ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ | สายวิชาวิทยาศาสตร์

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ลักษณะทางพันธุกรรม, ผลของสภาพแวดล้อมต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในประเทศไทย

Genetic Characteristic, Environmental Effects on Efficiency and Shelf-life of Nucleopolyhedrovirus Bioproduct in Thailand

นามผู้วิจัย นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์กฤตชญา อิสกุล, Dr. sci. agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์, Ph.D.)

หัวหน้าสายวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนวรรณ พาณิชพัฒน์, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ลักษณะทางพันธุกรรม, ผลของสภาพแวดล้อมต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ในประเทศไทย

Genetic Characteristic, Environmental Effects on Efficiency and Shelf-life of Nucleopolyhedrovirus Bioproduct in Thailand

โดย

นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์)
พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี 2554: ลักษณะทางพันธุกรรม, ผลของสภาพแวดล้อมต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัสในประเทศไทย. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวผลิตภัณฑ์ สายวิชาวิทยาศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์กฤตชญา อิสกุล, Dr.sci.agr. 91 หน้า

ไวรัส เอ็นพีวี (Nucleopolyhedrovirus) ที่ผลิตในประเทศไทย มี 3 ชนิด ได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SlNPV), ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) และไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV) จากการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสามชนิด ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Polh-NPV-F และ Polh-NPV-R เพื่อตรวจสอบยีน *polh* พบว่าไวรัสทั้งสามชนิดมีขนาด 530 คู่เบส ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสามชนิด เมื่อเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลใน GenBank แสดงว่าไวรัส SlNPV และ SeNPV มีความเหมือนกับไวรัสสายพันธุ์ *Spodoptera exigua* โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโน 97 และ100เปอร์เซ็นต์identity ตามลำดับ นอกจากนี้ไวรัส SlNPV มีความใกล้ชิดกับไวรัส SeNPV มากกว่าไวรัส HaNPV โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีไทด์ 90 เปอร์เซ็นต์ และลำดับกรดอะมิโน 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถึงแม้ว่าไวรัส HaNPV จะแยกออกมาอย่างชัดเจนจากไวรัส SlNPV และ SeNPV แต่ก็มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไวรัส *Helicoverpa armigera* สายพันธุ์ต่างๆที่นำมาเปรียบเทียบ

คุณสมบัติบางประการที่สำคัญของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ได้แก่ ความทนทานต่อแสงยูวี ชนิดบี ซึ่งเป็นปัจจัยหลักต่อการเสื่อมประสิทธิภาพของเชื้อพบว่า เชื้อไวรัสความเข้มข้นสูง $1.0x10^9$ PIB/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นมาตรฐาน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสภาพที่ต้องรับแสงยูวี นานถึง 5 ชั่วโมง เชื้อจึงลดประสิทธิภาพลงประมาณ 56.0 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อเท่ากับ 62.22 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นอื่น เชื้อสามารถทนต่อแสงยูวีได้ไม่เกิน 3 ชั่วโมง เชื้อจะมีประสิทธิภาพลดลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และผลของอุณหภูมิทั่วไปไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี โดยเฉพาะอุณหภูมิในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ที่เก็บไว้นานถึง 72 ชั่วโมง แต่เมื่อเก็บเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิสูงเกิน 45 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเก็บเชื้อไว้เกิน 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการกำจัดหนอนของเชื้อจะลดลงอย่างชัดเจน มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 50.88-71.93 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อเหลืออยู่ระหว่าง 53.70-75.92 เปอร์เซ็นต์ อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก พบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 5 องศาเซลเซียส จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บไว้ในสภาพห้อง โดยชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดสำเร็จรูปจะเก็บได้นานถึง 12 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนอน

_____ / ___ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Somchai Suwongsaksri 2011: Genetic Characteristic, Environmental Effects on Efficiency and Shelf-life of Nucleopolyhedrovirus Bioproduct in Thailand. Master of Science (Bioproducts Science), Major Field: Bioproducts Science. Division of Science. Thesis Advisor: Mr. Kritchaya Issakul, Dr.sci.agr. 91 pages.

The production of nucleopolyhedrovirus in Thailand deals with 3 isolates; namely, *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SlNPV), *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SlNPV) and *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV). Genetic characteristic study by PCR technique with Polh-NPV-F and Polh-NPV-R primers was employed to identify these 3 isolates by *polh* gene. It showed that the 3 NPVs had 529 bp. Genetic relationship of the 3 NPVs with other strains in GenBank database indicated that SlNPV and SeNPV showed significant similarities with *Spodoptera exigua* isolate, the identity of nucleotide and amino acid sequence were 97 and 100 %, respectively. Furthermore, SlNPV was more closely related to SeNPV than HaNPV with 90 % identity of nucleotide sequence, and 97% identity of amino acid sequence. Although HaNPV was distantly related to SlNPV and SeNPV, it was more closely related to other *Helicoverpa armigera* isolates.

