิธีการศึกษา เช่น วิธีการเก็บตัวอย่างดิน การเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้ ขบวนการแยกเชื้อ การจำแนกเชื้อ โดยปัจจัยเหล่านี้มีผลมาจากประสบการณ์ของกลุ่มผู้ทำงานวิจัย และอาจมีผลต่อค่า Bt index ที่ได้

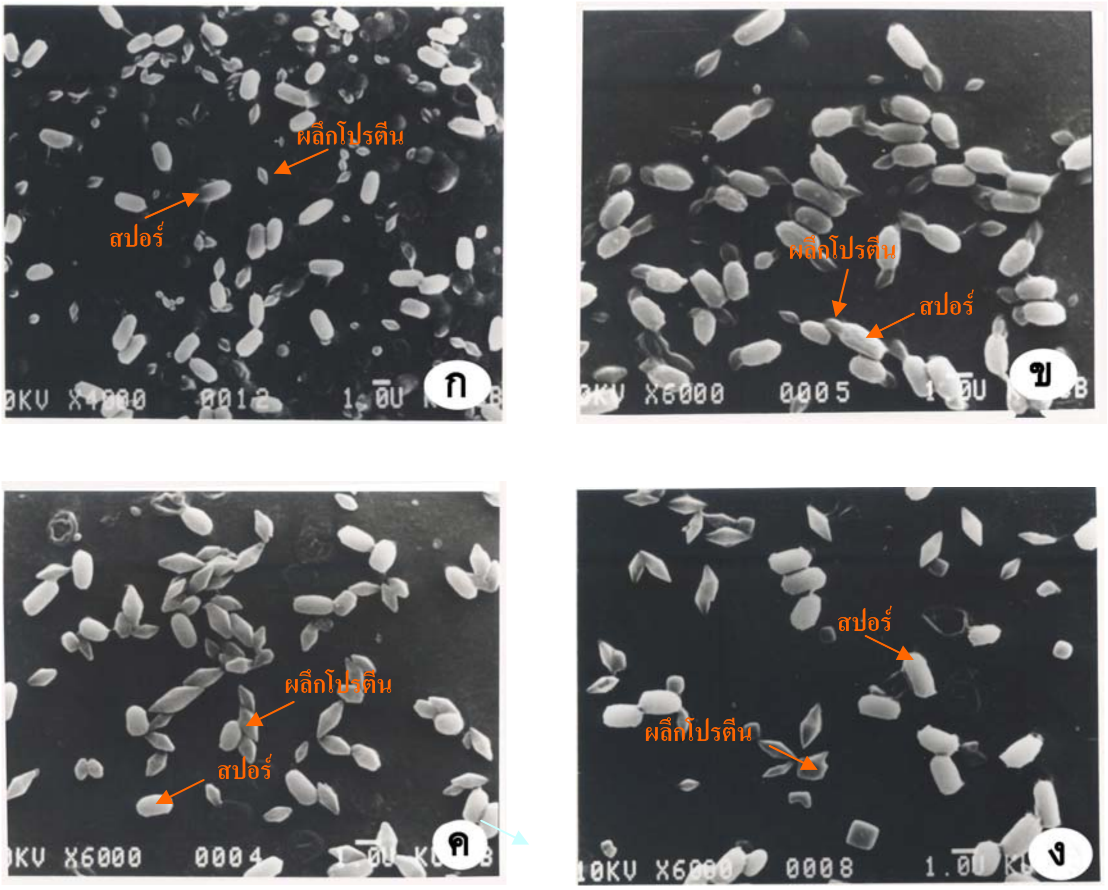
จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีนโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีน และการอยู่ร่วมกันของสปอร์และผลึกโปรตีน 4 รูปแบบ (ภาพที่ 3) คือ ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ขนาดเล็กติดที่ปลายสปอร์ (crystal protein in exosporium) มี 62 ไอโซเลท ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ขนาดเล็ก และขนาดใหญ่กว่าสปอร์ มี 35ไอโซเลท ผลึกโปรตีนหลายขนาดอยู่ร่วมกันได้แก่ ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ รูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ รูปกลม และมีรูปร่างไม่แน่นอน (amorphous) อยู่ร่วมกันพบ 20 ไอโซเลท และผลึกโปรตีนรูปร่างปิรามิดคู่ขนาดเล็ก อยู่เป็นอิสระจากสปอร์มี 4 ไอโซเลท

B. thuringiensis จำนวน 121 ไอโซเลท สร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ แต่ต่างกันที่ขนาดของผลึกโปรตีน และบางไอโซเลทมีผลึกโปรตีนรูปร่างอื่นๆ ร่วมอยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bernhard *et al.* (1997) ที่รายงานว่าผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ เป็นผลึกโปรตีนที่มีความถี่ในการพบมากที่สุด โดยในการศึกษาพบผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ 46 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พบผลึกโปรตีนรูปกลมเพียง 14 เปอร์เซ็นต์ และอีก 4 เปอร์เซ็นต์เป็นผลึกโปรตีนรูปลูกบาศก์ พร้อมด้วยการรายงานของ Isanont *et al.* (1997) ที่รายงานว่า *B. thuringiensis* ส่วนมากสร้างผลึกโปรตีนรูปร่างปิรามิดคู่ และพบว่าภายในสายพันธุ์เดียวกันจะสร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ที่มีรูปร่างหลายขนาด นอกจากนี้ลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีนอาจเป็นลักษณะของประจำสายพันธุ์ เช่น *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki, alesti, kenyae, galleriae, tolworthi, kumamotoensis* และ *tochigiensis* จะสร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ และมีหลายขนาด แต่แตกต่างจากการรายงานของ Apaydin *et al.* (2005) ที่แยก *B. thuringiensis* 163 ไอโซเลทจากเมล็ดพันธุ์พืชในประเทศตุรกีพบว่า 36 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลททั้งหมดสร้างผลึกโปรตีนรูปกลม 5 เปอร์เซ็นต์สร้างผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ 9 เปอร์เซ็นต์สร้างผลึกโปรตีนรูปร่างไม่แน่นอน 19 เปอร์เซ็นต์สร้างผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์และรูปกลม ขณะที่สร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่เพียง 2 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ Kim (2000) แยก *B. thuringiensis* จากโรงเรือนเลี้ยงไหม โรงเก็บผลิตผล และตัวอย่างดินพบว่าผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน และรูปกลมเป็นผลึกโปรตีนที่พบมากที่สุด

ไอโซเลทที่สร้างผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ อยู่ร่วมกับผลึกโปรตีนชนิดอื่นๆ ในไอโซเลทเดียวกันได้แก่ไอโซเลท JCPT3, JCPT9, JCPT10, JCPT11, JCPT12, JCPT15, JCPT19, JCPT38, JCPT39, JCPT44, JCPT45, JCPT46, JCPT 66, JCPT71, JCPT74, JCPT94, JCPT95, JCPT105, JCPT106 และ JCPT121 โดยผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ในไอโซเลทเหล่านี้ มีขนาดใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Attathom *et al*. (1997) ที่รายงานว่าผลึกโปรตีนรูปสี่เหลี่ยมลูกบาศก์ มักพบว่ามีขนาดที่ไม่หลากหลายเมื่อเทียบกับผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่และผลึกโปรตีนรูปกลม การศึกษารูปร่างลักษณะของผลึกโปรตีน เป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญอย่างยิ่งในการคัดเลือก *B. thuringiensis* ออกจากแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (Bernhard *et al*., 1997) และลักษณะของผลึกโปรตีนจะให้ข้อมูลเกี่ยวกับแมลงเป้าหมาย เช่นผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่จะเป็นพิษกับแมลงในกลุ่มหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera เป็นต้น (Maeda *et al*., 2000)

ตารางที่ 7 การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามลักษณะรูปร่าง และรูปแบบการอยู่ร่วมกันของผลึกโปรตีน

ลักษณะรูปร่างของผลึกโปรตีน	ขนาดและรูปแบบการอยู่ร่วมกันของผลึกโปรตีนและสปอร์	ไอโซเลท	รวม
ปิรามิดคู่	ผลึกโปรตีนขนาดเล็กอยู่เป็นอิสระจากสปอร์	JCPT43, JCPT80, JCPT86, JCPT15	4
ปิรามิดคู่	ผลึกโปรตีนขนาดเล็กติดที่ปลายสปอร์ (crystal protein in exosporium)	JCPT1, JCPT2, JCPT4, JCPT20, JCPT21, JCPT22, JCPT23, JCPT24, JCPT25, JCPT26, JCPT27, JCPT28, JCPT29, JCPT30, JCPT32, JCPT33, JCPT34, JCPT35, JCPT36, JCPT37, JCPT39, JCPT40, JCPT41, JCPT42, JCPT47, JCPT48, JCPT49, JCPT50, JCPT51, JCPT52, JCPT53, JCPT54, JCPT55, JCPT56, JCPT57, JCPT58, JCPT59, JCPT60, JCPT61, JCPT63, JCPT67, JCPT68, JCPT69, JCPT81, JCPT83, JCPT84, JCPT87, JCPT90, JCPT91, JCPT92, JCPT93, JCPT96, JCPT98, JCPT101, JCPT104, JCPT107, JCPT110, JCPT111, JCPT114, JCPT117, JCPT119, JCPT120	62
ปิรามิดคู่	ผลึกโปรตีนขนาดเล็กและผลึกโปรตีนขนาดใหญ่อยู่เป็นอิสระจากสปอร์	JCPT5, JCPT6, JCPT7, JCPT8, JCPT13, JCPT14, JCPT16, JCPT17, JCPT18, JCPT62, JCPT64, JCPT65, JCPT70, JCPT72, JCPT73, JCPT75, JCPT76, JCPT77, JCPT78, JCPT79, JCPT82, JCPT85, JCPT88, JCPT89, JCPT97, JCPT99, JCPT100, JCPT102, JCPT103, JCPT108, JCPT109, JCPT112, JCPT113, JCPT116, JCPT118	35
ปิรามิดคู่ รูปกลม สี่เหลี่ยมลูกเต๋า ผลึกมีรูปร่างไม่แน่นอน	ผลึกโปรตีนทุกแบบมีขนาดหลากหลายอยู่ร่วมกันและเป็นอิสระจากสปอร์	JCPT3, JCPT9, JCPT10, JCPT11, JCPT12, JCPT15, JCPT19, JCPT38, JCPT39, JCPT44, JCPT45, JCPT46, JCPT66, JCPT71, JCPT74, JCPT94, JCPT95, JCPT105, JCPT106, JCPT121	20
		รวม	121



<u>ภาพที่ 3</u> ภาพถ่ายจากกล้อง Scanning Electron Microscope (SEM)แสดงลักษณะรูปร่าง และการอยู่ร่วมกันของสปอร์และผลึกโปรตีนของ *Bacillus thuringiensis*

ก ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ขนาดเล็ก อยู่เป็นอิสระกับสปอร์ของไอโซเลท JCPT43 (กำลังขยาย 4000 เท่า)

ข ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ขนาดเล็กติดที่ปลายสปอร์ (crystal protein in exosporium) ของไอโซเลท JCPT86 (กำลังขยาย 6000 เท่า)

ค ผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ขนาดเล็ก ขนาดใหญ่ติดที่ปลายสปอร์ของไอโซเลท JCPT68 (กำลังขยาย 6000 เท่า)

ง ผลึกโปรตีนหลายรูปร่าง ขนาดต่างกันอยู่เป็นอิสระจากสปอร์ของไอโซเลท JCPT89 (กำลังขยาย 6000 เท่า)

2. <u>การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus thuringiensis* ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในห้องปฏิบัติการ</u>

B. thuringiensis 121 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์และผลึกโปรตีน ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นแรกกับหนอนกระทู้ผักพบว่าทุกไอโซเลทมีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผัก เมื่อแบ่งกลุ่มตามประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้ผักพบว่า *B. thuringiensis* มีฤทธ์ในการฆ่าหนอนกระทู้ผักตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์มี 45 ไอโซเลท (37.19%) หนอนกระทู้ผักตายที่ 90-99 เปอร์เซ็นต์มี 9 ไอโซเลท (7.43 %) หนอนกระทู้ผักตายที่ 80-89 เปอร์เซ็นต์มี 8 ไอโซเลท (6.61%) หนอนกระทู้ผักตายที่ 70-79 เปอร์เซ็นต์มี 8 ไอโซเลท (6.61%) หนอนกระทู้ผักตายที่ 60-69 เปอร์เซ็นต์มี 3 ไอโซเลท (2.48%) หนอนกระทู้ผักตายที่ 50-59 เปอร์เซ็นต์มี 15 ไอโซเลท (12.39%) และในการศึกษานี้ไอโซเลทที่ทำให้หนอนผีเสื้อตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวน 45 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สอง เพื่อหาค่าความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* ที่ทำให้หนอนกระทู้ผักตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) (ตารางที่ 7)

การทดสอบประสิทธิภาพขั้นแรกกับหนอนกระทู้หอม พบว่า *B. thuringiensis* มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้หอมตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์มี 47 ไอโซเลท (38.84%) หนอนกระทู้หอมตายที่ 90-99 เปอร์เซ็นต์ มี 9 ไอโซเลท (7.44 %) หนอนกระทู้หอมตายที่ 80-89 เปอร์เซ็นต์มี 7 ไอโซเลท (5.79%) หนอนกระทู้หอมตายที่ 60-69 เปอร์เซ็นต์ มี 4 ไอโซเลท (3.30%) หนอนกระทู้หอมตายที่ 50-59 เปอร์เซ็นต์มี 8 ไอโซเลท (6.61%) และนำไอโซเลทที่ทำให้เกิดการตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์จำนวน 47 ไอโซเลท นำมาทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สอง (ตารางที่ 8)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นแรกของ *B. thuringiensis* กับหนอนใยผัก โดยทดสอบทั้งหมด 56 ไอโซเลท ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอมตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากหนอนใยผักเป็นหนอนผีเสื้อที่มีความทนทานต่อพิษของผลึกโปรตีนมากกว่าหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นแรก พบว่า *B. thuringiensis* มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนใยผักตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์มี 25 ไอโซเลท (44.64%) กลุ่มที่ทำหนอนใยผักตายที่ 90-99 เปอร์เซ็นต์มี 5 ไอโซเลท (8.92%) กลุ่มที่ทำให้หนอนใยผักตายที่ 80-89 เปอร์เซ็นต์มี 12 ไอโซเลท (21.43%) กลุ่มที่ทำให้หนอนใยผักตายที่ 70-79 เปอร์เซ็นต์มี 11 ไอโซเลท (19.64%) กลุ่มที่ทำให้หนอนใยผักตายที่ 50-69 เปอร์เซ็นต์ มี 3 ไอโซเลท โดยเปอร์เซ็นต์ตายต่ำสุดคือ 53.33

เปอร์เซ็นต์นำ 25 ไอโซเลทที่ทำให้หนอนใยผักตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สอง

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพขั้นแรกของ *B. thuringiensis* พบว่าทุกไอโซเลทมีพิษต่อหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก โดยทั้งหมด 56 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 46.28 มีพิษสูงทำให้หนอนทั้ง 3 ชนิดมีเปอร์เซ็นต์ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในการทดสอบขั้นที่สองเป็นการคัดเลือก *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก โดยทำให้เกิดการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ นำมาศึกษาหาค่าความเข้มข้นของ *B. thuringiensis* ที่ทำให้หนอนผีเสื้อทดสอบตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สองกับหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ และวิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม Probit Analysis ได้ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ไอโซเลท JCPT16, JCPT66, JCPT74, JCPT88 และ JCPT94 มีค่า LC_{50} 2.78×10^{5}, 2.43×10^{4}, 1.57×10^{4}, 2.25×10^{4} และ 2.51×10^{4} สปอร์/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 10) ขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สองกับหนอนกระทู้หอม พบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JCPT9, JCPT16, JCPT18, JCPT65, JCPT74 และ JCPT89 มีค่า LC_{50} 1.89×10^{4}, 2.16×10^{4}, 3.74×10^{4}, 5.4×10^{3}, 2.27×10^{4} และ 1.03×10^{4} สปอร์/มล. ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สองกับหนอนใยผัก พบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงจำนวน 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JCPT7, JCPT16, JCPT18, JCPT64, JCPT68, JCPT74 และ JCPT89 มีค่า LC_{50} 4.08×10^{-2}, 4.19×10^{-1}, 4.11×10^{-3}, 5.26×10^{-1}, 2.06×10^{-1}, 1.13×10^{-2} และ 2.98×10^{-1} สปอร์/มล.ตามลำดับ (ตารางที่ 12) โดยทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพและสร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ ซึ่งมีการรายงานว่า *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพดีในการควบคุมหนอนผีเสื้อมักสร้างผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ Bernhard *et al.* (1997) ทำการแยกเชื้อ *B. thuringiensis* 2793 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 80 ประเทศพบว่า 45 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลททั้งหมดมีผลต่อหนอนกระทู้ผัก และสร้างผลึกโปรตีนรูปร่างปิระมิดคู่ และ10.7 เปอร์เซ็นต์ของไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพ สร้างผลึกโปรตีนที่ไม่สามารถระบุรูปร่าง (irregularly pointed) Hansen *et al.* (1998) รายงานว่าผลึกโปรตีนรูปปิรามิดคู่ มีผลทำให้หนอนกะหล่ำ *(Pieris brassicae)* และหนอนคืบกะหล่ำตายมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ผลึกโปรตีนรูปกลมไม่มีผลต่อหนอนทั้งสองชนิดนี้

