ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับใช้ สูตรอาหาร ภาชนะเลี้ยง และวิธีการปลูกเชื้อต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อนิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีสไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* Hubner)

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวจิราพร โพธิ์งาม

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวิลัย สิริมังคารัตน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริธร)

.....กรรมการ
(นายอุทัย เกตุนุติ)

บทคัดย่อ

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณและการผลิตในเชิงพาณิชย์ของเชื้อนิวเคลียร์โพลี่ฮีโดรซีสไวรัสของหนอนเจาะสมอฝ้าย (HaNPV) นั้น แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วนใหญ่ๆ ดังนี้

ส่วนที่ 1 การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงหนอนเจาะสมอฝ้ายเพื่อเป็นสต๊อค ได้แก่ ชนิดของภาชนะ และชนิดของอาหารเทียม ภายใต้สภาพการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ($26\pm1^{\circ}$ซ, ความชื้นสัมพัทธ์ 70-85%, แสง 8 ชม./วัน)

สำหรับชนิดของภาชนะนั้น ได้เปรียบเทียบภาชนะ 3 ชนิด คือ ถ้วยพลาสติกขนาด 2 ออนซ์ กล่องฟิล์ม 35 มม. (24 กล่อง/ชุด) และกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยม (ขนาด 18 x 25 x 5.6 ซม., จำนวน 24 ช่อง/กล่อง) พบว่ากล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมเป็นภาชนะที่มีความเหมาะสมในการใช้เพาะเลี้ยงหนอนเจาะสมอฝ้ายเพื่อเป็นสต๊อค กล่าวคือ ให้จำนวนหนอนที่คาดว่าจะได้ทั้งหมดในปริมาณที่สูงอย่างต่อเนื่อง 3 ชั่วอายุ คือ จำนวน 16,455.60 ตัว ในชั่วอายุที่ 1, 21,118.49 ตัว ในชั่วอายุที่ 2 และ 21,928.30 ตัว ในชั่วอายุที่ 3 แม้ว่าต้นทุนในการผลิตด้วยกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมจะมีราคาสูง (8.12 บาท/ช่อง) ก็ตาม ส่วนกล่องฟิล์ม 35 มม. นั้น ไม่เหมาะสมในการนำมาเลี้ยงหนอนเพื่อเป็นสต๊อค ทั้งนี้เพราะให้ผลผลิตของจำนวนหนอนที่คาดว่าจะได้ต่ำที่สุด

การทดสอบชนิดของอาหารเทียมโดยเปรียบเทียบอาหารเทียม 3 สูตร (สูตรปรับปรุงจากสูตรดัดแปลงจาก โสธร และคณะ, 2514; สูตรที่ 1 : ผสมด้วยวิตามินสต๊อค; สูตรที่ 2 : ผสมด้วยวิตามินเด็กบอดิวิดิน®; สูตรที่ 3 : ผสมด้วยวิตามินเด็กคิดดี้®) เพื่อใช้ในการเลี้ยงแมลงเพื่อเป็นสต๊อค สรุปได้ว่าอาหารเทียมสูตรที่ 1 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุด ทั้งนี้เพราะสามารถผลิตหนอนที่คาดว่าจะได้สูงอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ชั่วอายุ โดยจำนวนหนอนที่คาดว่าจะได้ทั้งหมดเท่ากับประมาณ 2-3 เท่าของอาหารสูตรที่ 2 และ 3 ในชั่วอายุที่ 2 และประมาณ 19-179 เท่า ในชั่วอายุที่ 3 นอกจากนั้นหนอนที่ได้มีการเจริญเติบโตอย่างสม่ำเสมอมากที่สุด แม้ว่าอาหารเทียมสูตรที่ 1 มีต้นทุนการผลิตหนอนต่อตัวสูงที่สุด (1.26 บาท) ในขณะที่สูตรที่ 2 มีต้นทุนต่ำที่สุด (0.47 บาท/ตัว) ก็ตาม