The major environmental factor affected nucleopolyhedrovirus of common cutworm (SlNPV) was UVB persistence that significantly decreasing the efficacy of SlNPV. The study showed that the standard concentration of $1.0x10^{9}$ PIB/ml yielded the highest efficacy. The virus could persisted UVB exposure for 5 hrs. , after that its efficacy dropped for about 50 % and its original activity remaining percentage decreased to 62.22 %. Others concentration maintained UVB persistence for less than 3 hrs. while decreased their efficacy to less than 50%. In term of temperature, normal temperature, especially between 30-40 ^{o} C, had no effect on the efficacy of SlNPV, though keeping it for 72 hrs. . However, when storing it in the temperature over 45 ^{o} C, after 24 hrs. storage, the efficacy for larvae controlling decreased significantly to 50.88-71.93 % and the average original activity remaining went down to 53.70-75.92%. For shelf-life storage of SlNPV bioproduct, the study showed that storing the virus in low temperature at 5 ^{o} C could prolong its shelf life than storing in room temperature. The finished bioproduct could be kept for 12 months and still showed good efficacy.

_____ / / _____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ขอบพระคุณ ดร.กฤตชญา อิสกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ร้อยเอก ชัยวัฒน์ กิตติกูล และดร. วันเพ็ญ เหล่าศรีไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา และช่วยแก้ไขปัญหาระหว่างการทำวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอบพระคุณ ดร.เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ ผู้ทรงคุณวุฒิ และดร.อรวรรณ ชุณหชาติ ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้ายที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอบคุณเพื่อนร่วมงานในหน่วยวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจเสมอมา โดยเฉพาะคุณพ่อคุณแม่และพี่ชายผู้ล่วงลับ ที่เป็นแรงบันดาลใจและกำลังใจให้ตลอดเวลา

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์อันเป็นที่รัก ครูบาอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่าน และถ้ามีข้อผิดพลาดประการใดข้าพเจ้าต้องขออภัยมา ณ โอกาสนี้

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี

ตุลาคม 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	49
สรุปและข้อเสนอแนะ	77
สรุป	77
ข้อเสนอแนะ	78
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	79
ภาคผนวก	85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *polh* ของเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ด้วย วิธี PCR	43
2	เชื้อไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่างๆจำนวน 13 สายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank	45
3	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ไวรัส เอ็นพีวี	53
4	การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ไวรัส เอ็นพีวี	56
5	ผลของแสงยูวี ชนิดบี ที่มีต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ระยะเวลาต่างๆ	60
6	ผลของแสงยูวี ชนิดบี ที่มีต่อประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ระยะเวลาต่างๆ	63
7	ผลของอุณหภูมิต่างๆในแต่ละช่วงเวลาที่มีผลต่อประสิทธิภาพไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก	68
8	อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก วัดจากเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ที่เวลาต่างๆ	72
9	อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก วัดจากเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อ ที่เวลาต่างๆ	73

ตารางผนวกที่

1	สูตรอาหารเทียมเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อนำไปผลิตไวรัส เอ็นพีวี	87

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ชนิดอนุภาคเดี่ยว (Single-enveloped nucleocapsid) และอนุภาครวมกันเป็นกลุ่ม (multiple-enveloped nucleocapsid)	7
2	อนุภาคไวรัส เอ็นพีวี ที่มีผลึกโปรตีนหุ้ม	8
3	ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี	10
4	หนอนกระทู้ผักขณะกัดกินใบเผือก	11
5	หนอนที่ตายจากการกินรับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี	13
6	ขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR	20
7	สเปคตรัม (spectrum) ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากดวงอาทิตย์	22
8	ความยาวคลื่นแสงกลุ่มต่างๆ	23
9	ความยาวคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสงยูวีชนิดต่างๆ	24
10	ดักแด้ของหนอนกระทู้ผักที่รอฟักเป็นผีเสื้อตัวเต็มวัย	38
11	ผีเสื้อของหนอนกระทู้ผักที่รอผสมพันธุ์แล้ววางไข่	39
12	หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี	40
13	เชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ที่ผ่านการปั่นละเอียดและกรองแล้ว	41
14	แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 530 คู่เบส ที่ตรวจพบจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณของยีน *polh* ของ ไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR	50
15	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน	52
16	Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวีชนิดต่างๆ	54
17	ลำดับกรดอะมิโนของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน	55
18	Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี ชนิดต่างๆ	57
19	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หลังรับแสงยูวีที่เวลาต่างๆ	64
20	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ (%OAR) ของเชื้อ ที่เวลาต่างๆ	74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

^{o}C	degree celsius
DMRT	Duncan 's multiple range test
DNA	deoxyribonucleic acid
g	gram
SlNPV	*Spodoptera litura* nucleopohedrovirus
SeNPV	*Spodoptera exigua* nucleopohedrovirus
HaNPV	*Helicoverpa armigera* nucleopohedrovirus
mL	millilitre
PCR	polymerase chain reaction
PIBs/ml	polyhedron inclusion body per mililite
RNA	ribonucleic acid
SeNPV	Spodoptera exigua nucleopohedrovirus
SlNPV	Spodoptera litula nucleopohedrovirus
UV	ultraviolet
% OAR	original activity remaining percentage
$\mu W.cm^{-2}/s$	micro watts. square centimeter/second

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทางพันธุกรรม, ผลของสภาพแวดล้อมต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ นิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส ในประเทศไทย