B. thuringiensis ทุกไอโซเลทที่แยกได้ในจังหวัดกระบี่มีพิษกับหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก ซึ่งในการทดลองของนักวิจัยบางท่านที่แยก *B. thuringiensis* จากในพื้นที่ต่างๆ พบว่าบางไอโซเลทไม่มีพิษกับแมลงทดสอบ เช่น Ohba (1996) รายงานว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของ *B. thuringiensis* 186 ไอโซเลท ไม่มีความเป็นพิษกับหนอนไหม (*Bombyx mori*) หรือ ลูกน้ำยุงลาย (*Aedes aegypti*) Mizuki *et al*. (1999) รายงานว่า 76 เปอร์เซ็นต์ของ *B. thuringiensis* จำนวน 120 ไอโซเลท ไม่มีความเป็นพิษกับลูกน้ำยุงรำคาญ (*Culex pipiens*) ลูกน้ำยุงก้นปล่อง (*Anopheles stephensi*) และหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ซึ่ง Maduell *et al*. (2002) ให้ข้อเสนอว่าความแตกต่างนี้ อาจเกิดจากใช้แมลงต่างชนิดกันในการทดสอบประสิทธิภาพ หรือความแตกต่างในการกระจายตัวของจีโนไทป์ของ *B. thuringiensis* เช่นยีนที่สร้างผลึกโปรตีน (*cry* gene) และความหลากหลายทางชีวภาพซึ่งมีสูงมากในประเทศเขตร้อน

ตารางที่ 8 การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)

เปอร์เซ็นต์ตาย	ไอโซเลท	รวม
100	JCPT1, JCPT2, JCPT5, JCPT7, JCPT8, JCPT10, JCPT11, JCPT12, JCPT13, JCPT14, JCPT15, JCPT16, JCPT17, JCPT18, JCPT19, JCPT20, JCPT38, JCPT64, JCPT66, JCPT70, JCPT71, JCPT72, JCPT74, JCPT75, JCPT77, JCPT78, JCPT79, JCPT82 , JCPT84, JCPT88, JCPT89, JCPT90, JCPT94, JCPT95, JCPT97, JCPT99, JCPT102, JCPT103, JCPT106, JCPT108, JCPT109, JCPT110, JCPT111, JCPT113, JCPT118	45
90-99	JCPT3, JCPT46, JCPT53, JCPT56, JCPT76, JCPT100, JCPT116, JCPT117, JCPT121	9
80-89	JCPT6, JCPT9, JCPT22, JCPT30, JCPT52, JCPT57, JCPT68, JCPT120	8
70-79	JCPT23, JCPT32, JCPT40, JCPT41, JCPT44, JCPT45, JCPT54, JCPT58	8
60-69	JCPT86, JCPT101, JCPT107	3
50-59	JCPT24, JCPT25, JCPT31, JCPT36, JCPT37, JCPT39, JCPT55, JCPT59, JCPT60, JCPT62, JCPT65, JCPT67, JCPT69, JCPT81, JCPT98	15
ต่ำกว่า 50	JCPT4, JCPT21, JCPT26, JCPT27, JCPT28, JCPT29, JCPT33, JCPT34, JCPT35, JCPT42, JCPT43, JCPT47, JCPT48, JCPT49, JCPT50, JCPT51, JCPT61, JCPT63, JCPT73, JCPT80, JCPT83, JCPT85, JCPT87, JCPT91, JCPT92, JCPT93, JCPT96, JCPT104, JCPT105, JCPT112, JCPT114, JCPT115, JCPT119	33

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)

เปอร์เซ็นต์ตาย	ไอโซเลท	รวม
100	JCPT3, JCPT5, JCPT6, JCPT7, JCPT8, JCPT9, JCPT11, JCPT12, JCPT13, JCPT14, JCPT15, JCPT16, JCPT17, JCPT18, JCPT19, JCPT44, JCPT45, JCPT65, JCPT66, JCPT68, JCPT70, JCPT71, JCPT72, JCPT74, JCPT75, JCPT77, JCPT78, JCPT79, JCPT82, JCPT84, JCPT88, JCPT89, JCPT99, JCPT102, JCPT103, JCPT104, JCPT105, JCPT106, JCPT108, JCPT109, JCPT110, JCPT111, JCPT112, JCPT113, JCPT116, JCPT118, JCPT121	47
90-99	JCPT1, JCPT2, JCPT4, JCPT10, JCPT20, JCPT21, JCPT62, JCPT81, JCPT87	9
80-89	JCPT38, JCPT46, JCPT90, JCPT93, JCPT94, JCPT95, JCPT97	7
70-79	-	0
60-69	JCPT33, JCPT36, JCPT60, JCPT73	4
50-59	JCPT27, JCPT28, JCPT32, JCPT39, JCPT67, JCPT83, JCPT91, JCPT92	8
ต่ำกว่า 50	JCPT22, JCPT23, JCPT24, JCPT25, JCPT26, JCPT29, JCPT30, JCPT31, JCPT34, JCPT35, JCPT37, JCPT40, JCPT41, JCPT42, JCPT43, JCPT47, JCPT48, JCPT49, JCPT50, JCPT51, JCPT52, JCPT53, JCPT54, JCPT55, JCPT56, JCPT57, JCPT58, JCPT59, JCPT61, JCPT63, JCPT64, JCPT69, JCPT76, JCPT80, JCPT85, JCPT86, JCPT96, JCPT98, JCPT100, JCPT101, JCPT107, JCPT114, JCPT115, JCPT117, JCPT119, JCPT120	46

ตารางที่ 10 การจัดกลุ่มไอโซเลทของ *Bacillus thuringiensis* ตามประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผัก (*Plutella xylostella)*

เปอร์เซ็นต์ตาย	ไอโซเลท	รวม
100	JCPT3, JCPT5, JCPT6, JCPT7, JCPT11, JCPT15, JCPT16, JCPT18, JCPT20, JCPT64, JCPT65, JCPT68, JCPT70, JCPT71, JCPT72, JCPT74, JCPT75, JCPT82, JCPT89, JCPT94, JCPT99, JCPT106, JCPT112, JCPT116, JCPT121	25
90-99	JCPT10, JCPT13, JCPT103, JCPT105, JCPT111	5
80-89	JCPT9, JCPT12, JCPT14, JCPT19, JCPT88, JCPT90, JCPT95, JCPT97, JCPT102, JCPT108, JCPT110, JCPT113	12
70-79	JCPT1, JCPT8, JCPT17, JCPT38, JCPT45, JCPT66, JCPT78, JCPT79, JCPT104, JCPT109, JCPT118	11
50-69	JCPT2, JCPT44, JCPT77	3

<u>ตารางที่ 11</u> ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

Isolates No.	LC_{50}(spore/ml)	95% Fiducial limits		Slope
		Lower	Upper	(mean±SE)
JCPT1	4.6×10^{6}	3.864×10^{5}	1.010×10^{10}	0.262±0.084
JCPT 2	1.2×10^{6}	1.763×10^{5}	3.840×10^{7}	0.334±0.093
JCPT 5	3.69×10^{6}	1.266×10^{6}	1.159×10^{8}	0.733±0.126
JCPT 7	4.3×10^{4}	1.588×10^{4}	1.150×10^{5}	0.875±0.145
JCPT 8	1.79×10^{6}	4.837×10^{5}	1.167×10^{7}	0.549±0.113
JCPT 10	3.89×10^{6}	5.943×10^{5}	1.860×10^{8}	0.366±0.096
JCPT 11	2.17×10^{5}	1.484×10^{4}	1.406×10^{6}	0.347±0.089
JCPT 12	8.49×10^{3}	-[1]	-	0.548±0.224
JCPT 13	9.89×10^{5}	6.741×10^{4}	1.437×10^{7}	0.287±0.085
JCPT 14	1.85×10^{6}	3.215×10^{5}	4.154×10^{7}	0.379±0.094
JCPT 15	6.54×10^{4}	2.171×10^{4}	2.049×10^{5}	0.700±0.118
JCPT 16	2.78×10^{5}	6.881×10^{4}	1.395×10^{6}	0.493±0.098
JCPT 17	1.04×10^{6}	1.737×10^{5}	2.033×10^{7}	0.361±0.091
JCPT 18	3.36×10^{4}	0.00	4.48×10^{25}	0.637±0.269
JCPT 19	4.19×10^{4}	1.457×10^{4}	1.172×10^{5}	0.796±0.133
JCPT 20	4.52×10^{6}	7.187×10^{5}	1.939×10^{8}	0.381±0.097
JCPT 38	9.88×10^{4}	0.00	9.243×10^{24}	0.823±0.314
JCPT 64	3.34×10^{6}	3.651×10^{5}	9.847×10^{8}	0.292±0.089
JCPT 66	2.43×10^{4}	-[1]	-	0.609±0.257
JCPT 70	1.76×10^{6}	2.245×10^{5}	1.269×10^{8}	0.311±0.089
JCPT 71	3.46×10^{4}	-[1]	-	0.686±0.240
JCPT 72	2.16×10^{5}	3.881×10^{4}	1.602×10^{6}	0.394±0.091
JCPT 74	1.57×10^{4}	4.131×10^{3}	4.988×10^{4}	0.645±0.117
JCPT 75	5.32×10^{4}	0	7.271×10^{18}	0.662±0.305
JCPT 77	3.03×10^{5}	6.304×10^{4}	2.034×10^{6}	0.428±0.093

[1] Fiducial limit could not be generated

ตารางที่ 11 (ต่อ)

Isolates No.	LC_{50}(spore/ml)	95% Fiducial limits		Slope
		Lower	Upper	(mean±SE)
JCPT 78	2.37×10^{5}	-[1]	-	0.602±0.237
JCPT 79	6.79×10^{4}	1.616×10^{4}	2.676×10^{5}	0.522±0.093
JCPT 82	6.37×10^{4}	-[1]	-	0.768±0.267
JCPT 84	1.64×10^{5}	3.524×10^{4}	8.708×10^{5}	0.452±0.094
JCPT 88	2.25×10^{4}	2.033×10^{3}	9.352×10^{4}	0.527±0.118
JCPT 89	1.37×10^{5}	-[1]	-	±
JCPT 90	2.19×10^{6}	2.285×10^{5}	5.049×10^{8}	0.282±0.088
JCPT 94	2.51×10^{4}	-[1]	-	0.657±0.229
JCPT 95	7.35×10^{4}	1.302×10^{4}	2.635×10^{5}	0.562±0.113
JCPT 97	4.943×10^{4}	1.813×10^{4}	1.332×10^{5}	0.861±0.145
JCPT 99	2.63×10^{5}	7.462×10^{4}	1.055×10^{6}	0.569±0.104
JCPT 102	7.33×10^{4}	0	7.264×10^{20}	0.761±0.292
JCPT 103	2.64×10^{5}	6.979×10^{4}	1.180×10^{6}	0.527±0.101
JCPT 106	9.88×10^{4}	0	3.285×10^{20}	0.823±0.314
JCPT 108	1.50×10^{5}	4.09×10^{4}	5.879×10^{5}	0.555±0.102
JCPT 109	8.63×10^{6}	1.11×10^{6}	1.155×10^{9}	0.356±0.098
JCPT 110	3.21×10^{6}	5.671×10^{5}	7.261×10^{7}	0.405±0.091
JCPT 111	2.67×10^{6}	4.669×10^{5}	6.685×10^{7}	0.390±0.097
JCPT 113	1.41×10^{7}	1.474×10^{6}	6.989×10^{9}	0.332±0.098
JCPT 118	3.89×10^{6}	5.493×10^{5}	1.860×10^{8}	0.366±0.096

[1] Fiducial limit could not be generated

ตารางที่ 12 ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

Isolates No.	LC_{50}(spore/ml)	95% Fiducial limits		Slope
		Lower	Upper	(mean±SE)
JCPT 3	7.6×10^{4}	6.279×10^{3}	7.621×10^{5}	0.312±0.087
JCPT 5	1.34×10^{6}	3.633×10^{5}	8.127×10^{6}	0.543±0.110
JCPT 6	4.94×10^{4}	1.813×10^{4}	1.331×10^{5}	0.861±0.145
JCPT 7	1.10×10^{5}	0	1.869×10^{18}	0.689±0.400
JCPT 8	1.28×10^{5}	-[1]	-	0.517±0.206
JCPT 9	1.89×10^{4}	5.443×10^{3}	5.769×10^{4}	0.683±0.121
JCPT 11	8.38×10^{5}	1.34×10^{5}	1.64	0.350±0.091
JCPT 12	4.12×10^{6}	5.199×10^{5}	4.852×10^{8}	0.326±0.093
JCPT 13	4.03×10^{7}	2.317×10^{6}	3.172×10^{12}	0.278±0.095
JCPT 14	7.99×10^{4}	2.730×10^{4}	2.321×10^{5}	0.754±0.125
JCPT 15	1.28×10^{5}	0	2.376×10^{17}	0.746±0.403
JCPT 16	2.16×10^{4}	0	1.698×10^{23}	0.521±0.333
JCPT 17	2.17×10^{3}	2.179×10^{3}	3.659×10^{4}	0.578±0.112
JCPT 18	3.74×10^{4}	1.392×10^{4}	9.919×10^{4}	0.890±0.152
JCPT 19	1.12×10^{5}	3.536×10^{4}	3.823×10^{5}	0.641±0.110
JCPT 44	3.74×10^{4}	-[1]	-	0.465±0.202
JCPT 45	5.22×10^{4}	0	1.703×10^{19}	0.615±0.334
JCPT 65	5.4×10^{3}	1.327×10^{3}	1.96×10^{4}	0.558±0.103
JCPT 66	3.36×10^{5}	1.03×10^{5}	1.25×10^{6}	0.617±0.110
JCPT 68	1.10×10^{5}	0	1.869×10^{18}	0.689±0.400
JCPT 70	3.00×10^{4}	9.191×10^{3}	9.032×10^{3}	0.697±0.120
JCPT 71	7.33×10^{4}	0	7.264×10^{20}	0.760±0.292
JCPT 72	3.41×10^{6}	4.204×10^{5}	4.162×10^{8}	0.317±0.091
JCPT 74	2.27×10^{4}	8.817×10^{3}	5.893×10^{4}	0.950±0.165
JCPT 75	7.73×10^{6}	-[1]	-	0.154±0.084

[1] Fiducial limit could not be generated

ตารางที่ 12 (ต่อ)

Isolates No.	LC_{50}(spore/ml)	95% Fiducial limits		Slope
		Lower	Upper	(mean±SE)
JCPT 77	5.63×10^{5}	1.114×10^{5}	5.264×10^{6}	0.406±0.093
JCPT 78	2.53×10^{5}	-[1]	-	0.522±0.221
JCPT 79	3.64×10^{7}	2.265×10^{6}	1.216×10^{12}	0.286±0.096
JCPT 82	4.00×10^{3}	1.023×10^{3}	1.390×10^{4}	0.578±0.105
JCPT 84	3.38×10^{2}	5.4×10^{1}	1.169×10^{3}	0.610±0.129
JCPT 88	3.47×10^{4}	1.198×10^{4}	9.705×10^{4}	0.795±0.135
JCPT 89	1.03×10^{4}	2.815×10^{3}	3.107×10^{4}	0.698±0.129
JCPT 99	8.54×10^{3}	2.079×10^{5}	2.661×10^{4}	0.661±0.126
JCPT 102	5.02×10^{5}	8.74×10^{4}	5.88×10^{6}	0.372±0.091
JCPT 103	2.71×10^{5}	4.40×10^{4}	2.63×10^{6}	0.366±0.089
JCPT 104	4.14×10^{6}	1.930×10^{5}	1.480×10^{14}	0.203±0.085
JCPT 105	1.57×10^{8}	6.495×10^{6}	3.090×10^{14}	0.293±0.103
JCPT 106	3.15×10^{5}	3.880×10^{4}	5.651×10^{6}	0.314±0.087
JCPT 108	1.09×10^{7}	2.023×10^{6}	1.643×10^{8}	0.387±0.093
JCPT 109	3.21×10^{5}	1.091×10^{5}	1.001×10^{6}	0.724±0.124
JCPT 110	1.63×10^{9}	-[1]	-	0.119±0.086
JCPT 111	2.65×10^{5}	2.563×10^{4}	6.573×10^{6}	0.288±0.086
JCPT 112	1.77×10^{6}	2.201×10^{5}	1.492×10^{8}	0.307±0.089
JCPT 113	2.16×10^{6}	6.295×10^{4}	2.573×10^{25}	0.175±0.084
JCPT 116	2.78×10^{5}	4.566×10^{4}	2.678×10^{6}	0.368±0.089
JCPT 118	4.32×10^{5}	1.280×10^{5}	1.749×10^{6}	0.593±0.108
JCPT 121	6.61×10^{5}	1.778×10^{5}	3.466×10^{6}	0.530±0.104