ส่วนที่ 2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่างๆต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ HaNPV ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยหนอนที่ได้จากห้องปฏิบัติการ และต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยหนอนที่ได้จากสภาพไร่ รวมทั้งวิธีการปลูกเชื้อ ชนิดของภาชนะ และชนิดของอาหารเทียม ทดลองด้วยหนอนเจาะสมอฝ้ายวัย 3 อายุ 7 วัน ซึ่งเพาะเลี้ยงมาก่อนด้วยอาหารเทียมสูตรที่ 1 ภายใต้สภาพห้องปฏิบัติการ ($26\pm1^{\circ}$ซ, ความชื้นสัมพัทธ์ 70-85%, แสง 8 ชม./วัน) ปลูกเชื้อโดยใช้ HaNPV ไอโซเลต รอ., diet plug method, หนอนวัย 3 อายุ 7 วัน และอาหารเทียมสูตรที่ 4 (ผสมด้วยวิตามินสต๊อค) โดยทดสอบในถ้วยพลาสติก 2 ออนซ์ ที่อุณหภูมิ $30\pm1^{\circ}$ซ, มืด 16 ชม., $27\pm1^{\circ}$ซ, แสง 8 ชม. และ ความชื้นสัมพัทธ์ 70-85%

ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยหนอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เมื่อทดลองโดยใช้เชื้อความเข้มข้น 4 ระดับ พบว่าความเข้มข้น $2x10^8$ PIBs/มล. ให้ปริมาณผลึกโปรตีนรวมสูงที่สุด ($1.63x10^{11}$ PIBs) และความเข้มข้น $2x10^7$, $2x10^6$ และ $2x10^5$ PIBs/มล. ให้จำนวนผลึกโปรตีนรวมเท่ากับ $6.38x10^{10}$, $3.97x10^{10}$ และ 0 PIBs ตามลำดับ (แตกต่างทางสถิติ, P=0.05)

ส่วนความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อด้วยหนอนที่ได้จากสภาพไร่ ทดลองภายใต้เงื่อนไขเดียวกันกับการทดสอบความเข้มข้นกับหนอนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่ใช้หนอนวัย 2 อายุ 6 วัน คือ ความเข้มข้น $2x10^6$ PIBs/มล. ให้ผลผลิตของผลึกโปรตีนรวมสูงที่สุด ($5.05x10^{10}$ PIBs) รองลงมาคือ ความเข้มข้น $2x10^5$, $2x10^7$ และ $2x10^8$ PIBs/มล. ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ $3.68x10^{10}$, $3.34x10^{10}$ และ $2.83x10^{10}$ PIBs ตามลำดับ (แตกต่างทางสถิติ, P=0.05)

การเปรียบเทียบวิธีการปลูกเชื้อ 3 วิธี คือ diet plug method, surfaced layer method และ incorporated method ปลูกเชื้อด้วยความเข้มข้น $2x10^{8}$ PIBs/มล. ปริมาตร 30, 30 และ 60 ไมโครลิตร/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ พบว่า diet plug method ให้ปริมาณผลึกโปรตีนรวมสูงที่สุดเท่ากับ $7.90x10^{10}$ PIBs ในขณะที่ surfaced layer method และ incorporated method ผลิตได้เท่ากับ $4.08x10^{10}$ และ $3.16x10^{10}$ PIBs ตามลำดับ (แตกต่างทางสถิติ, P=0.05) นอกจากนั้น diet plug method ยังเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด (703.29 บาท/$2x10^{12}$ PIBs/ลิตร)

ภาชนะชนิดต่างๆที่นำมาใช้ทดลองเพื่อหาชนิดของภาชนะที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ คือ ถ้วยพลาสติก 2 ออนซ์, กล่องฟิล์ม 35 มม. (24 กล่อง/ชุด) ถ้วยพลาสติก 1 ออนซ์ และกล่องพลาสติกสี่เหลี่ยม (14 x 19 x 4 ซม., 24 ช่อง/กล่อง) ปลูกเชื้อด้วยความเข้มข้น $2x10^{8}$ PIBs/มล. พบว่าผลผลิตของจำนวนผลึกโปรตีนรวมที่ผลิตได้จากภาชนะชนิดต่างๆนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ มีค่าเท่ากับ $2.89x10^{11}$ (ถ้วยพลาสติก 2 ออนซ์), $2.75x10^{11}$ (กล่องฟิล์ม 35 มม.), $2.25x10^{11}$ (ถ้วยพลาสติก 1 ออนซ์) และ $1.74x10^{11}$ PIBs (กล่องพลาสติกสี่เหลี่ยม) โดยที่กล่องฟิล์มเป็นภาชนะที่มีความเหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการปลูกเชื้อ HaNPV เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด (308.16 บาท/$2x10^{12}$ PIBs ต่อ/ลิตร)

ชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ เมื่อปลูกเชื้อด้วยความเข้มข้น $2x10^{6}$ PIBs/มล. ในกล่องฟิล์ม 35 มม. ด้วยหนอนวัย 2 อายุ 6 วัน ซึ่งแยกเลี้ยงตั้งแต่แรกฟักด้วยอาหารเทียม 3 สูตร (สูตรที่ 4, สูตรที่ 5 : ผสมด้วยวิตามินเด็กบอดิวิติน®, สูตรที่ 6 : ผสมด้วยวิตามินเด็กคิดดี้®) และเมื่อนำมาปลูกเชื้อจะใช้อาหารเทียมสูตรต่างๆดังกล่าวข้างต้น โดยไม่ผสมฟอร์มาลิน พบว่าอาหารเทียมสูตรที่ 5 มีความเหมาะสมมากที่สุด โดยมีต้นทุนการผลิตเชื้อ HaNPV ต่ำที่สุด (137.91 บาท/$2x10^{12}$ PIBs ต่อ/ลิตร) และสำหรับจำนวนผลึกโปรตีนรวมที่ผลิตได้จากการใช้อาหารเทียมสูตรต่างๆดังกล่าวนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P=0.05) ระหว่างอาหารเทียมสูตรที่ 4 ($1.94x10^{11}$ PIBs), สูตรที่ 5 ($1.63x10^{11}$ PIBs) และสูตรที่ 6 ($1.23x10^{11}$ PIBs)

ส่วนที่ 3 การศึกษาความสัมพันธ์ของปัจจัยต่างๆที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อ HaNPV โดยเลือกปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการศึกษาทดลองในส่วนที่ 1 และ 2 มาศึกษาทดลองร่วมกัน กล่าวคือ ใช้กล่องพลาสติกสี่เหลี่ยม (18 x 25 x 5.6 ซม.) และอาหารเทียมสูตรที่ 1 ในการเลี้ยงแมลงเพื่อเป็นสต๊อค ส่วนการเพิ่มปริมาณเชื้อ HaNPV ใช้การปลูกเชื้อด้วย diet plug method, ความเข้มข้น $2x10^{6}$ PIBs/มล., อาหารเทียมสูตรที่ 5 และหนอนวัย 2 อายุ 6 วัน ทดลองในกล่องฟิล์ม 35 มม. ภายใต้สภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับการทดลองในส่วนที่ 2 พบว่าสามารถนำมาศึกษาร่วมกันได้ โดยให้ผลผลิตของจำนวนผลึกโปรตีนรวมในแต่ละชั่วอายุ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ $1.40x10^{11}$ PIBs (ชั่วอายุที่ 1), $1.68x10^{11}$ PIBs (ชั่วอายุที่ 2) และ $8.29x10^{10}$ PIBs (ชั่วอายุที่ 3) และราคาต้นทุนการผลิตเชื้อ HaNPV $2x10^{12}$ PIBs/ลิตร เท่ากับ 160.57, 133.81 และ 271.17 บาท ในชั่วอายุที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถนำปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดต่างๆมาใช้ร่วมกันได้ โดยที่ปริมาณผลึกโปรตีนรวมที่ได้จากการศึกษาร่วมกันในแต่ละชั่วอายุ ($8.29x10^{10}$ - $1.68x10^{11}$ PIBs) นี้อยู่ในพิสัยของปริมาณผลึกโปรตีนรวมที่ได้จากการศึกษาแต่ละปัจจัยเดี่ยวๆ ($7.90x10^{10}$-$2.29x10^{11}$ PIBs) และต้นทุนในการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อ HaNPV ด้วยการรวมปัจจัยต่างๆที่มีต้นทุนต่ำที่สุดเป็นเกณฑ์นี้จึงมีต้นทุนต่ำที่สุดตามไปด้วย