Genetic Characteristic, Environmental Effects on Efficiency and Shelf-life of Nucleopolyhedrovirus Bioproduct in Thailand

คำนำ

ประเทศไทยมีการใช้สารฆ่าแมลงป้องกันกำจัดศัตรูพืชในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร เพื่อใช้บริโภคในประเทศและเพื่อส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ เป็นระยะเวลามากกว่า 30 ปี มีการใช้สารฆ่าแมลงที่พัฒนาใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่อง แต่ปัญหาแมลงศัตรูพืชกลับทวีความรุนแรงมากขึ้นตามลำดับ สาเหตุมาจากการปลูกพืช เป็นบริเวณกว้างขวางขึ้น และเป็นพืชอาหารของแมลงอย่างต่อเนื่องตลอดปี ทำให้เกษตรกรต้องใช้สารฆ่าแมลงบ่อยครั้งขึ้น มีการพ่นสารฆ่าแมลงมากกว่า 1 ชนิด ในคราวเดียวกัน ทั้งนี้เพื่อลดความเสียหายจากแมลงศัตรูพืช จึงเป็นความเคยชินที่เกษตรกรมักนิยมใช้สารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงเพิ่มขึ้น การใช้สารฆ่าแมลงต่างกลุ่ม 2-3 ชนิดหรือมากกว่าผสมพ่นในคราวเดียวกัน ทำให้เกิดปัญหาหลาย ๆ ด้านตามมา เช่น แมลงดื้อต่อสารฆ่าแมลงได้รวดเร็วจนไม่สามารถพัฒนาผลิตสารฆ่าแมลงชนิดใหม่ ๆ มาใช้ได้ทันต่อความต้องการของเกษตรกร เกษตรกรต้องเพิ่มต้นทุนการผลิตจากการใช้สารฆ่าแมลง เกษตรกรได้รับอันตรายจากสารฆ่าแมลงเพิ่มมากขึ้น อันตรายจากพิษตกค้างบนผลิตผลต่อผู้บริโภค และต่อสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในสภาพแวดล้อม

จากปัญหาดังกล่าว รัฐบาลจึงมีนโยบายที่จะลดการใช้สารเคมีทางการเกษตร โดยมุ่งที่จะพัฒนาหาสิ่งทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง เพื่อที่จะอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม อันจะนำไปสู่ระบบการผลิตทางการเกษตรที่มีความปลอดภัยและยั่งยืน เพื่อให้เกษตรกรมีความมั่นคงในระบบการผลิต มีรายได้เพิ่มขึ้น และประชาชนมีความปลอดภัย มีสุขภาพที่ดีขึ้น ขณะเดียวกันจะต้องช่วยให้เกษตรกรสามารถพัฒนาการผลิตพืชที่มีคุณภาพเพื่อสามารถแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ แนวทางการลดการใช้สารเคมีทางการเกษตรนั้นเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าวิธีการควบคุมศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสานจัดเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ โดยการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดหลาย ๆ วิธีการที่เหมาะสมเข้ามาประยุกต์ใช้โดยเปลี่ยนแปลงทัศนคติเดิมของเกษตรกรที่พึ่งพาสารเคมีกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว ให้หันมาเลือกใช้วิธีการอื่น ๆ เข้ามาควบคุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แมลงศัตรูพืช การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ (microbial control) จัดเป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ เนื่องจากจุลินทรีย์หลายชนิดมีคุณสมบัติตามความต้องการของผู้บริโภค เช่น เชื้อไวรัส เอ็นพีวี (nucleopolyhedrovirus ; NPV) ทั้งนี้เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง ปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ปัจจุบันประเทศไทยมีการผลิตและจำหน่ายชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี 3 ชนิด ได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SlNPV), ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) และไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV) แต่ยังขาดข้อมูลที่สำคัญบางประการ ได้แก่ ข้อมูลด้านพันธุกรรมของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ปัจจัยของแสงแดด โดยเฉพาะแสงยูวี ที่มีรายงานจากต่างประเทศว่าเป็นปัญหาสำคัญของการเสื่อมประสิทธิภาพของเชื้อ รวมถึง อุณหภูมิที่มีผลต่อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก และการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ชนิดนี้อย่างถูกวิธี ดังนั้นการศึกษานี้จะช่วยให้การใช้ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก มีประสิทธิภาพสูงสุด ช่วยให้เกษตรกรมีทางเลือกนอกจากการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำมาปรับใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในอนาคต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนจากยีน *polh* ของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทย เปรียบเทียบกับไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน GenBank

2. เพื่อศึกษาผลของรังสีอัลตร้าไวโอเลตที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก

3. เพื่อศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาของการได้รับอุณหภูมินั้น ๆ ที่มีต่อความคงทนของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