[1] Fiducial limit could not be generated

ตารางที่ 13 ค่าความเข้มข้นของ *Bacillus thuringiensis* ที่ทำให้หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50})

Isolates No.	LC_{50}(spore/ml)	95% Fiducial limits		Slope
		Lower	Upper	(mean±SE)
JCPT 3	6.38×10^{4}	1.141×10^{4}	2.242×10^{4}	0.577±0.116
JCPT 5	0.52×10^{-1}	0	3.020×10^{2}	0.320±0.132
JCPT 6	1.03×10^{1}	0	2.744×10^{2}	0.481±0.219
JCPT 7	4.08×10^{-2}	-[1]	-	0.273±0.163
JCPT 11	5.39×10^{3}	2.40×10^{2}	3.110×10^{4}	0.379±0.095
JCPT 15	1.45×10^{4}	0	7.68×10^{28}	0.471±0.329
JCPT 16	4.19×10^{-1}	0	3.13×10^{1}	0.297±0.123
JCPT 18	4.11×10^{-3}	-[1]	-	0.225±0.128
JCPT 20	0.16×10^{-1}	-[1]	-	0.126±0.088
JCPT 64	5.26×10^{-1}	0	3.210×10^{1}	0.324±0.132
JCPT 65	1.99×10^{3}	1.889×10^{2}	8.018×10^{3}	0.549±0.123
JCPT 68	2.06×10^{-1}	-[1]	-	0.177±0.100
JCPT 70	1.76×10^{2}	-[1]	-	0.360±0.228
JCPT 71	0.35×10^{-1}	0	2.083×10^{2}	0.376±0.166
JCPT 72	2.73×10^{1}	0	3.887×10^{2}	0.532±0.223
JCPT 74	1.13×10^{-2}	-[1]	-	0.075±0.086
JCPT 75	4.11×10^{1}	2.500×10^{-4}	6.910×10^{2}	0.394±0.135
JCPT 82	3.52×10^{2}	-[1]	-	0.372±0.239
JCPT 89	2.98×10^{-1}	-[1]	-	0.213±0.110
JCPT 94	3.59×10^{1}	3×10^{-4}	8.150×10^{2}	0.339±0.118
JCPT 99	1.18×10^{3}	-[1]	-	0.398±0.259
JCPT 106	0.42×10^{-1}	0	3.133×10^{2}	0.296±0.123
JCPT 112	1.22×10^{4}	-[1]	-	0.566±0.235
JCPT 116	9.53×10^{1}	3.00×10^{-2}	9.071×10^{2}	0.473±0.152
JCPT 121	3.85×10^{3}	2.849×10^{2}	1.817×10^{4}	0.450±0.103

[1] Fiducial limit could not be generated

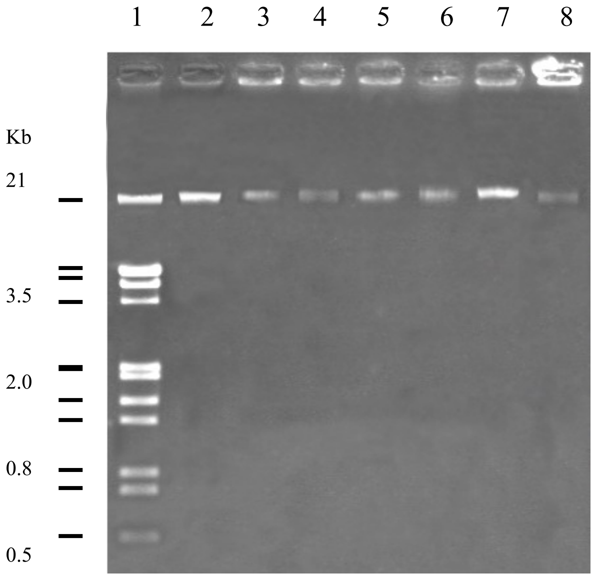
3. <u>การศึกษาชนิดของยีน *cry* ใน *Bacillus thuringiensis*</u>

จากการทดสอบประสิทธิภาพของ *B. thuringiensis* จำนวน 121 ไอโซเลท กับหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก คัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนผีเสื้อทั้ง 3 ชนิด จำนวน 7 ไอโซเลทได้แก่ JCPT7, JCPT16, JCPT18, JCPT64, JCPT68, JCPT74 และ JCPT89 นำมาตรวจสอบหายีน *cry*1 ซึ่งเป็นยีนที่สร้างผลึกโปรตีน Cry1 ที่มีความเป็นพิษกับหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera โดยสกัดโครโมโซมตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Harwood and Cutting (1990) และพลาสมิดตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Birnboin and Doly (1979) ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรเจลอิเลคโตรโฟรีซิส ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 4 และภาพที่ 5

นำโครโมโซมดีเอ็นเอ และพลาสมิดของแต่ละไอโซเลท มาวิเคราะห์หายีน *cry*1 ด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากยีน *cry*1 แบ่งเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม จึงใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะในกลุ่มของยีน *cry*1 จำนวน 15 ชนิด ได้แก่ ยีน*cry*1Aa *cry*1Ab *cry*1Ac *cry*1Ad *cry*1Ae *cry*1D *cry*1E *cry*1F *cry*1G *cry*1H *cry*1I *cry*1J และยีน*cry*1K และใช้ไพร์เมอร์ในกลุ่มยีน *cry*II คือยีน *cry*2A ยีนในกลุ่ม *cry*V คือ *cry*5, *cry*12, *cry*13A และยีน *cry*14 ซึ่งยีนเหล่านี้สร้างโปรตีนที่เป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera นอกเหนือจากยีน *cry*1 (ตารางที่ 4)

ผลการศึกษาชนิดของยีน *cry* ที่พบบนโครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* ทั้ง 7 ไอโซเลท พบผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry* จำนวน 8 ชนิดได้แก่ยีน *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*9A, *cry*9B และ *cry*2A โดยมีรายละเอียดของยีน *cry* แต่ละชนิดที่พบในไอโซเลทดังนี้ พบยีน *cry*1Ab ในไอโซเลท JCPT16, JCPT18 และ JCPT74 (ภาพที่ 6(2)) ยีน *cry*1Ac ในไอโซเลท JCPT16 (ภาพที่ 6(3)) ยีน *cry*1D ในไอโซเลท JCPT 7, JCPT18, JCPT68, JCPT74 และ JCPT89 (ภาพที่ 7(4)) ยีน *cry*9A และ *cry*9B ในไอโซเลท JCPT64 (ภาพที่ 10(1) และภาพที่ 10(2)) ขณะที่ยีน *cry*1I และ *cry*2A พบในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท JCPT64 (ภาพที่ 9(1) และ ภาพที่ 9(4))

ผลการศึกษาชนิดยีน *cry* บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* จำนวน 7 ไอโซเลท พบยีน *cry* จำนวน 7 ชนิดได้แก่ ยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I และ *cry*2A รายละเอียดของยีน *cry* แต่ละชนิด พบในไอโซเลทดังนี้ พบยีน *cry*1Aa, *cry*1I และยีน *cry*2A ในทุกไอโซเลท



<u>ภาพที่ 4</u> โครโมโซมดีเอ็นเอของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่สกัดได้จากการดัดแปลงวิธีของ Harwood and Cutting (1990)

ช่องที่ 1 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)

ช่องที่ 2 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 3 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 16

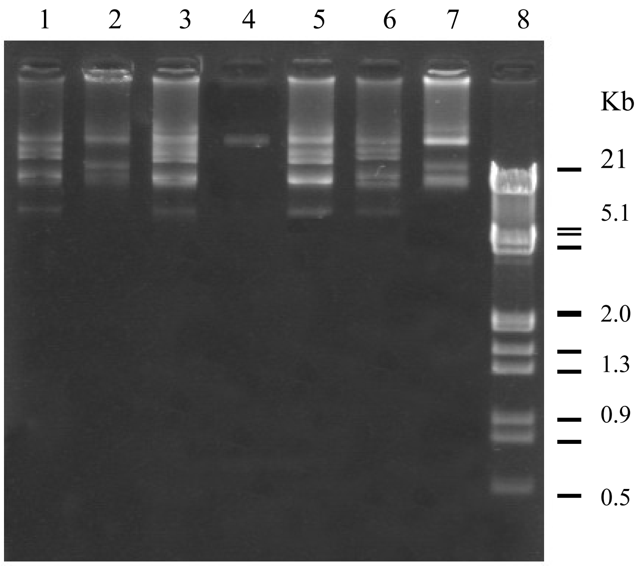
ช่องที่ 4 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 5 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 6 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 68

ช่องที่ 7 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 8 โครโมโซมดีเอ็นเอของ *B. thuringiensis* JCPT 89



<u>ภาพที่ 5</u> พลาสมิดของแบคทีเรีย *B. thuringiensis* ที่สกัดได้จากการดัดแปลงวิธีของ Birnboin and Doly (1979)

ช่องที่ 1 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 68

ช่องที่ 6 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 พลาสมิดของ *B. thuringiensis* JCPT 89

ช่องที่ 8 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)

ยกเว้นไอโซเลท JCPT64 (ภาพที่ 12 (1) ภาพที่ 15(1) และภาพที่ 15(4)) ยีน *cry*1Ab ในไอโซเลท JCPT18, JCPT68 และJCPT74 (ภาพที่ 12(2)) ยีน *cry*1Ac ในไอโซเลท JCPT16 และ JCPT89 (ภาพที่ 12(3)) และยีน *cry*1C และ *cry*1D ในไอโซเลท JCPT7, JCPT18, JCPT68 และ JCPT74 (ภาพที่ 13(3) และภาพที่ 13(4))

ยีน *cry* ที่ตรวจสอบพบทั้งหมด 9 ชนิดได้แก่ ยีน*cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D *cry*1I, *cry*2A, *cry*9A และยีน *cry*9B (ตารางที่ 14 และตารางที่ 15) มีขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR สอดคล้องกับการทดลองของ Juarez-Perez *et al.*, 1997; Masson *et al.*, 1998 และ Bravo *et al.*, 1998 ที่รายงานขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้ไพร์เมอร์ IAa และ(I-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry*1Aa ขนาด 1226 คู่เบส ไพร์เมอร์IAb และ(I-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry*1Ab ขนาด 1371 คู่เบส ไพร์เมอร์ IAc และ(I-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry*1Ac ขนาด 750 คู่เบสไพร์เมอร์ IC และ(I-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน*cry*1C ขนาด 1176 คู่เบส ไพร์เมอร์ ID และ (I-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน*cry*1D ขนาด 1138 คู่เบส ไพร์เมอร์ (V+) และ(V-) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน*cry*1I ขนาด 1371 คู่เบส ไพร์เมอร์ II(+) และII(-)จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน*cry*2A ขนาด 1556 คู่เบส ไพร์เมอร์ 9A(d) และ 9A(r) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry*9A ขนาด 571 คู่เบสไพร์เมอร์ 9B(d) และ 9B(r) จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน *cry*9B ขนาด 402 คู่เบส

ยีน *cry* ที่ตรวจสอบได้ เป็นยีนที่ตรวจพบได้บ่อยครั้ง และมีการกระจายตัวสูงเช่น ยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1Ad และ *cry*1B เป็นยีนที่ตรวจพบได้จาก *B. thuringiensis* จำนวน 40 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 54.7 จากทั้งหมด 256 ไอโซเลทที่แยกได้จากประเทศโคลัมเบีย ยีน *cry*1I ตรวจพบได้ใน *B. thuringiensis* จำนวน 95 ไอโซเลท จากทั้งหมด 115 ไอโซเลท และยีน *cry*2 จาก *B. thuringiensis* จำนวน 56 ไอโซเลทจากทั้งหมด 59 ไอโซเลทที่แยกได้จากประเทศอาร์เจนตินา โดยคิดเป็นร้อยละ 94.9 (Maduell, 2002; Song *et al.* 2003; Sauka *et al.* 2005) ขณะที่ในการวิจัยนี้ยีน *cry* ที่ไม่ตรวจพบมีจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ ยีน *cry*1Ad, *cry*1Ae, *cry*1B,, *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G, *cry*1H, *cry*1J, *cry*1K, *cry*9C, *cry*9D และยีน *cry*V ยีนบางชนิดดังที่กล่าวมาข้างต้น เป็นยีนที่มีรายงานว่ามีการกระจายตัวน้อย เช่น Wang *et al.* (2003) พบว่ายีน *cry*1B, *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G, *cry*1J, *cry*1K และยีน *cry*1H เป็นยีนที่มีการกระจายตัวน้อยในประเทศจีน และ Kim (2000) รายงานว่ายีนที่ตรวจพบได้น้อยจากตัวอย่าง *B. thuringiensis* ที่แยกได้จากโรงเรือนเลี้ยงไหม ตัวอย่างดิน และเมล็ดพันธุ์พืช ในประเทศเกาหลี คือยีน *cry*IB, *cry*IE, *cry*IG และ *cry*IV ขณะที่ไม่ตรวจพบยีน *cry*III และ *cry*V ได้

ตารางที่ 14 ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบบนโครโมโซมของ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่แยกได้จากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่า ในจังหวัดกระบี่

ไอโซเลท *Bacillus thuringiensis*	ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบ
JCPT7	*cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT16	*cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1I, *cry*2A
JCPT18	*cry*1Ab, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT64	*cry*9A, *cry*9B
JCPT68	*cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT74	*cry*1Ab, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT89	*cry*1D, *cry*1I, *cry*2A

ตารางที่ 15 ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบบนพลาสมิดของ *Bacillus thuringiensis* ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพที่แยกได้จากเขตป่าสมบูรณ์ อุทยานแห่งชาติ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าในจังหวัดกระบี่

ไอโซเลท *Bacillus thuringiensis*	ชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจพบ
JCPT7	*cry*1Aa, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT16	*cry*1Aa, *cry*1Ac, *cry*1I, *cry*2A
JCPT18	*cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT64	–
JCPT68	*cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT74	*cry*1Aa,*cry*1Ab, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*2A
JCPT89	*cry*1Aa, *cry*1Ac, *cry*1I, *cry*2A

เมื่อเปรียบเทียบความถี่ในการพบยีน *cry* บนโครโมโซม พบว่ายีน *cry*1I และ *cry*2A ตรวจพบได้ในทุกไอโซเลท ยกเว้นไอโซเลท JCPT64 การมียีน *cry*1I และยีน *cry*2A ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีน และสัมพันธ์กับความสามารถในการฆ่าหนอนใยผักทำให้ไอโซเลทเหล่านี้ มีประสิทธิภาพในการทำลายหนอนใยผักสูงกว่า JCPT64 เพราะยีน *cry*1I เป็นยีนที่มีรายงานว่าเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อ เช่น Song *et al.* (2003) รายงานว่า ยีน *cry*1I จาก *B. thuringiensis* Btc007 มีความเป็นพิษสูงกับหนอนใยผัก หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด หนอนเจาะฝักถั่ว และยีน *cry*2A มีรายงานว่าสร้างสารพิษที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอนใยผัก (Tabashnik *et al.*, 1994) นอกจากนี้บนพลาสมิดตรวจพบยีน *cry*1Aa *cry*1I และ *cry*2A ในทุกไอโซเลท ยกเว้น JCPT64 ที่ไม่พบยีน *cry* การที่ไอโซเลท JCPT64 ไม่มียีน *cry*1I และ*cry*2A อาจทำให้ประสิทธิภาพการฆ่าแมลงลดลงดังที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้การไม่พบยีน *cry* บนพลาสมิดจะทำให้การสร้างผลึกโปรตีนเกิดจากยีนบนโครโมโซมเท่านั้น อาจส่งผลให้ความสามารถในการผลิตสารพิษลดลงทำให้ฆ่าแมลงน้อยกว่าไอโซเลทที่มียีน *cry* บนพลาสมิด