4. เพื่อศึกษาหาอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

ไวรัสเป็นอนุภาคที่มีชีวิตขนาดเล็กมาก อนุภาคเล็ก ๆ นี้ ประกอบด้วยจีโนม (genome) ซึ่งเป็นกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว คือ DNA (Deoxyribonucleic acid) หรือ RNA (Ribonucleic acid) กรดนิวคลีอิคนี้จะถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนโมเลกุลย่อย ๆ เรียกว่า แคปสิดโปรตีน (capsid protein) ทำหน้าที่ป้องกันอันตรายและเป็นตัวพากรดนิวคลีอิคออกจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ไปยังเซลล์อื่น ๆ อนุภาคของไวรัสจะแตกต่างจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ คือ จะไม่มีส่วนของไรโบโซม (ribosome) ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) นิวเคลียส (nucleus) หรือส่วนประกอบทั่วไปอื่น ๆ อย่างที่เซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นควรมี ดังนั้นไวรัสจึงไม่สามารถจะแบ่งตัวทวีจำนวนออกไปเหมือนเช่นเซลล์สิ่งมีชีวิตอื่นๆ จึงต้องอาศัยเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่สร้างหรือทวีจำนวน โดยไวรัสจะใช้ genome ไปควบคุมให้เซลล์สร้างและทวีจำนวนของกรดนิวคลีอิค (nucleic acid replication) เกิดเป็นอนุภาคใหม่ขึ้นมาอย่างมากมาย ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ซึ่งมีลักษณะเหมือนการพิมพ์ของแม่พิมพ์ อนุภาคที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่จะมีลักษณะเหมือนเดิมทุกประการ และพร้อมจะออกจากเซลล์เดิมไปทำลายและขยายพันธุ์ในเซลล์อื่น ๆ ต่อไป

ไวรัสโรคของแมลง

โรคไวรัสของแมลง มีรายงานค้นพบครั้งแรกกับหนอนไหมในปี ค.ศ.1856 และมีการศึกษาค้นคว้าอย่างจริงจังในช่วง 30 ปีที่ผ่านมา ด้วยความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีที่พัฒนาอยู่ตลอดเวลา และมีเครื่องมือที่ทันสมัยช่วยให้การศึกษาวิจัยก้าวหน้ามากขึ้น เช่น กล้องอิเลคตรอนไมโครสโคป ตลอดจนเทคนิคที่ช่วยในการศึกษาและตรวจสอบที่ทันสมัย ทำให้เราได้รู้จักไวรัสโรคของแมลงเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย มีรายงานการพบไวรัสโรคแมลงประมาณ 600 ชนิดจากแมลงกว่า 700 ชนิด ประมาณ 83 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเป็นโรคกับแมลงศัตรูพืชสำคัญทางเศรษฐกิจจำพวกหนอนผีเสื้อต่าง ๆ (Order Lepidoptera) ประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ พบเป็นโรคกับแมลงพวกผึ้ง ต่อ แตน (Order Hymenoptera) และประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ พบเป็นโรคกับแมลงพวกตั๊กแตน (Order Orthoptera) ด้วง (Order Coleoptera) แมลงวัน (Order Diptera) และแมลงในอันดับอื่นๆ อีกเล็กน้อย เราสามารถพบการระบาดของเชื้อไวรัสของแมลงในสภาพธรรมชาติอยู่เสมอ ๆ ในแหล่งที่พบการระบาดของแมลงศัตรูพืชรุนแรง เมื่อพบการระบาดของไวรัส จำนวนประชากรของแมลงศัตรูพืชที่ระบาดอยู่ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แหล่งนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็ว จะเห็นได้ว่าธรรมชาติมีการควบคุมการระบาดของแมลงศัตรูพืชเอาไว้แล้ว แต่เนื่องจากมนุษย์เข้าไปแทรกแซงระบบสมดุลของธรรมชาติ โดยมีเป้าหมายที่จะลดประชากรของแมลงศัตรูพืชให้ได้รวดเร็วกว่าการเกิดขึ้นเองในธรรมชาติ เพื่อปกป้องผลผลิตให้เสียหายน้อยที่สุด ทำให้มีการคิดค้นหาวิธีป้องกันกำจัดแมลงด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การใช้สารฆ่าแมลง ซึ่งแม้จะได้ผลดี แต่ก็มีปัญหาติดตามมาอย่างมากมายหลายประการ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการที่จะนำไวรัสโรคของแมลงมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ได้ประโยชน์สูงสุด โดยอาศัยจุดเด่นที่มีอยู่แล้วและมีความปลอดภัยสูงต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (อัจฉราและคณะ, 2551; Burges, 1981)

ไวรัสโรคของแมลงในกลุ่มของบาคูโลไวรัส (Baculoviruses)

เป็นไวรัสที่พบกับแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด ไวรัสในกลุ่มนี้อยู่ในวงศ์ Baculoviridae พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงชนิดอื่น ๆ จึงกล่าวถึงไวรัสชนิดนี้เพียงชนิดเดียว โดยไวรัสทำลายแมลงในระยะตัวอ่อน ไวรัสชนิดนี้แบ่งตามลักษณะโครงสร้างของอนุภาคออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

1. มีผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส ได้แก่ Nucleopolyhedrovirus (NPV) และ Granulosis virus (GV)

2. ไม่มีผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส ได้แก่ Oryctes virus พบกับด้วงแรดมะพร้าว *Oryctes rhinoceros* Linnaeus