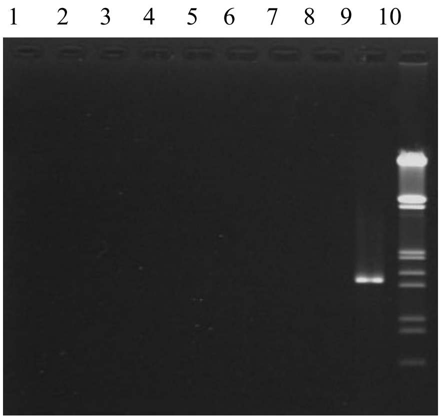
แม้ว่าไอโซเลท JCPT64 ไม่พบว่ามียีน *cry*1 เป็นองค์ประกอบ แต่ไอโซเลทนี้ถูกคัดเลือกมาจาก *B. thuringiensis* 25 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก จึงจัดได้ว่าเป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพดี ถึงแม้ว่าจะพบยีน *cry* เพียง 2 ชนิด คือ *cry*9A และ *cry*9B ก็ตาม แต่ยีน 2 ชนิดนี้สร้างพิษฆ่าหนอนผีเสื้อหลายชนิด เช่น การรายงานของ van Frankenhuyzen *et al.* (1997) ที่พบว่า *cry*9 เป็นยีนที่สร้างโปรตีนที่มีความเป็นพิษสูงกับ spruce budworm (*Choristoneura furniferano*) และมีความเป็นพิษสูงกับหนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับหนอนใยผักที่สร้างความต้านทานกับยีนในกลุ่ม *cry*1 (Jansens *et al.*, 1997)

B. thuringiensis 7 ไอโซเลทเป็นไอโซเลทที่ประสิทธิภาพสูงในการควบคุมหนอนผีเสื้อ โดยเฉพาะหนอนใยผัก โดยทุกไอโซเลทประกอบด้วยยีน *cry* ที่มีรายงาน ถึงความเป็นพิษ เช่น Tabashnik *et al.*(1994) พบว่าสารพิษที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนใยผัก คือ Cry1Aa Cry1Ab Cry1Ac Cry1B Cry1C Cry1F และ Cry2A ซึ่งไอโซเลท JCPT18 และJCPT74 เป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด (ตารางที่ 13) พบยีน *cry* ดังกล่าวจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D และ *cry*2A นอกจากการมียีนที่มีความเป็นพิษสูงแล้ว ไอโซเลทJCPT18 และJCPT74 มีชุดยีน *cry* เหมือนกันบนโครโมโซม และพลาสมิด ส่งผลให้ 2 ไอโซเลทนี้ เพิ่มโอกาสในการสร้างสารพิษได้มากกว่าการมีชุดยีนเพียงชุดเดียว ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มโอกาสในการฆ่าหนอนได้มากขึ้น สอดคล้องกับการรายงานของ Arantes and Lereclus (1991) ที่รายงานว่าการ

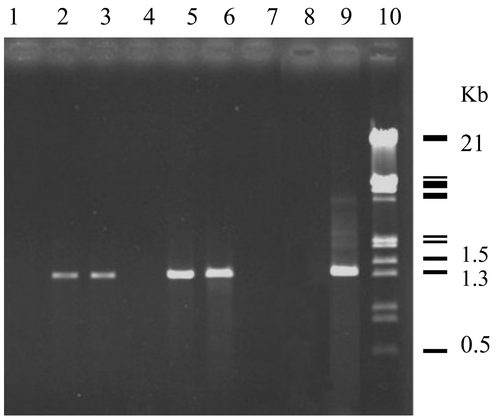
แสดงออกของยีน *cry* ใน *B. thuringiensis* ขึ้นอยู่กับจำนวนชุดของพลาสมิดที่มียีนควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนอยู่ การแสดงออกของโปรตีนใน *B. thuringiensis* จากการโคลนยีน *cry*IIIA เข้าไปในพลาสมิด ที่มีจำนวนชุดน้อยมีผลทำให้ได้ปริมาณผลึกโปรตีนต่ำไปด้วย ในทางตรงกันข้าม การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนเข้าไปในพลาสมิดที่มีจำนวนชุดสูงทำให้ได้ปริมาณผลึกโปรตีนสูง นอกจากนี้การมียีน *cry* ชนิดเดียวกันบนโครโมโซมและพลาสมิด จะสามารถเพิ่มความเสถียรภาพของการสร้างผลึกโปรตีน เนื่องจากพลาสมิดอ่อนแอต่อสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น ในสภาพการเก็บเชื้อที่ยาวนาน และมีอุณหภูมิสูง ทำให้ *B. thuringiensis* สูญเสียพลาสมิด และไม่สามารถที่จะกลับมามีพลาสมิดได้อีกต่อไป (Kanda, 1987)

อย่างไรก็ตามความสามารถในการฆ่าแมลงของ *B. thuringiensis* บางสายพันธุ์ ไม่สามารถคาดเดาจากชนิดของยีน *cry* ที่เป็นองค์ประกอบ เพราะความสามารถในการฆ่าแมลงจะสัมพันธ์กับสัดส่วนของการสร้างโปรตีน Cry แต่ละชนิด การออกฤทธิ์ร่วมกันหรือเสริมฤทธิ์กันของผลึกโปรตีน และการแสดงออกของโปรตีน Cry บางชนิดที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ ดังนั้นการทำ PCR เพื่อระบุชนิดยีน *cry* เพียงอย่างเดียว จึงไม่เพียงพอที่จะประเมินความสามารถในการฆ่าแมลงของ *B. thuringiensis* ได้อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากยีน *cry* บางชนิดเป็นยีนเงียบ (silent gene) ที่สามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิค PCR แต่มักพบว่าไม่สร้างผลึกโปรตีน เช่น ยีน *cry*1I (Choi *et al*., 2000) ซึ่ง Gleave *et al*. (1993) อธิบายว่าการที่ยีน *cry*1I เป็นยีนเงียบเนื่องจาก ตำแหน่งของยีน *cry*1I มักอยู่ในตำแหน่ง downstream ซึ่งอยู่ทางด้านปลาย 3’ ของยีน *cry*1 ดังนั้นจึงมักไม่เกิดการสร้างโปรตีน ดังนั้นวิธีการที่จะประเมินศักยภาพในการการฆ่าแมลงของ *B. thuringiensis* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือการทดสอบกับแมลงเพื่อหาปริมาณความเป็นพิษ (Martinez *et al*., 2004) แต่อย่างไรก็ตามการทดสอบประสิทธิภาพกับแมลงต้องใช้ระยะเวลานานในการเลี้ยงเพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอสำหรับใช้ในการทดสอบ และใช้เวลานานในการคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค PCR ที่สามารถทราบผลได้ในระยะเวลาอันสั้น ขั้นตอนในการทำสะดวกรวดเร็วสามารถใช้เพื่อคัดเลือกเบื้องต้น (primary screening) ในกรณีต้องการตรวจสอบ *B. thuringiensis* จำนวนมาก และการตรวจสอบยีน *cry* โดยเทคนิค PCR นั้นชนิดของยีนที่ตรวจสอบได้เป็นการยืนยันโอกาสที่ยีนจะสามารถโปรตีน Cry ได้มากกว่าการที่ไม่สามารถพบว่ามียีน *cry* อยู่ ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพกับหนอนผีเสื้อ 3 ชนิด คือ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ จากนั้นนำมาศึกษาหายีน *cry* โดยใช้เทคนิค PCR ร่วมกับไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการทำ PCR มีขนาดใกล้เคียงกับที่มีรายงานไว้ ดังนั้นชนิดของยีน *cry* ที่ตรวจสอบได้

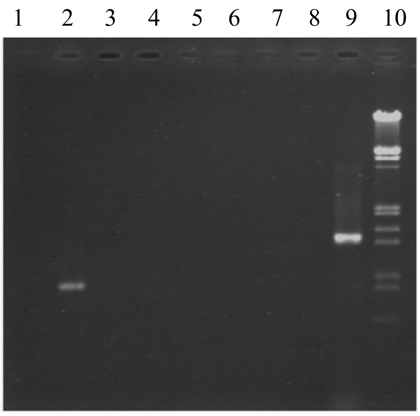
จึงเป็นข้อมูลที่ช่วยยืนยัน และสนับสนุนถึงความสามารถในการฆ่าแมลงของ *B. thuringiensis* ทั้ง 7 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนผีเสื้อทั้ง 3 ชนิดได้



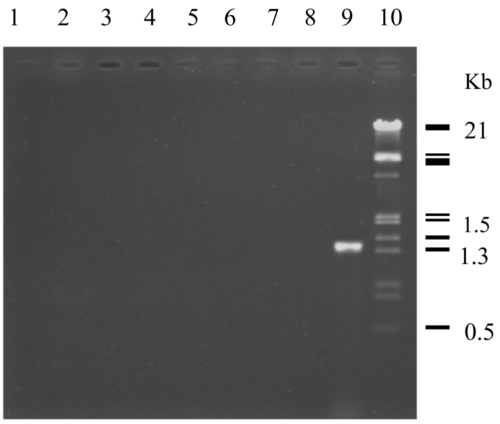
(1)ไพร์เมอร์ *cry*1Aa



(2) ไพร์เมอร์ *cry*1Ab



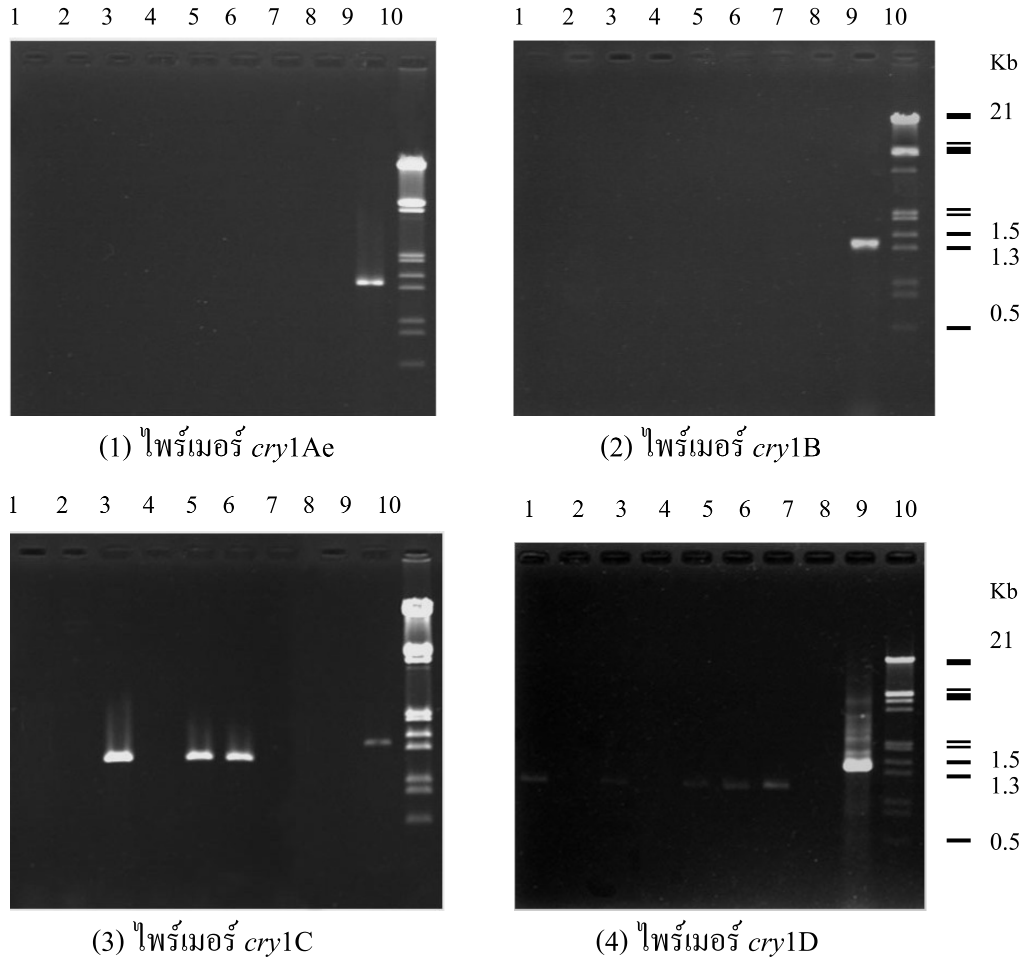
(3) ไพร์เมอร์ *cry*1Ac



(4) ไพร์เมอร์ *cry*1Ad

<u>ภาพที่ 6</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac และ *cry*1Ad บนโครโมโซมของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16
ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18
ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64
ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74
ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89
ช่องที่ 8 water control
ช่องที่ 9 positive control
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



<u>ภาพที่ 7</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Ae, *cry*1B, *cry*1C และ *cry*1Dบนโครโมโซม ของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

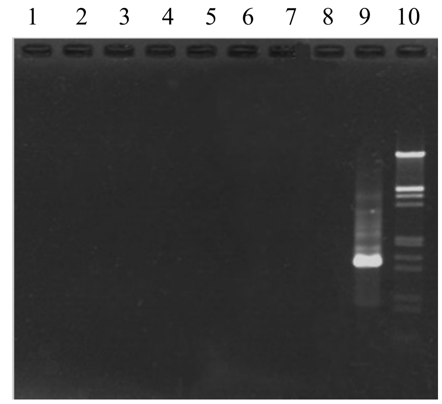
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

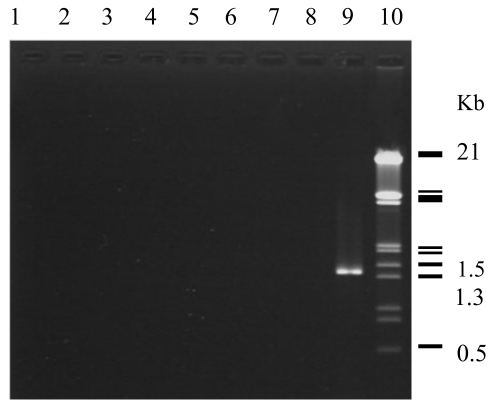
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

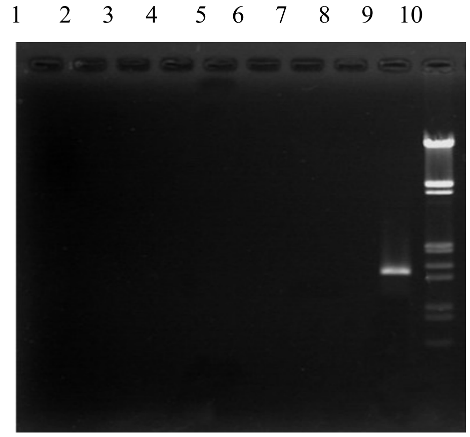
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



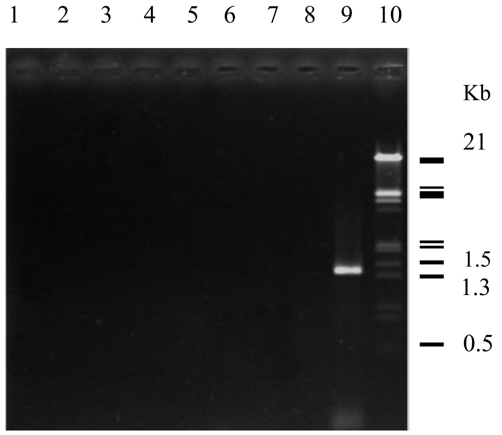
(1) ไพร์เมอร์ *cry*1E



(2) ไพร์เมอร์ *cry*1F



(3) ไพร์เมอร์ *cry*1G



(4)ไพร์เมอร์ *cry*1H

<u>ภาพที่ 8</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G และ *cry*1H บนโครโมโซมของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