ไวรัส เอ็นพีวี หรือนิวคลีโอโพลีฮีโดรไวรัส (Nucleopolyhedrovirus, NPV)

เป็นไวรัสที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงมากที่สุดจากจำนวนไวรัสโรคของแมลงที่มีการค้นพบในต่างประเทศได้มีการผลิตออกมาเป็นการค้าได้สำเร็จหลายตัว เช่น NPV ของ cotton bollworm (*Helicoverpa zea* (Boddie)), gypsy moth (*Lymantria dispa* (Linnaeus)), douglas fir tussock moth (*Orgyia pseudosugata* (McDunnough)), European pine saw-fly (*Neodiprion sertifer* (Geoffroy)), Cabbage looper (*Trichoplusia ni* (Hübner)), Spodoptera sp. เป็นต้น สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ค้นคว้าวิจัยไวรัส เอ็นพีวี ของแมลงศัตรูพืชหลายชนิดจนสามารถผลิตเพื่อใช้ควบคุมศัตรูพืชได้หลายชนิด เช่น ไวรัส เอ็นพีวี ของ หนอนกระทู้ผัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(*Spodoptera litura* (Fabricius)) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua* (Hübner)) และหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera* (Hübner))

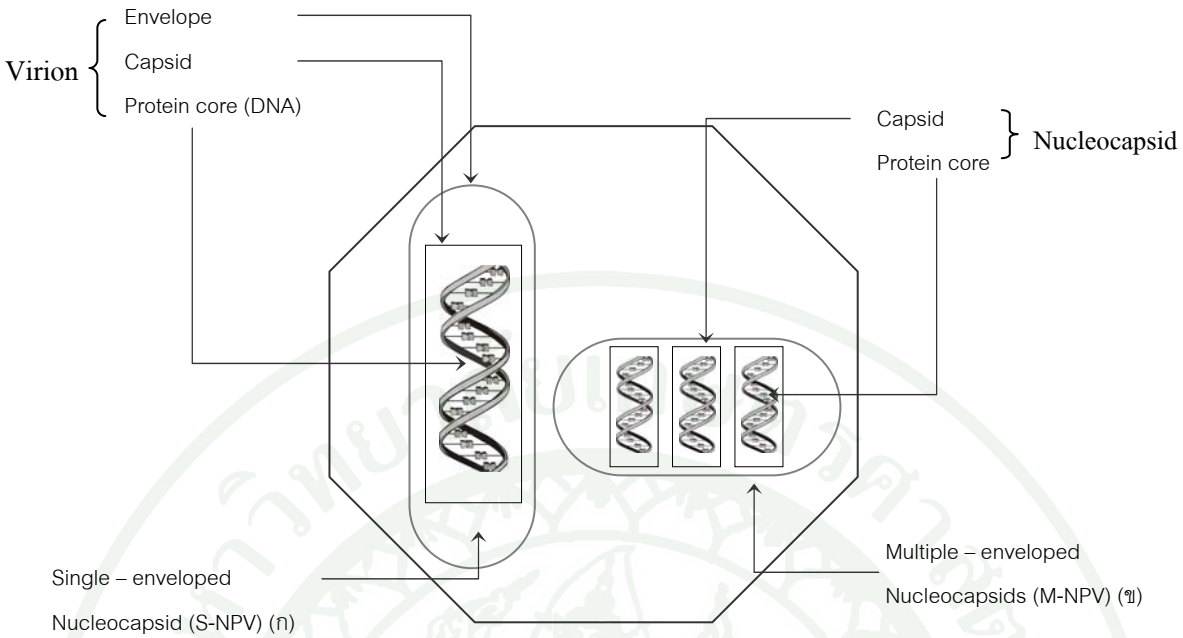
ลักษณะโครงสร้างของไวรัส เอ็นพีวี

อนุภาคของไวรัส หรือนิวคลีโอแคปสิด (nucleocapsid) มีกรดนิวคลีอิคเป็นดีเอ็นเอเส้นคู่ที่พันเป็นเกลียววงกลม (circular supercoiled double-stranded DNA) รูปร่างเป็นท่อนตรง (rod-shaped) กว้างประมาณ 30-40 นาโนเมตร (nm) ยาวประมาณ 250-400 นาโนเมตร ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิค ชนิด double stranded DNA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 50 ถึง 100 x 10^6 ดาลตัน นิวคลีโอแคปสิดจะถูกห่อหุ้มด้วยผนังซึ่งเป็น triple layered lipoprotein เรียกว่า วิริออน (virion) ไวรัส เอ็นพีวี มีการเรียงตัวของวิริออนภายในผลึกโปรตีน (polyhedra) มีรูปแบบแตกต่างกัน 2 ลักษณะ คือ

ก.วิริออนที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดเพียงอนุภาคเดียวเท่านั้นกระจัดกระจายอยู่ภายในผลึกโปรตีน เรียกว่า Single-embeded NPV (S-NPV)

ข.วิริออนที่ประกอบด้วยนิวคลีโอแคปสิดตั้งแต่ 2 อนุภาคขึ้นไป ขนาดของวิริออนขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคของนิวคลีโอแคปสิด เรียกว่า Multiple-embedded NPV (M-NPV) ดังภาพที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

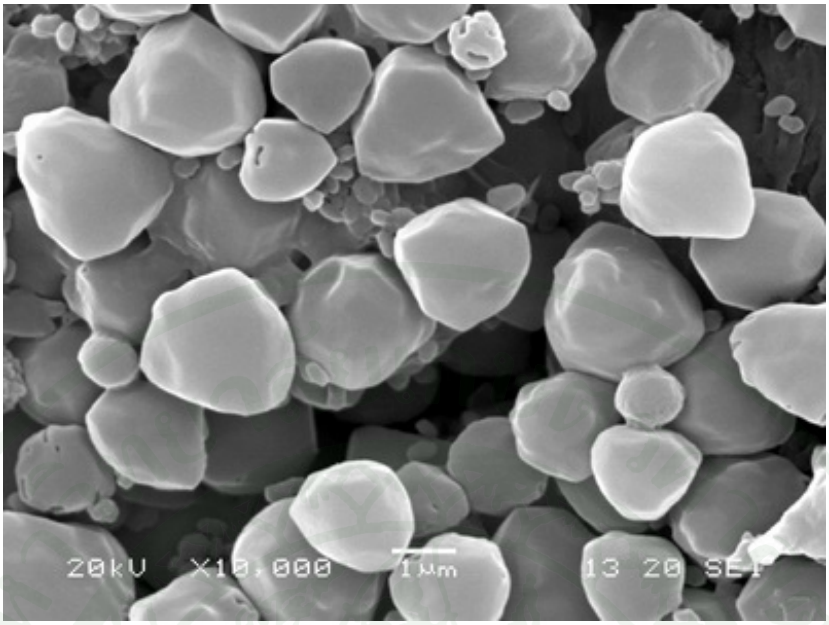


ภาพที่ 1 ลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของไวรัส Nucleopolyhedrovirus ชนิดอนุภาคเดี่ยว (Single-enveloped nucleocapsid) และอนุภาครวมกันเป็นกลุ่ม (multiple-enveloped nucleocapsid)

ที่มา : อุทัย (2534)

ผลึกโปรตีน (polyhedra) ที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัสมีขนาดเฉลี่ย 0.5-15 ไมโครเมตร ประกอบด้วย poly-peptide ที่เรียกว่า polyhedron มีน้ำหนักโมเลกุล 26,000-30,000 ดาลตัน โมเลกุลของโปรตีนมีการเรียงตัวเป็นผลึก เรียกว่า paracrystalline lattice เป็นแบบจุดหรือเป็นแถวต่อกัน ในแต่ละผลึกโปรตีนมีจำนวนวิริออนแตกต่างกันไปอาจมีมากกว่า 100 วิริออน รูปร่างของผลึกโปรตีนอาจมีรูปเป็นสี่เหลี่ยม หกเหลี่ยม รูปทรงกลม หรือรูปเหลี่ยมหลายด้าน (polyhedra) (ภาพที่ 2) เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ผลึกโปรตีนจะสะท้อนแสงเห็นได้ชัดเจน ตรวจสอบโดยการย้อมสี Giemsa ผลึกโปรตีนของ NPV จะไม่ติดสี (อุทัย, 2534)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 อนุภาคไวรัส เอ็นพีวี ที่มีผลึกโปรตีนหุ้ม

การเกิดโรคและลักษณะอาการโรค

ไวรัส เอ็นพีวี จะทำให้แมลงเกิดโรคได้ต่อเมื่อแมลงกินอาหารที่มีไวรัส เอ็นพีวี ปะปนอยู่เข้าไป เมื่ออาหารเหล่านี้เคลื่อนเข้าสู่กระเพาะอาหารส่วนกลาง (mid gut) ของแมลงซึ่งมีสภาพเป็นด่าง pH ประมาณ 9-11 จะย่อยสลายผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส แล้วอนุภาคไวรัสก็จะหลุดกระจายออกจากผลึกโปรตีนเข้าทำลายเซลล์บุผนังกระเพาะอาหารส่วนกลาง (mid gut epithelial cells) เป็นอันดับแรก เมื่ออนุภาคเข้าไปทวีจำนวนในเซลล์บุผนังกระเพาะอาหารแล้ว จึงค่อยแพร่กระจายเข้าสู่ภายในร่างกายแมลงทำลายเม็ดเลือด เนื้อเยื่อไขมัน ท่ออากาศ ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ เซลล์เนื้อเยื่อผนังลำตัว โดยไวรัสจะไปทวีจำนวนอยู่เฉพาะในส่วนของนิวเคลียสของเซลล์ที่มันเข้าทำลายเท่านั้น จึงมีชื่อเรียกว่า nucleopolyhedrovirus สำหรับแมลงในอันดับ Hymenoptera (ผึ้ง, ต่อ, แตน) ไวรัสจะเข้าทำลายเฉพาะส่วนของเซลล์กระเพาะอาหารเท่านั้น

โดยทั่วไปหลังจากหนอนกินไวรัสเข้าไป 3-6 วัน แมลงจะแสดงอาการโรคโดยมีกระบวนการเกิดโรค ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ระยะ (ทิพย์วดี, 2549; Hunter-Fujita *et al*., 1998) คือ