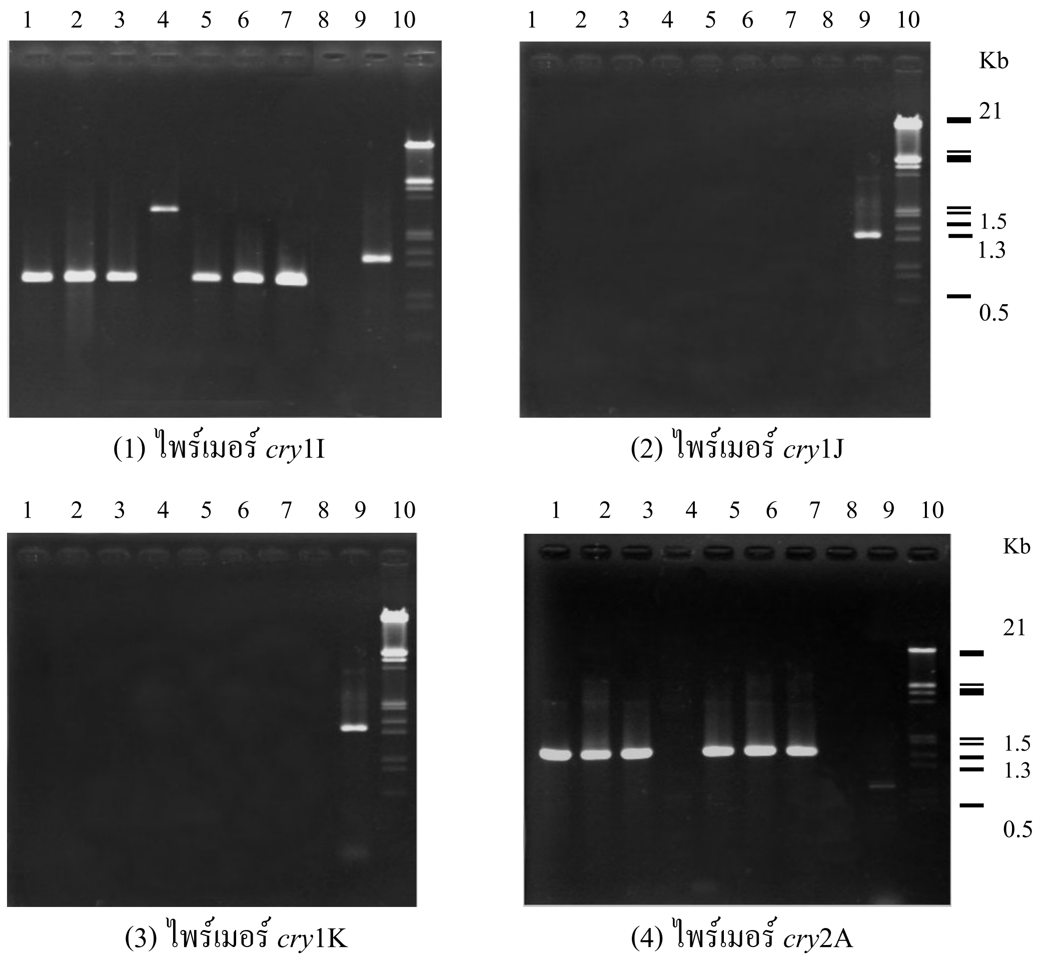
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

ช่องที่ 8 water control

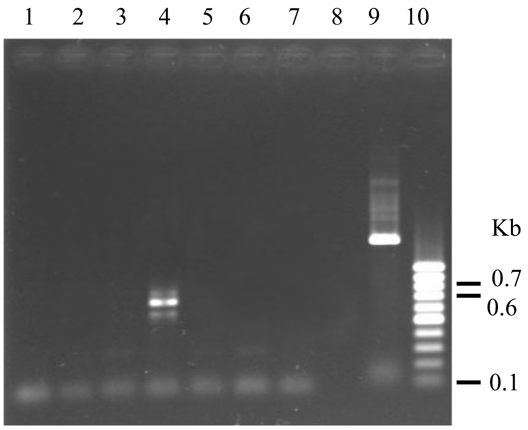
ช่องที่ 9 positive control

ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)

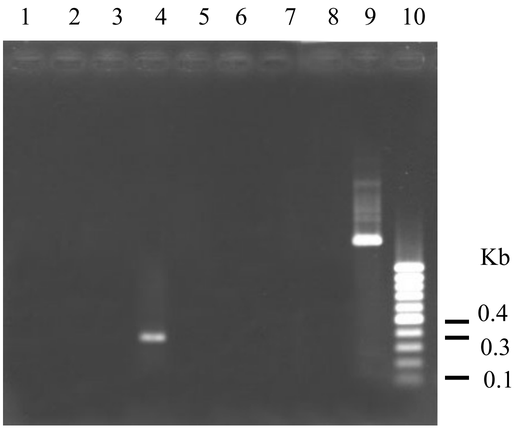


<u>ภาพที่ 9</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1I, *cry*1J, *cry*1K และ *cry*2A บนโครโมโซมของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

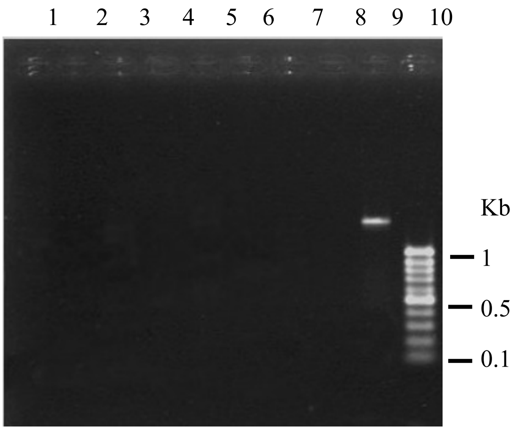
ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16
ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18
ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64
ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74
ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89
ช่องที่ 8 water control
ช่องที่ 9 positive control
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



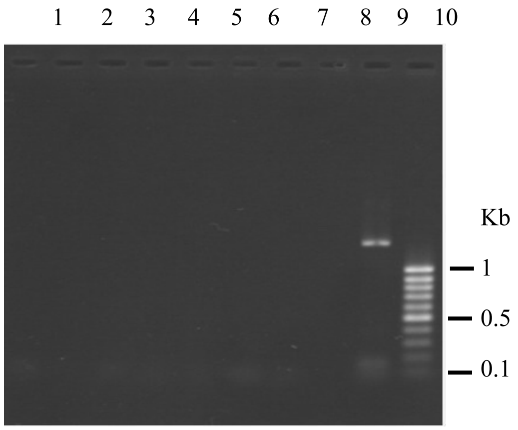
(1) ไพร์เมอร์ *cry*9A



(2) ไพร์เมอร์ *cry*9B



(3) ไพร์เมอร์ *cry*9C



(4) ไพร์เมอร์ *cry*9D

<u>ภาพที่ 10</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*9A , *cry*9B, *cry*9C และ *cry*9D บนโครโมโซมของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

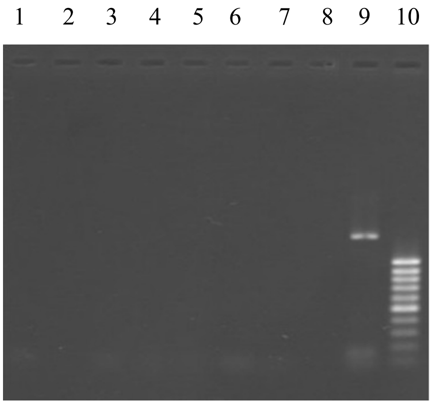
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

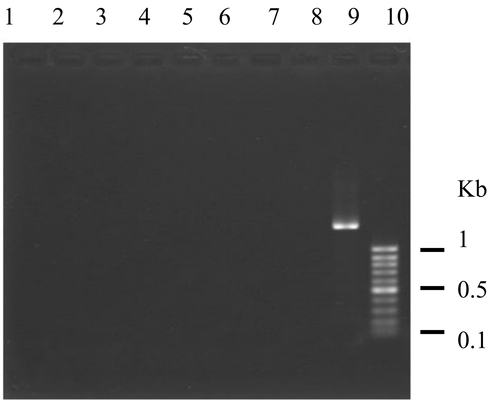
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

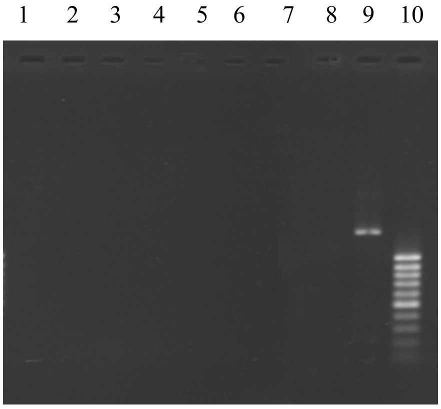
ช่องที่ 10 DNA marker (100bp DNA Ladder)



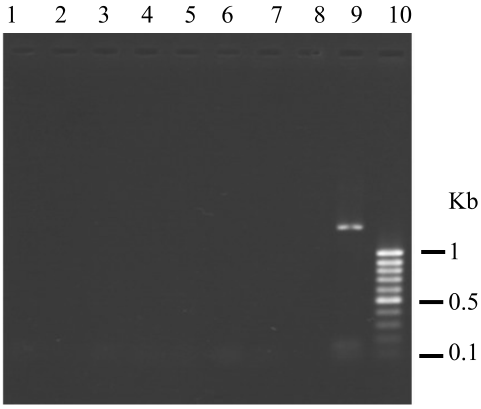
(1) ไพร์เมอร์ *cry*5



(2) ไพร์เมอร์ *cry*13A



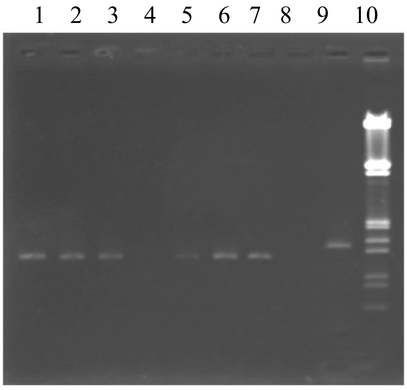
(3) ไพร์เมอร์ *cry*12



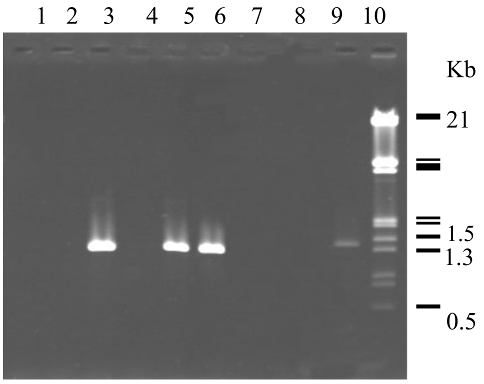
(4) ไพร์เมอร์ *cry*14

ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*5, *cry*12, *cry*13A และ *cry*14 บนโครโมโซมของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

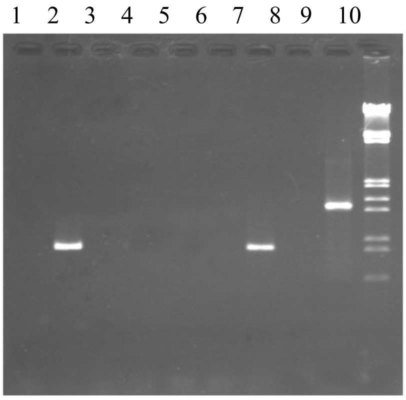
ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 7
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 16
ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 18
ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 64
ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 68
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 74
ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้โครโมโซมจาก *B. thuringiensis* JCPT 89
ช่องที่ 8 water control
ช่องที่ 9 positive control
ช่องที่ 10 DNA marker (100bp DNA Ladder)



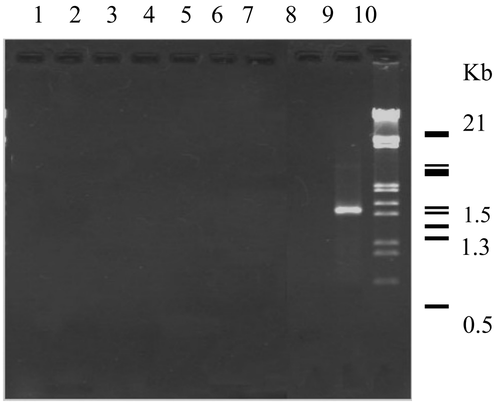
(1) ไพร์เมอร์ *cry*1Aa



(2) ไพร์เมอร์ *cry*1Ab



(3) ไพร์เมอร์ *cry*1Ac



(4) ไพร์เมอร์ *cry*1Ad

ภาพที่ 12 ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac และ *cry*1Ad บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

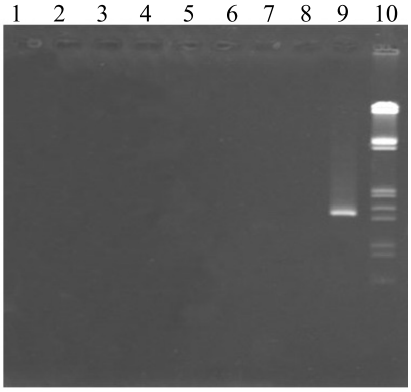
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

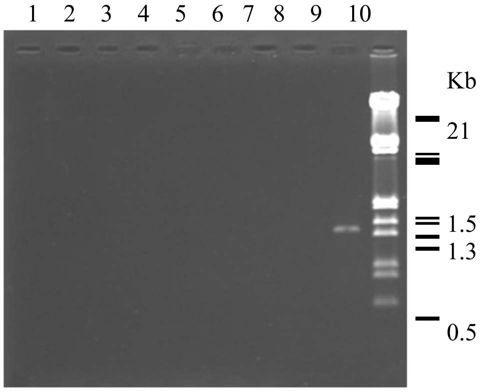
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

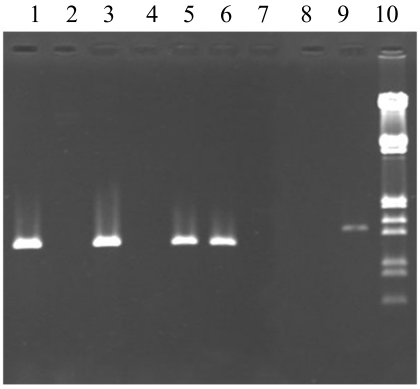
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



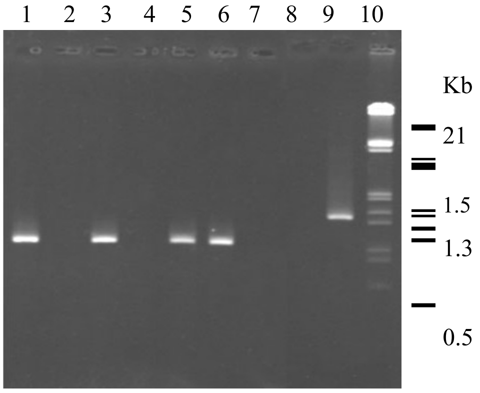
(1) ไพร์เมอร์ *cry*1Ae



(2) ไพร์เมอร์ *cry*1B



(3) ไพร์เมอร์ *cry*1C



(4) ไพร์เมอร์ *cry*1D

ภาพที่ 13 ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1Ae, *cry*1B, *cry*1C และ *cry*1D บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

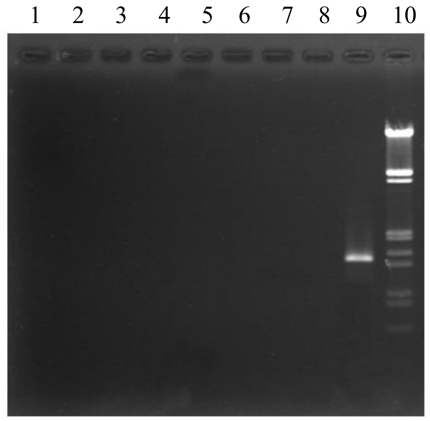
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

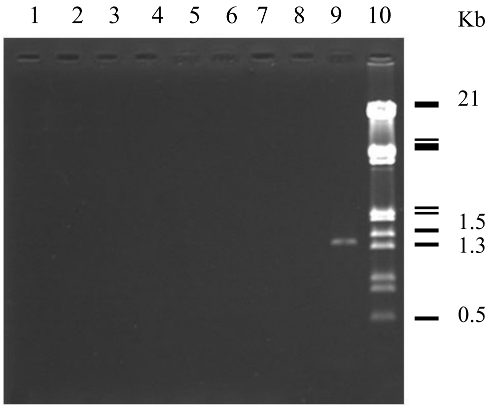
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

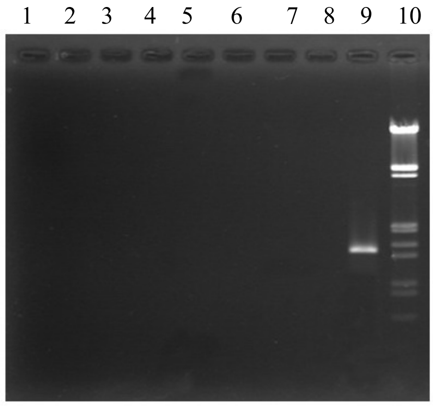
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