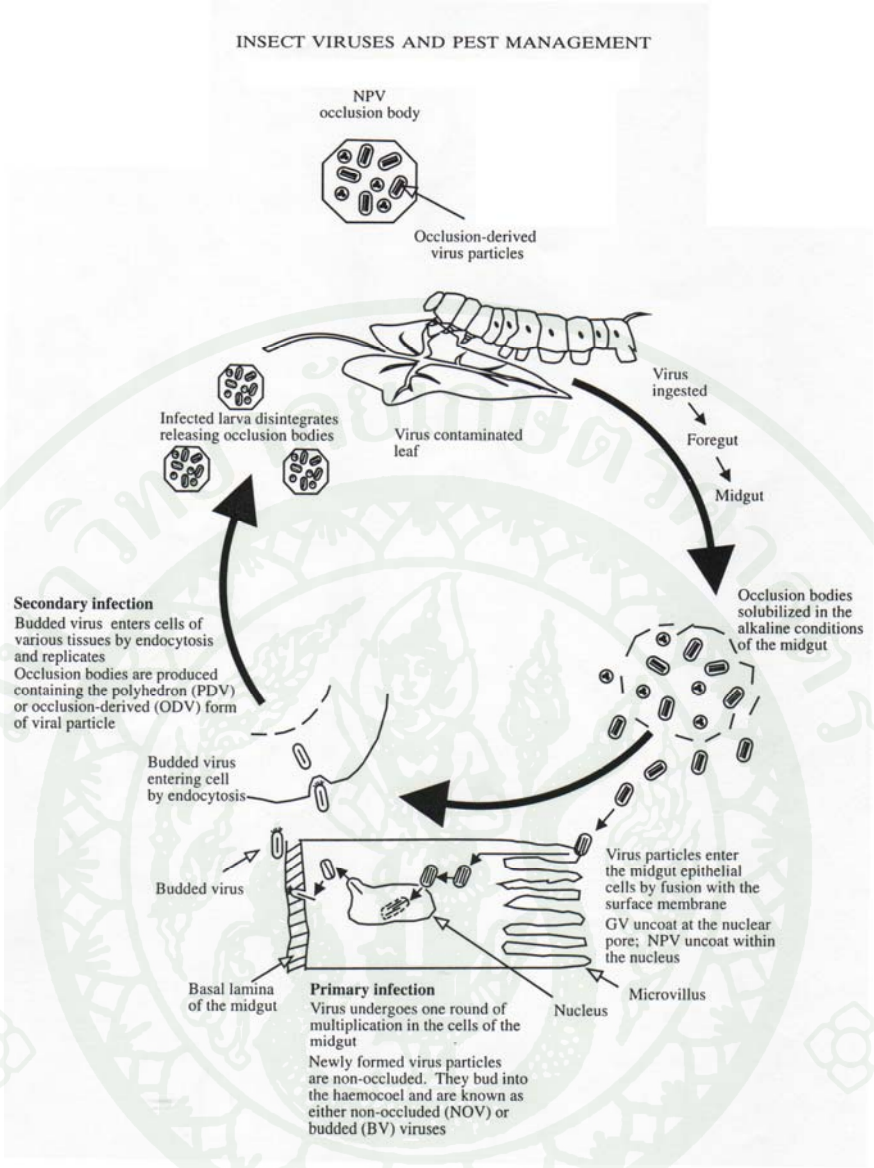
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะที่หนึ่ง primary infection ไวรัสจะเข้าไปเพิ่มปริมาณในนิวเคลียสของเซลล์รอบท่ออาหารส่วนกลาง โดยไม่มีการสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มตัวเอง โดยจะเพิ่มปริมาณอนุภาคไวรัสให้มากพอที่จะเข้าทำลายเซลล์อื่นต่อไป (ภาพที่ 3)

ระยะที่สอง secondary infection อนุภาคไวรัสจะออกมาจากเซลล์รอบท่ออาหารเข้าไปในช่องว่างลำตัวแมลง แล้วแพร่กระจายเข้าทำลายเซลล์และเนื้อเยื่ออื่น ๆ และไวรัสจะสร้างผลึกโปรตีนในระยะนี้ โดยโปรตีนของไวรัสจะเริ่มตกผลึกเป็นจุด ๆ ทั่วนิวเคลียส แล้วรวมผลึกโปรตีนในบริเวณใกล้เคียงทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งไวรัสแต่ละชนิดก็จะมีขนาดผลึกโปรตีนที่แตกต่างกัน