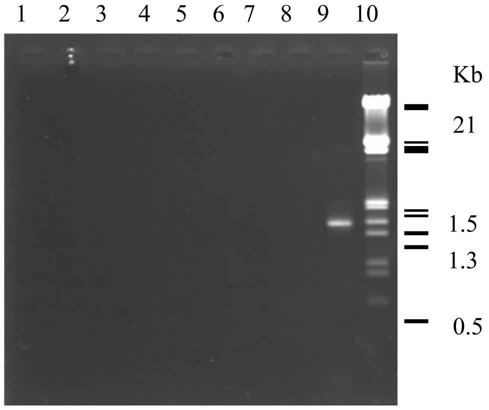
(1) ไพร์เมอร์ *cry*1E



(2)ไพร์เมอร์ *cry*1F



(3) ไพร์เมอร์ *cry*1G



(4) ไพร์เมอร์ *cry*1H

<u>ภาพที่ 14</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1E, *cry*1F, *cry*1G และ *cry*1H บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

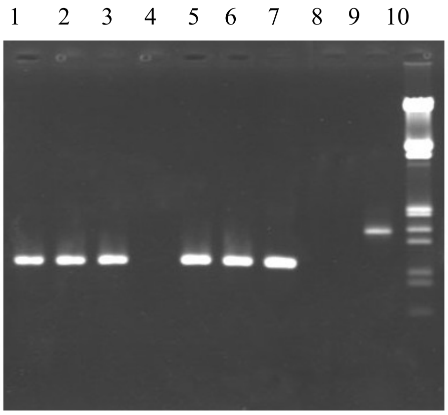
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

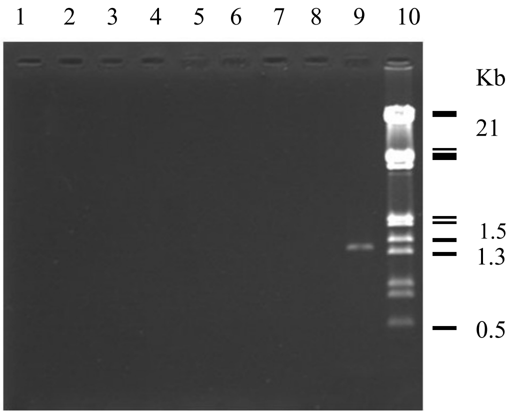
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

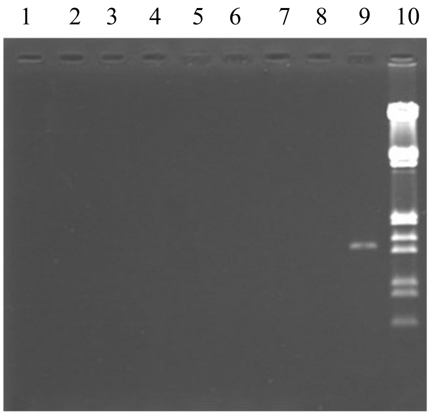
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII และ *Eco*RI)



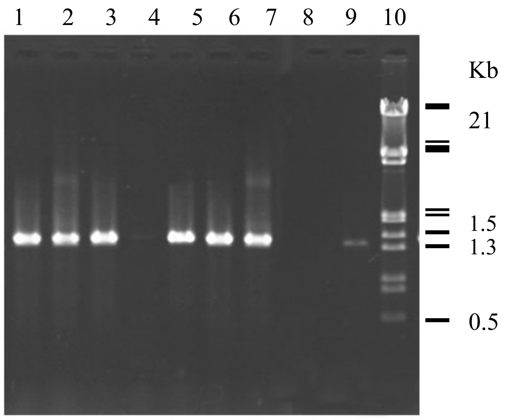
(1) ไพร์เมอร์ *cry*1I



(2) ไพร์เมอร์ *cry*1J



(3) ไพร์เมอร์ *cry*1K



(4) ไพร์เมอร์ *cry*2A

<u>ภาพที่ 15</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*1I, *cry*1J, *cry*1K และ *cry*2A บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

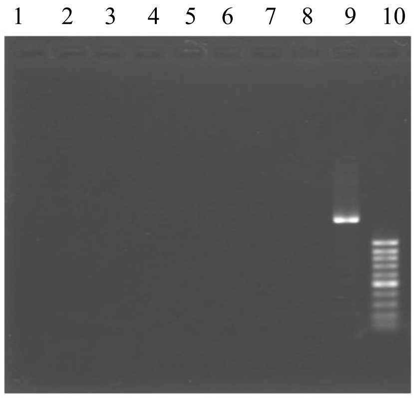
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

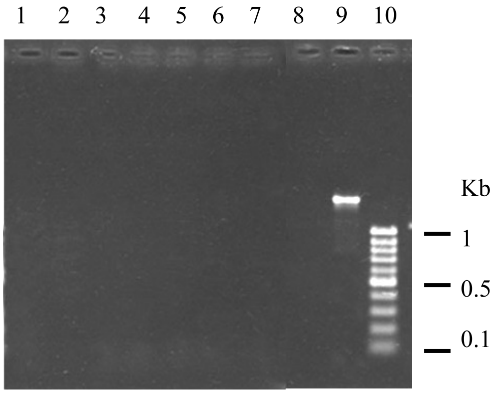
ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

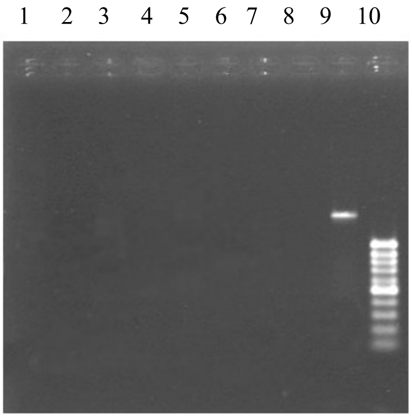
ช่องที่ 10 DNA marker (Lamda DNA ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Eco*RI)



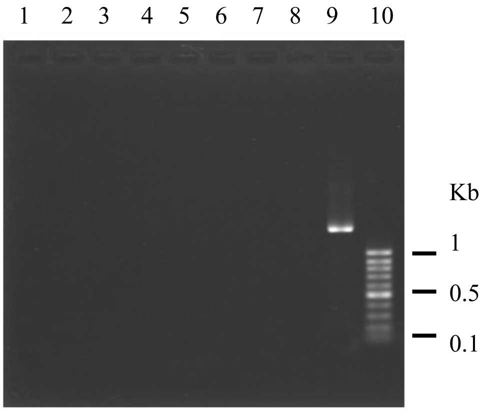
(1) ไพร์เมอร์ *cry*9A



(2) ไพร์เมอร์ *cry*9B



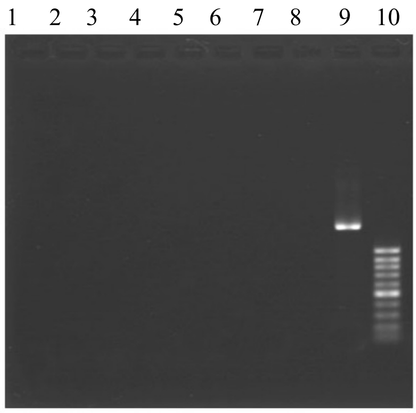
(3) ไพร์เมอร์ *cry*9C



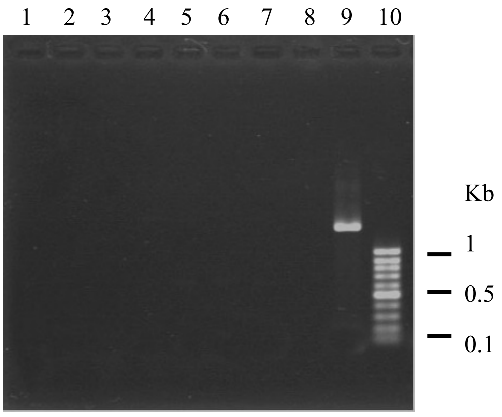
(4) ไ พร์เมอร์ *cry*9D

<u>ภาพที่ 16</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*9A, *cry*9B, *cry*9C และ *cry*9D บนพลาสมิดของ*B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

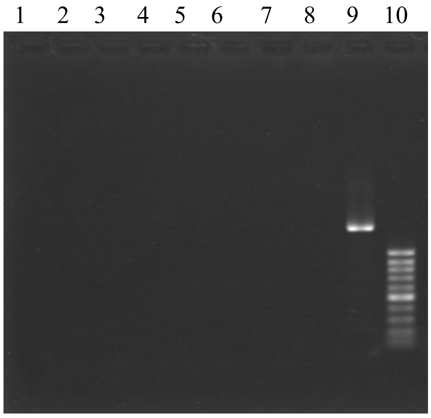
ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7
ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16
ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18
ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64
ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68
ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74
ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89
ช่องที่ 8 water control
ช่องที่ 9 positive control
ช่องที่ 10 DNA marker (100bp DNA Ladder)



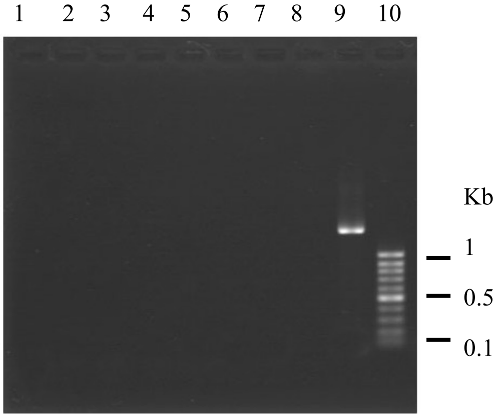
(1) ไพร์เมอร์ *cry*5



(2) ไพร์เมอร์ *cry*12



(3) ไพร์เมอร์ *cry*13A



(4) ไพร์เมอร์ *cry*14

<u>ภาพที่ 17</u> ผลการตรวจสอบชนิดของยีน *cry*5, *cry*12, *cry*13A และ *cry*14 บนพลาสมิดของ *B. thuringiensis* ด้วยเทคนิค PCR

ช่องที่ 1 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 7

ช่องที่ 2 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 16

ช่องที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 18

ช่องที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 64

ช่องที่ 5 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 68

ช่องที่ 6 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 74

ช่องที่ 7 ผลิตภัณฑ์ PCR เมื่อใช้พลาสมิดจาก *B. thuringiensis* JCPT 89

ช่องที่ 8 water control

ช่องที่ 9 positive control

ช่องที่ 10 DNA marker (100bp DNA Ladder)

สรุป

การรวบรวมตัวอย่างดินจาก 6 พื้นที่ในจังหวัดกระบี่ คือเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม และเส้นทางชมธรรมชาติป่าพรุ เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล สวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้ อุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี หน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณีพบ *B. thuringiensis* 32 ตัวอย่าง จากดินที่เก็บจำนวน 92 ตัวอย่าง และจำนวนแบคทีเรียที่นำมาตรวจสอบ 859 ไอโซเลท จำแนกว่าเป็น *B. thuringiensis* 121 ไอโซเลท มีค่า Bt index เท่ากับ 0.14

B. thuringiensis จำนวน 121 ไอโซเลท ทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนผีเสื้อศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจ 3 ชนิดในห้องปฏิบัติการได้แก่ หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก ซึ่งการทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ในขั้นตอนแรกพบว่าทุกไอโซเลทมีพิษต่อหนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนใยผัก คัดเลือกไอโซเลทที่ทำให้หนอนผีเสื้อทั้ง 3 ชนิดตายที่ 100 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามี 56 ไอโซเลท นำไปทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สองโดยใช้ *B. thuringiensis* ที่เจือจางกับน้ำที่ฆ่าเชื้อในอัตราส่วน 1:10, $1:10^3$ และ $1:10^5$ ผลการทดสอบขั้นที่สองกับหนอนกระทู้ผัก พบ *B. thuringiensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด 5 ไอโซเลทได้แก่ไอโซเลท JCPT16, JCPT66, JCPT74, JCPT88 และ JCPT94 LC_{50} 2.78×10^5, 2.43×10^4, 1.57×10^4, 2.25×10^4 และ 2.51×10^4 สปอร์/มล. ตามลำดับ ผลการทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่ 2 กับหนอนกระทู้หอมพบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท JCPT9, JCPT16, JCPT18, JCPT65, JCPT74 และ JCPT89 มีค่า LC_{50} 1.89×10^4, 2.16×10^4, 3.74×10^4, 5.4×10^3, 2.27×10^4 และ 1.03×10^4 สปอร์/มล. ตามลำดับ ขณะที่การทดสอบประสิทธิภาพขั้นที่สองกับหนอนใยผัก พบไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง 7 ไอโซเลทได้แก่ ไอโซเลท JCPT7, JCPT16, JCPT18, JCPT64, JCPT68, JCPT74 และJCPT89 มีค่า LC_{50} 4.08×10^{-2}, 4.19×10^{-1}, 4.11×10^{-3}, 5.26×10^{-1}, 2.06×10^{-1}, 1.13×10^{-2} และ 2.98×10^{-1} สปอร์/มล.ตามลำดับ

การศึกษาชนิดของยีน *cry* บนโครโมโซม และพลาสมิดของ *B. thuringiensis* 7 ไอโซเลท โดยใช้ไพร์เมอร์ในกลุ่มยีน *cry*I ยีน *cry*II และยีน *cry*V ซึ่งเป็นกลุ่มยีนที่สร้างผลึกโปรตีนที่มีพิษต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera บนโครโมโซมพบชิ้นดีเอ็นเอจากการทำ PCR ด้วยยีน *cry* จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I, *cry*9A, *cry*9B และ *cry*2A บนพลาสมิด พบชิ้น

ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ในกลุ่มยีน *cry* จำนวน 7 ชนิด ได้แก่ *cry*1Aa, *cry*1Ab, *cry*1Ac, *cry*1C, *cry*1D, *cry*1I และ *cry*2A

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จริยา จันทร์ไพแสง, ปทุมพร ฉิมเอนก และ เลาจนา เชาวนาดิศัย. 2544. ความหลากหลายของสายพันธุ์ *Bacillus thuringiensis* ที่พบในประเทศไทยและประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. **โรควิทยาของแมลง**. คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abbott, W.S. 1925. A Method of computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ**. 18: 265-267.

Apaydin, Ö., A.F. Yenidünya, S. Harsa and H. Günes. 2005. Isolation and characterization of *Bacillus thuringiensis* strains from different grain habits in Turkey. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 21: 285-292.

Arantes, O. and D. Lereclus. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis* **Gene**. 108: 115-119.

Aronson, A.T., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogen. **Microbiol. Rev**. 50: 124.

Attathom, T., P. Isanont, R. Siriyan and W. Chongrattanameteekul. 1997. Isalation, PCR identification and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strain in Thailand, pp. 82-102. *In* **The second Pacific Rim Conference on Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* and its Impact to the Environment**. Dep. Agr., Bangkok.

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.

Bernhard, K., P. Jarret, M. Meadows, J. Butt, D.J. Ellis, G.M. Robert, S. Pauli, P. Rodgers and H.D. Berges. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis* , worldwide distribution, characterizationnand activity against insect pests. **J. Invertebr. Pathol.** 70: 59-68.

Birnboim, H. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Res**. 71: 1513-1523.

Bonefoi, A. and H. de Barjac. 1963. Classification des souches du groupe *Bacillus thuringiensis* par la determination de l' antigene flagellaire. **Entomophaga**. 8: 223-229.

Boucias, D.G. and J.C. Pendland. 1998. **Principle of Insect Pathology**. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.

Bradley, D., M.A. Harkey, M.K. Kim, K.D. Biever and L.S. Baver. 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.

Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F.J. Villolobobs, G. Pena, M. Nunez-Valdez, M. Soberon and R. Quintero. 1998.

Characterization of *cry* gene in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Appl. Environ. Microbiol**. 64: 4965-4972.

Brousseau, R., A. Saint Onge, G. Prefontaine, L. Masson and J. Cabana. 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. **Appl. Environ. Microbiol**. 59: 114-119.

Brown, K. L. and H. R. Whiteley. 1992. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. **J. Bacteriol**. 174: 549-557.

Buchanan, R.E. and N.E. Bibbon. 1974. **Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology**. 8^{th} ed., The Willium and Wilkin 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 Pest and Plant Disease 1970-80**. Academic Press, New York..

Burges, H.D. and K.A. Jones. 1998. Formulation of bacteria, viruses, and protozoa to control insect in formulation of microbial biopesticides, pp. 34-127. *In* H.D Berges, ed. **Formulation of Microbial Biopesticides**. Kluwer Academic Publishers, Netherland.

Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola and M.G. 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. Gelen, M.P. Gilbert, C.S. Jany, T.B. Johnson and C. GawronBurke. 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. Theeragol. 1993. *Bacillus thuringiensis* found in natural habitat around Thailand, pp.664-670. *In* **Proceedings of the 31st Annual Conference in Plant Science**. Kasetsart University.

Chilcott, C.N. and P.J. Wigley. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. **J. Invertebr. Pathol.** 61: 244-247.

Chilcott, C.N. and P.J. Wigley. 1994. Opportunities for finding new *Bacillus thuringiensis* strain. **Agric Ecosystem Environ**. 49: 51-57.

Choi, S.K., B.S. Shin, E.M. Kong, H.M. Rho and S.H. Park. 2000. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis cry*1I-types crystal protein gene. **Curr. Microbiol**. 41:65-69.

Crickmore, N. and D.J. Ellar. 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned *cry*IIA 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.

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.

DeLucca, A.J., J.G. Simonson and A.D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soil of the United states. **Can. J. Microbiol**. 27: 865-870.

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 Pest and Plant Disease**. 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., Newyork.

Ferre, J., B. Escriche, Y. Bel and J.V. Rie. 1995. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. **FEMS Lett.** 132: 1-7.

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. Williums and R.J. Hedges. 1993. Screening by polymerase chain reaction of

Bacillus thuringiensis serotypes for the presence of *cry*V-like insecticidal protein genes and characterization of a *cry*V gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1683-1687.

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. 1996. ***Bacillus thuringiensis* Ecology and Environmental Effect of its Use for Microbial Pest Control**. Ministry of Environment and Energy, Denmark.

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.

Harwood, C.R. and S.M. Cutting. 1990. **Molecular Biological Methods for *Bacillus*** . Acorn Bookwork, Salisbury, Wiltshire, Great Britain.

Hastowo, S., B.W. Lay and M. Ohba. 1992. Naturally occurring *Bacillus thuringiensis* in Indonesia. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 108-115.

Heimpel, A.M. 1963. Disease cause by certain spore forming bacteria, pp.21-73. In E.A. SteinhausEdxc. **Insect Pathology**; An Advance Treatise. Vol. 2. Academic Press, Newyork.

Heimpel, A.M. 1967. Critical reviews of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. **Annu. Rev. Entomol**. 12: 287-322.

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. 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.

Hongyu, Z., Y. Ziniu and D. Wangxi. 2000. Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouse in China. **J. Invertebr. Pathol.** 76: 191-197.

Hossain, M.A., A. Sohel, H. Sirajul, S. Ahmed and S. Hoque. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh**. J. Invertebr. Pathol.** 70: 221-225.

Içgen, Y., B. Içgen 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.

Iriarte, J., Y. Bel, M.D. Ferradis, R. Andrew, J. Murillo, J. Ferre and P. Caballero. 1998. Environmental distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Spain. **Syst. Appl. Microbiol.** 21: 97-100.

Isanont, P., T. Attathom, S. Attathom and W. Chongrattanameteekul. 1997. Comparative studies on the crystal proteins and their encoded genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Thailand. **Thai J. Agr. Sci**. 30:365-378.

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.

Jansen, S., A. Van Vliet, C. Dickburt, L. Buysse, C. Piens, B. Saey, A. De-Wulf, V. Gossele, A. Paez, E. Goebel and M. Peferoen. 1997. Transgenic corn expressing a Cry9c insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. **Crop Sci.** 37: 1616-1624.

Juarez-Perez, V.M., M.D. Ferrandis and R. Frutos. 1997. PCR-Base Approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis cry* genes. **Gene**. 43: 29-40.

Kanda, K. 1987. Expression of delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*, pp. 75-84. *In* K. Maramorosch(ed.). **Biotechnology in Invertebrate Pathology and Cell Culture**. Academic Press, Inc., Sandiego.

Khan, E., S. Karim, R. Makhdoom and S. Riazuddin. 1995. Abundance, distribution and diversity of *Bacillus thuringiensis* in Pakistanian environment. **Pakistan J. Sci. Indust. Res.** 38: 5-6.

Kim, H. 2000. Comparative study of the frequency, flagella serotypes, crystal shape, toxicity and *cry* gene content of *Bacillus thuringiensis* from three environments. **Curr. Microbiol**. 41:250-256.

Kinslinger, R.A. and W.H. McGaughey. 1976. Stability of *Bacillus thuringiensis* and granulosis virus of *Plodia interpunctella* on stored wheat. **J. Econ. Entomol.** 69: 149-154.

Knowles, B.H. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin, **Programme and Abstracts, Second Canberra *Bacillus thurigiensis* 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 thurigiensis* Berliner . **J. Invertebr. Pathol.** 12: 366-378.

Kuo, W.S. and K.F. Chak. 1996. Identification of novel *cry* type gene from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. **Appl. Environ. Microbiol**. 62: 1367-1372.

Lambert, B. and M. Peferone. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis.* **Bio. Sci.** 42: 112-122.

Landen, R., M. Bryne and A. Abdel-hameed. 1994. Distribution of *Bacillus thuringiensis* strain in southern Sweden. **World J. Microbiol. Biotech**. 10: 45-50.

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.

Lecadet, M.M., J. Chaufause, J. Ribier and D. Lereclus. 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strain with different insecticidal activity by transduction and trastruction. **Appl. Environ. Microbiol**. 58: 840-849.

Leong, K.L.H., R.J. Cano and A.M. Kubinski. 1980. Factor affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. **Environ. Entomol.** 9: 593-599.

Lövgren, A., C.R. Carlson, K. Eskils and A.B. Kolsto. 1998. Location of putative virulence genes on a physical map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gelechiae* 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.

Maduell, P., R. Callejas, K.R. Cabrera, G. Armengol and S. Orduz. 2002. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of species of *Piper* (Piperaceae) in three altitudinal levels. **Microb. Ecol**. 44: 144-153.

Maeda, M., E. Mizuki, Y. Nakamura, T. Hatano and M. Ohba. 2000. Recovery of *Bacillus thuringiensis* from marine sediments of Japan. **Curr. Microbiol**. 40: 418-422.

Martin, P.A.W. and R.S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 2437-2442.

Martinez, C., M. Porcar, A. Lopez, I.R. de Escudero, F.J. Perez-Llarena and P. Caballero. 2004. Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain with a broad spectrum of activity against lepidopteran insect. **Entomology Experiment et Applicata**. 111: 71-77.

Masson, L., W.J. Moar, K. van Frankenhuyzen, M. Boss and R. Broussean. 1992. Insectcidal properties of a crystal protein gene product isolate from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*. **Appl. Environ. Microbiol**. 58:642-646.

Meadow, P.M., D.J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett and H.D. Burges. 1992. Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:1344-1350.

Michel, A.V.T., H.B. Robbins, C.S. Jany and T.B. Johnson. 1991. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae* gene cloning and characterization and comparison with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIAc toxin. **Appl. Environ. Entomol.** 58: 349-358.

Milner, R. J. 1994. History of *Bacillus thuringiensis*: **Agric. Ecosystem Environ.** 49: 9-13.

Mizuki, E., T. Ichimatsu, S.-H. Hwang, Y.S. Park, H. Saitoh, K. Higuchi and M. Ohba. 1999. Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. **J. Appl. Microbiol.** 86: 979-984.

Norris, J.R. and H.D. Burges. 1963. Esterase of crystalliferous bacteria pathogenic for insect: epizootiological applications**. J. Insect. Pathol**. 5: 460-472.

Ohba, M. 1996. *Bacillus thuringiensis* population naturally occurring on mulberry leave: a possible source of populations associated with silkworm-rearing insectaries. **J. Appl. Bacteriol.** 80: 56-64.

Ohba, M. and K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan**. J. Invertebr. Pathol.** 47: 272-282.

Pedersen, T.C., P.H. Damgaard, J. Eilenberg and B.M. Hansen. 1995. Dispersal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in an experiment cabbage field. **Can. J. Microbiol**. 41: 118-125.

Porcar, M. and V. Juárez-Pérez. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiol. Rev.** 26: 416-432.

Quesada-Moraga, E., E. Garcia-Tovar, P. Valverde-Garcia, C. Santiago-Alvarez. 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soils in Spain.

Microbiol. Res. 159:59-71.

Rajamohan, F., M.K. Lee and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein; molecular mode of action. **Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol**. 60:1-27.

Rajamohan, F., O. Alzak, J.A Cotrill, A. Curtiss and D.H. Dean. 1996. Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Mutation at domain II of CryIAb enhance receptor affinity and toxicity toward gypsy moth larvae. **Appl. Biol. Sci.** 93: 14338-14343.

Raymond, M. 1985. Présentation d' un programme d' analyse log-probit pour micro-ordinateur. **Cah. ORSTOM. Sé. Ent. med et Parasitol**. 22: 117-121.

Sauka, D.H., J.G. Cozzi and G.B. Benintende. 2005. Screening of *cry*2 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina. **Antonie van Leewenhoek**. 88: 163-165.

Sick, A., F. Gaertner and A. Wong. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolates of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. **Nucleic Acids Res.** 18:1305.

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.

Song, F., J. Zhang, A. Gu, Y. Wu, L. Han, K. He, Z. Chen, J. Yao, Y. Hu, G. Li and D. Huang. 2003. Identification of *cry*1I-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains and characterization of a novel *cry*1I-type gene. **Appl. Environ. Microbiol**. 69:5207-5211.

Tabashnik, B.E., N. Finson, M.W. Johnson and D.G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the Diamondback moth (*Plutella xylostella*). **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4627-4629.

Tanada, Y. and H.K. Kaya. 1993. **Insect Pathology**. Academic Press Inc., London.

Tailor, R., J. Tippett, 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.

Taylor, G.R. 1991. Polymerase chain reaction: basic principles and automation, pp. 1-13. *In* M.J. Mcpherson, P. Quirk and G.R. Taylor. **PCR, A Practical Approach**. Oxford University Press, Oxford.

Uribe, D., W. Martinez and J. CerÓn. 2003. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Columbia. **J. Invertebr. Pathol.** 82: 119-127.

van Frankenhuyzen, K., L. Gringorten and D. Gauthier. 1997. Cry9Ca1 toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). **Appl. Environ. Microbiol.** 63: 4132-4134.

Vilas-BÔas, G.T. and Manoel V.F.L. 2004. Diversity of *cry* genes and genetic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Brazil. **Can. J. Microbiol**. 50(8): 605-613

Wang, J., A. Boets, J. Van Rie and G. Ren. 2003. Characterization of *cry*1, *cry*2, and *cry*9 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. **J. Invertebr. Pathol.** 82: 63-71.

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.

Willium, R.W. and H.R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal protein 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 protein : Recent advanced in understanding its insecticidal activity, pp. 3-41. *In* L. Kim, ed. **Advanced Engineering Pesticides**. Marcel Dekker, Inc., New York.

YongAn,Z., S. FuPing, D. LianYun, Z. Jie and L. ChangYou. 2003. Studies on resources of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* from different soil of forest site zone in China. **Forest Reserch; Beijing.** 16: 19-25.

Zelazny, B. and M. Welling. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from tropical and subtropical soil sample. **Nacchrichtenbl. Dtsch. Pflanzenschutz dienst**. 46: 192-194.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ NA ปริมาตร 1 ลิตร

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	18	กรัม
distilled water	1000	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 ลิตร

Bacto-tryptone	10.0	กรัม
Bacto-yeast extract	5.0	กรัม
Nacl	10.0	กรัม
1M NaoH	1.0	กรัม
distilled water	1000	มิลลิลิตร

3. สารเคมีในการสกัดโครโมโซมดีเอ็นเอ

2.1 lysis buffer: 50mM Tris.HCl pH 8.0 และ 0.1 M NaCl

4. สารเคมีในการสกัดพลาสมิด

4.1 TSE buffer: 10mM Tris. HCl pH 8, 300mM NaCl และ 10mM EDTA

4.2 TE buffer: 10mM Tris. HCl pH 8และ 1mM EDTA

4.3 Solution A: 10mM Tris.HCl pH 8, 10mM EDTA , 50mM NaCl และ 20%(w/v) sucrose

4.4 Solution B: 0.2 M NaOH และ 1% (w/v) SDS

4.5 Solution C: 5M potassium acetate และ glacial acetic acid

ภาคผนวก ข

ข้อมูลพิกัดจุดเก็บดิน และข้อมูลแสดงการตายของหนอนทดสอบ

ตารางผนวกที่ ข1 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเขาประบางคราม	1	ELEV: 28 m
-ป่าพรุ		47 N 0529067
		UTM 0875595
-ป่าพรุ	2	ELEV: 4 m
		47 N 0529043
		UTM 0875626
-ป่าพรุ	3	ELEV: 42 m
		47 N 0529166
		UTM 0875723
-ป่าพรุ	4	ELEV: 18 m
		47 N 0529213
		UTM 0875727
-ป่าพรุ	5	ELEV: 11 m
		47 N 0529421
		UTM 0875754
-ป่าพรุ	6	ELEV: 70 m
		47 N 0529495
		UTM 0875733
-สระมรกต	7	ELEV: 127 m
		47 N 0529594
		UTM 0875705
-สระมรกต	8	ELEV: 51 m
		47 N 0529749
		UTM 0875694
-สระมรกต	9	ELEV: 37 m
		47 N 0529866
		UTM 0875739
-สระมรกต	10	ELEV: 61 m
		47 N 0529857
		UTM 0875725

ตารางผนวกที่ ข2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล อ.เกาะลันตา

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าทุ่งทะเล อ. เกาะลันตา -อ่างเก็บน้ำ	1	ELEV: 28 m 47 N 0504679 UTM 0852897
-อ่างเก็บน้ำ	2	ELEV: 17 m 47 N 0504689 UTM 0852805
-อ่างเก็บน้ำ	3	ELEV: 42 m 47 N 0504740 UTM 0852772
-อ่างเก็บน้ำ	4	ELEV: 18 m 47 N 0504898 UTM 0853026
-อ่างเก็บน้ำ	5	ELEV: 11 m 47 N 0505106 UTM 0852936
-อ่างเก็บน้ำ	6	ELEV: 13 m 47 N 0505208 UTM 0852878
-อ่างเก็บน้ำ	7	ELEV: 13 m 47 N 0505208 UTM 0852878
-อ่างเก็บน้ำ	8	ELEV: 10 m 47 N 0506046 UTM 0852862
-ป่าโกงกาง	9	ELEV: 11 m 47 N 0506052 UTM 0852870
-ป่าโกงกาง	10	ELEV: 9 m 47 N 0506040 UTM 0852870

<u>ตารางผนวกที่ ข2</u> (ต่อ)

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
-ป่าโกงกาง	11	ELEV: 9 m
		47 N 0506040
		UTM 0852870
-ป่าโกงกาง	12	ELEV: 34 m
		47 N 0506541
		UTM 0855264

<u>ตารางผนวกที่ ข3</u> พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดินจากสวนอุทยานแห่งชาติน้ำตกห้วยโต้

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
-น้ำตกห้วยโต้	1	ELEV: 91 m
		47 N 0491267
		UTM 0910298
-น้ำตกห้วยโต้	2	ELEV: 91 m
		47 N 0491267
		UTM 0910298
-น้ำตกห้วยโต้	3	ELEV: 91 m
		47 N 0491282
		UTM 0910317
-น้ำตกห้วยโต้	4	ELEV: 91 m
		47 N 0491383
		UTM 0910278
-น้ำตกห้วยโต้	5	ELEV: 91 m
		47 N 0491416
		UTM 0910257
-น้ำตกห้วยโต้	6	ELEV: 91 m
		47 N 0491429
		UTM 0910239
-น้ำตกห้วยโต้	7	ELEV: 91 m
		47 N 0491440
		UTM 0910233
-น้ำตกห้วยโต้	8	ELEV: 65 m
		47 N 0491458
		UTM 0910255
-น้ำตกห้วยโต้	9	ELEV: 91 m
		47 N 0491590
		UTM 0910116
-น้ำตกห้วยโต้	10	ELEV: 91 m
		47 N 0491590
		UTM 0910116

<u>ตารางผนวกที่ ข3</u> (ต่อ)

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	11	ELEV: 91 m
		47 N 0491590
		UTM 0910116
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	12	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	13	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	14	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	15	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	16	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	17	ELEV: 94 m
		47 N 0491057
		UTM 0910301
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	18	ELEV: 94 m
		47 N 0490989
		UTM 0910418
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	19	ELEV: 94 m
		47 N 0490989
		UTM 0910418
-ป่าเชิงเขาข้างน้ำตกห้วยโต้	20	ELEV: 94 m
		47 N 0490989
		UTM 0910418

ตารางผนวกที่ ข4 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากสวนอุทยานแห่งชาติหาดนพรัตน์ธาราหมู่เกาะพีพี

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	1	ELEV: 11 m 47 N 0478661 UTM 0889416
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	2	ELEV: 9 m 47 N 0478692 UTM 0889425
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	3	ELEV: 12 m 47 N 0478689 UTM 0910301
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	4	ELEV: 17 m 47 N 0478679 UTM 0889367
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	5	ELEV: 94 m 47 N 0478708 UTM 0889391
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	6	ELEV: 11 m 47 N 0478726 UTM 0889371
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	7	ELEV: 12 m 47 N 0478083 UTM 0889705
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	8	ELEV: 12 m 47 N 0478081 UTM 0889764
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	9	ELEV: 13 m 47 N 0478031 UTM 0889742
อุทยานแห่งชาติหมู่เกาะพีพี	10	ELEV: 15 m 47 N 0478033 UTM 0889743

ตารางผนวกที่ ข5 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากหน่วยพิทักษ์ป่าบ้านทับเที่ยง อ.ปลายพระยา

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
-เขื่อนแรกบางสัน	1	ELEV: 89 m
		47 N 0492401
		UTM 0946112
-เขื่อนแรกบางสัน	2	ELEV: 78 m
		47 N 0492411
		UTM 0946108
-เขื่อนแรกบางสัน	3	ELEV: 87 m
		47 N 0492404
		UTM 0946116
-บางสันป่าสวนยาง	4	ELEV: 87 m
		47 N 0491657
		UTM 0944364
-บางสันป่าสวนยาง	5	ELEV: 97 m
		47 N 0491659
		UTM 0944351
-หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร	6	ELEV: 71 m
		47 N 0491407
		UTM 0942470
-หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร	7	ELEV: 71 m
		47 N 0491411
		UTM 0942468
-หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร	8	ELEV: 74 m
		47 N 0491256
		UTM 0942455
-หน่วยพิทักษ์ป่าสันลำธาร	9	ELEV: 76 m
		47 N 0491242
		UTM 0942458
-หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน	10	ELEV: 86 m
		47 N 0491043
		UTM 0942529

<u>ตารางผนวกที่ ข5</u> (ต่อ)

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
-หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน	11	ELEV: 65 m
		47 N 0491058
		UTM 0942526
-หน่วยพิทักษ์ป่าบางสัน	12	ELEV: 65 m
		47 N 0491058
		UTM 0942526
-อ่าวมันช้าง	13	ELEV: 69 m
		47 N 0490792
		UTM 0941412
-อ่าวมันช้าง	14	ELEV: 69 m
		47 N 0490792
		UTM 0941412
-อ่าวมันช้าง	15	ELEV: 69 m
		47 N 0490792
		UTM 0941412
-ที่ทำการเขต	16	ELEV: 47 m
		47 N 0492021
		UTM 0948086
-ที่ทำการเขต	17	ELEV: 47 m
		47 N 0492021
		UTM 0948086

ตารางผนวกที่ ข6 พื้นที่เก็บตัวอย่างดิน และพิกัดจุดเก็บดิน จากอุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	1	ELEV: 121 m 47 N 0471217 UTM 0926897
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	2	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	3	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	4	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	5	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	6	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	7	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	8	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	9	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	10	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด

<u>ตารางผนวกที่ ข6</u> (ต่อ)

สถานที่เก็บดิน	จุดเก็บดิน	พิกัดและความสูงจากระดับน้ำทะเล
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	11	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	12	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	13	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	14	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	15	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	16	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	17	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	18	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	19	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด
อุทยานแห่งชาติธารโบกขรณี	20	ไม่สามารถวัดพิกัดได้เนื่องจากมีดาวเทียมไม่เพียงพอในการวัดพิกัด

ตารางผนวกที่ ข7 จำนวนหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT1	10	10	10	30	100
JCPT2	10	10	10	30	100
JCPT3	8	9	9	26	86.66
JCPT4	9	9	9	27	90
JCPT5	10	10	10	30	100
JCPT6	8	10	10	28	93.33
JCPT7	10	10	10	30	100
JCPT8	10	10	10	30	100
JCPT9	10	10	10	30	100
JCPT10	10	10	10	30	100
JCPT11	10	10	10	30	100
JCPT12	10	10	10	30	100
JCPT13	10	10	10	30	100
JCPT14	10	10	10	30	100
JCPT15	10	10	10	30	100
JCPT16	10	10	10	30	100
JCPT17	10	10	10	30	100
JCPT18	10	10	10	30	100
JCPT19	10	10	10	30	100
JCPT20	10	10	10	30	100
JCPT21	8	7	6	21	70
JCPT22	5	3	2	10	33.33
JCPT23	4	6	2	12	40
JCPT24	4	2	3	9	30
JCPT25	3	5	4	11	36.66

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย 1/ (%)
JCPT27	5	6	5	16	53.33
JCPT28	2	8	6	16	53.33
JCPT29	2	6	3	11	36.66
JCPT30	3	3	6	12	40
JCPT31	4	3	3	10	33.33
JCPT32	3	6	7	16	53.33
JCPT33	8	5	5	18	60
JCPT34	4	6	4	14	46.66
JCPT35	3	4	6	13	43.33
JCPT36	8	5	6	19	63.33
JCPT37	4	6	4	14	46.66
JCPT38	10	10	10	30	100
JCPT39	6	6	4	16	53.33
JCPT40	0	1	0	1	3.33
JCPT41	0	0	0	0	0
JCPT42	0	1	0	1	3.33
JCPT43	0	1	3	4	13.33
JCPT44	7	10	10	27	90
JCPT45	8	10	10	28	93.33
JCPT46	9	10	6	25	83.33
JCPT47	0	1	0	1	3.33
JCPT48	0	2	0	2	6.66
JCPT49	1	0	2	3	10
JCPT50	0	0	0	0	0
JCPT51	2	0	0	2	6.66
JCPT52	3	0	3	6	20

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย1/ (%)
JCPT53	0	0	0	0	0
JCPT54	0	0	0	0	0
JCPT55	2	0	0	2	6.66
JCPT56	0	1	2	3	10
JCPT57	0	0	0	0	0
JCPT58	2	1	0	3	10
JCPT59	1	1	0	2	6.66
JCPT60	7	6	5	18	60
JCPT61	6	4	3	13	43.33
JCPT62	10	10	8	28	93.33
JCPT63	2	3	2	7	23.33
JCPT64	10	10	10	30	100
JCPT65	8	9	10	27	90
JCPT66	10	10	10	30	100
JCPT67	8	6	7	21	70
JCPT68	10	8	9	27	90
JCPT69	1	1	1	3	10
JCPT70	10	10	10	30	100
JCPT71	10	10	10	30	100
JCPT72	10	10	10	30	100
JCPT73	6	10	4	20	66.66
JCPT74	10	10	10	30	100
JCPT75	10	10	10	30	100
JCPT76	10	10	10	30	100
JCPT77	10	10	10	30	100
JCPT78	10	10	10	30	100

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT79	10	10	10	30	100
JCPT80	0	1	1	2	6.6
JCPT81	8	9	10	27	90
JCPT82	10	10	10	30	100
JCPT83	3	3	10	16	53.33
JCPT84	10	10	0	30	100
JCPT85	0	1	1	2	6.6
JCPT86	4	2	3	9	30
JCPT87	7	10	10	27	90
JCPT88	10	10	10	30	100
JCPT89	10	10	10	30	100
JCPT90	10	10	10	30	100
JCPT91	5	8	2	15	50
JCPT92	5	6	4	15	50
JCPT93	10	5	9	24	80
JCPT94	10	10	10	30	100
JCPT95	10	10	10	30	100
JCPT96	2	4	1	7	23.33
JCPT97	10	10	10	30	100
JCPT98	6	4	3	13	43.33
JCPT99	10	10	10	30	100
JCPT100	1	1	2	4	13.33
JCPT101	0	2	2	4	13.33
JCPT102	10	10	10	30	100
JCPT103	10	10	10	30	100
JCPT104	2	1	1	4	13.33

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข7 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT105	2	4	2	8	26.66
JCPT106	10	10	10	30	100
JCPT107	2	0	1	3	10
JCPT108	10	10	10	30	100
JCPT109	10	10	10	30	100
JCPT110	10	10	10	30	100
JCPT111	10	10	10	30	100
JCPT112	10	10	10	30	100
JCPT113	10	10	10	30	100
JCPT114	1	1	2	4	13.33
JCPT115	1	0	1	2	6.6
JCPT116	10	10	10	30	100
JCPT117	1	8	0	9	30
JCPT118	10	10	10	30	100
JCPT119	1	1	1	3	10
JCPT120	1	6	1	8	26.66
JCPT121	10	10	10	30	100

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' formula

ตารางผนวกที่ ข8 จำนวนหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*)ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT1	1	5	5	14	46.66
JCPT2	6	5	4	15	50
JCPT3	10	10	10	30	100
JCPT4	8	5	5	18	60
JCPT5	10	10	10	30	100
JCPT6	10	10	10	30	100
JCPT7	10	10	10	30	100
JCPT8	10	10	10	30	100
JCPT9	10	10	10	30	100
JCPT10	8	8	7	23	76.66
JCPT11	10	10	10	30	100
JCPT12	10	10	10	30	100
JCPT13	10	10	10	30	100
JCPT14	10	10	10	30	100
JCPT15	10	10	10	30	100
JCPT16	10	10	10	30	100
JCPT17	10	10	10	30	100
JCPT18	10	10	10	30	100
JCPT19	10	10	10	30	100
JCPT20	5	5	6	16	53.33
JCPT21	1	1	4	6	20
JCPT22	2	7	5	14	46.66
JCPT23	7	8	8	23	76.66
JCPT24	7	5	5	17	56.66
JCPT25	7	5	5	17	56.66

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott’ s formula

<u>ตารางผนวกที่ ข8</u> (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT26	2	4	4	10	33.33
JCPT27	6	3	4	13	43.33
JCPT28	0	2	4	6	20
JCPT29	2	4	5	11	36.66
JCPT30	8	8	9	25	83.33
JCPT31	9	3	5	17	56.66
JCPT32	7	8	7	22	73.33
JCPT33	6	3	3	12	40
JCPT34	1	1	3	5	16.66
JCPT35	1	2	3	6	20
JCPT36	7	4	5	16	53.33
JCPT37	5	4	7	16	53.33
JCPT38	7	7	7	21	70
JCPT39	6	3	7	16	53.33
JCPT40	7	6	8	21	70
JCPT41	7	7	7	21	70
JCPT42	0	2	4	6	20
JCPT43	0	1	1	2	6.66
JCPT44	10	10	10	30	100
JCPT45	10	10	10	30	100
JCPT46	7	10	10	27	90
JCPT47	8	1	1	10	33.33
JCPT48	0	1	0	1	3.33
JCPT49	1	5	2	8	26.66
JCPT50	1	4	9	14	46.66

<u>1/</u> ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย1/ (%)
JCPT51	0	0	1	1	3.33
JCPT52	9	7	10	26	86.66
JCPT53	10	8	10	28	93.33
JCPT54	7	8	8	23	76.66
JCPT55	8	9	8	25	83.33
JCPT56	9	9	9	27	90
JCPT57	10	7	9	26	86.66
JCPT58	7	7	9	23	76.66
JCPT59	10	10	10	30	100
JCPT60	8	5	3	16	53.33
JCPT61	1	4	3	8	26.66
JCPT62	7	5	5	17	56.66
JCPT63	0	2	2	4	13.33
JCPT64	3	6	2	11	36.66
JCPT65	10	10	10	30	100
JCPT66	10	10	10	30	100
JCPT67	4	6	7	17	56.66
JCPT68	10	10	10	30	100
JCPT69	7	8	8	23	76.66
JCPT70	10	10	10	30	100
JCPT71	10	10	10	30	100
JCPT72	10	10	10	30	100
JCPT73	7	0	4	11	36.66
JCPT74	10	10	10	30	100
JCPT75	10	10	10	30	100

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข8 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT76	9	10	10	29	96.66
JCPT77	10	10	10	30	100
JCPT78	10	10	10	30	100
JCPT79	10	10	10	30	100
JCPT80	5	4	4	13	43.33
JCPT81	7	4	6	17	56.66
JCPT82	10	10	10	30	100
JCPT83	3	4	4	11	36.66
JCPT84	10	10	10	30	100
JCPT85	3	3	4	10	33.33
JCPT86	8	6	4	18	60
JCPT87	4	0	2	6	20
JCPT88	10	10	10	30	100
JCPT89	10	10	10	30	100
JCPT90	3	1	2	6	20
JCPT91	6	3	4	13	43.33
JCPT92	1	2	3	6	20
JCPT93	5	2	4	11	36.66
JCPT94	7	10	9	26	86.66
JCPT95	8	10	7	25	83.33
JCPT96	4	6	1	11	36.66
JCPT97	10	9	10	29	96.66
JCPT98	6	5	5	16	53.33
JCPT99	10	10	10	30	100
JCPT100	10	10	8	28	93.33

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

<u>ตารางผนวกที่ ข8</u> (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย1/ (%)
JCPT101	3	7	9	19	63.33
JCPT102	10	10	10	30	100
JCPT103	10	10	10	30	100
JCPT104	10	10	10	30	100
JCPT105	10	10	10	30	100
JCPT106	10	10	10	30	100
JCPT107	4	8	7	19	63.33
JCPT108	10	10	10	30	100
JCPT109	10	10	10	30	100
JCPT110	10	10	10	30	100
JCPT111	10	10	10	30	100
JCPT112	10	10	10	30	100
JCPT113	10	10	10	30	100
JCPT114	2	2	1	5	16.66
JCPT115	3	3	7	13	43.33
JCPT116	10	10	10	30	100
JCPT117	10	10	10	30	100
JCPT118	10	10	10	30	100
JCPT119	5	3	4	12	40
JCPT120	9	9	8	26	86.66
JCPT121	10	10	10	30	100

<u>1/</u> ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข9 จำนวนหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ที่ตายหลังจากรับเชื้อ *Bacillus thuringiensis* นาน 72 ชั่วโมง

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย1/ (%)
JCPT1	6	7	8	21	70
JCPT2	4	6	6	16	53.33
JCPT3	10	10	10	30	100
JCPT5	10	10	10	30	100
JCPT6	10	10	10	30	100
JCPT7	10	10	10	30	100
JCPT8	7	9	7	23	76.66
JCPT9	7	9	9	25	83.33
JCPT10	8	9	10	27	90
JCPT11	10	10	10	30	100
JCPT12	8	6	10	24	80
JCPT13	9	9	9	27	90
JCPT14	10	9	7	26	86.66
JCPT15	10	10	10	30	100
JCPT16	10	10	10	30	100
JCPT17	8	7	8	23	76.66
JCPT18	10	10	10	30	100
JCPT19	8	7	9	24	80
JCPT20	10	10	10	30	100
JCPT38	5	8	8	21	70
JCPT59	8	5	8	21	70
JCPT64	10	10	10	30	100
JCPT65	10	10	10	30	100
JCPT66	9	5	8	22	73.33
JCPT68	10	10	10	30	100

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย[1/] (%)
JCPT70	10	10	10	30	100
JCPT71	10	10	10	30	100
JCPT72	10	10	10	30	100
JCPT74	10	10	10	30	100
JCPT75	10	10	10	30	100
JCPT77	6	7	7	20	66.66
JCPT78	7	7	7	21	70
JCPT79	7	8	8	23	76.66
JCPT82	10	10	10	30	100
JCPT84	8	7	6	21	70
JCPT88	7	9	10	26	86.66
JCPT89	10	10	10	30	100
JCPT90	8	8	9	25	83.33
JCPT94	10	10	10	30	100
JCPT95	8	9	8	25	83.33
JCPT97	7	9	10	26	86.66
JCPT99	10	10	10	30	100
JCPT102	7	8	9	24	80
JCPT103	9	8	10	27	90
JCPT104	9	8	6	23	76.66
JCPT105	8	10	9	27	90
JCPT106	10	10	10	30	100
JCPT108	8	7	10	25	83.33
JCPT109	8	8	6	22	73.33
JCPT110	8	8	9	25	83.33

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula

ตารางผนวกที่ ข9 (ต่อ)

รหัส	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	รวมตายทั้งหมด	เปอร์เซ็นต์ตาย1/ (%)
JCPT111	8	9	10	27	90
JCPT112	10	10	10	30	100
JCPT113	9	9	8	26	86.66
JCPT116	10	10	10	30	100
JCPT117	6	7	6	19	63.33
JCPT118	8	6	9	23	76.66
JCPT121	10	10	10	30	100

1/ ค่าการตายแท้จริง โดยใช้ Abbott' s formula