ส่วนลักษณะอาการภายนอกจะพบว่า หนอนจะลดการกินอาหาร เคลื่อนไหวเชื่องช้าลง ผนังลำตัวมีสีซีดลงหรือลักษณะผนังลำตัวเป็นมัน ลำตัวเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นหรือสีครีม ในระยะสุดท้ายของอาการโรคหนอนมักจะพยายามไต่ขึ้นส่วนยอดของพืชเกาะอยู่นิ่ง ๆ หยุดกินอาหารและจะตายในลักษณะใช้ขาเทียม 1 คู่เกาะต้นพืชเอาไว้โดยห้อยหัวและส่วนท้องลงมาลักษณะเป็นรูปตัว V หัวกลับ เมื่อหนอนตายผนังลำตัวจะแตกเละง่าย และผนังลำตัวเปลี่ยนเป็นสีดำอย่างรวดเร็ว ลักษณะอาการของโรคภายในตัวแมลงพบว่า ส่วนของนิวเคลียสของเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ถูกไวรัสเข้าทำลายจะบวมขึ้น (Hypertrophy) เนื่องจากอนุภาคไวรัสจะถูกสร้างขึ้นในนิวเคลียสจนภายในนิวเคลียสจะเห็นผลึกโปรตีนของไวรัสเป็นจำนวนมาก และในระยะสุดท้ายนิวเคลียสจะโตมากจนเกือบเต็มเซลล์และเซลล์จะแตกในที่สุด ทำให้การทำงานของเนื้อเยื่อต่าง ๆ เสียไป ระยะนี้จะพบผลึกโปรตีนของไวรัสอยู่เต็มภายในลำตัวของตัวอ่อนของแมลงที่เป็นโรค ตัวหนอนมีสีขาวขุ่นหรือสีครีม เมื่อหนอนตายผนังลำตัวจะแตกออก ผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มไวรัสจะแพร่กระจายออกจากซากหนอนไปในสภาพแวดล้อมโดยอาศัย ลม น้ำ แมลงหรือสัตว์ชนิดอื่น ๆ พาไป ทำให้เกิดการระบาดโรคแพร่ออกไปอย่างกว้างขวาง (อุทัย, 2534; Sushil, 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี

ที่มา : Hunter-Fujita, *et al*. 1998

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หนอนกระทู้ผัก

หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius) เป็นผีเสื้อกลางคืน อยู่ในวงศ์ Noctuidae อันดับ Lepidoptera หนอนกระทู้ผักพบระบาดอยู่ในประเทศทางแถบเอเชีย มักมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น cotton leafworm, common cutworm, tobacco cutworm, fall armyworm เป็นต้น เนื่องจากหนอนกระทู้ผัก เป็นหนอนที่มีขนาดใหญ่ กินอาหารได้ค่อนข้างเก่งและในปริมาณมาก ๆ จึงก่อความเสียหายแก่พืชอย่างรุนแรง (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 หนอนกระทู้ผักขณะกัดกินใบเผือก

วงจรชีวิตของหนอนกระทู้ผัก

แม่ผีเสื้อวางไข่เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ใต้ใบพืช แม่ผีเสื้อ 1 ตัวสามารถวางไข่ได้ประมาณ 200-300 ฟอง กลุ่มไข่มีขนสีน้ำตาลปกคลุม ไข่ในระยะแรกจะมีสีขาวนวลและจะค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นตามลำดับจากสีน้ำตาลจนเป็นสีดำเมื่อใกล้จะฟักออกเป็นตัวหนอน ระยะไข่ 3-7 วัน หนอนชนิดนี้สามารถสังเกตได้ง่าย เพราะหลังลอกคราบครั้งที่สองแล้ว จะพบจุดสีเข้มที่อกปล้องแรกข้างละจุด หนอนโตเต็มที่มีขนาดใหญ่ยาว 3.5-4 เซนติเมตร ระยะหนอน 14-21 วัน หนอนจะเข้าดักแด้ในดินตามรอยแตกระแหงหรือกองเศษวัชพืช ดักแด้มีสีน้ำตาลดำ ขนาดยาวประมาณ 1.5-1.8 เซนติเมตร ระยะดักแด้ประมาณ 7-12 วัน ตัวเต็มวัยของหนอนกระทู้ผัก เมื่อกางปีกวัดได้ประมาณ 3 เซนติเมตร ลำตัวยาว 1.5 เซนติเมตร ปีกคู่หน้าสีน้ำตาลเข้มมีลวดลายเต็มปีก ปีกคู่หลังสีขาวบางใส ลำตัวมีขนสีน้ำตาลอ่อนปกคลุม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หนอนที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และกัดกินผิวใบด้านล่างเหลือไว้แต่ผิวใบด้านบน เมื่อใบแห้งจะเห็นใบพืชแห้งเป็นสีขาวได้อย่างชัดเจน เมื่อหนอนเข้าสู่วัย 2-3 จะแยกออกจากกลุ่มออกไปหากินทั่วไปในแปลงพืช ในเวลาอากาศร้อนหนอนจะหาที่หลบซ่อนตัวในดินหรือตามกองเศษวัชพืช และจะออกมาหากินอีกครั้งในเวลาเย็นหรือเวลากลางคืน โดยจะกัดกินทำลายใบ ดอกและฝักอ่อน ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิต และยังสามารถกัดกินพืชอาหารได้หลายชนิด รวมทั้งพืชผักชนิดต่าง ๆ ที่ปลูกกันอยู่ตลอดทั้งปี จึงสามรถพบแมลงศัตรูชนิดนี้ได้ทั่วไปของประเทศไทย (พิสิษฐ์ และคณะ, 2535)

ในอดีตหนอนกระทู้ผักไม่มีปัญหาในการป้องกันกำจัด แต่เนื่องจากมีขนาดตัวโตและหนอนมีนิสัยหลบซ่อนตัวในตอนกลางวัน จึงมักรอดพ้นจากการถูกสารกำจัดแมลงเมื่อเกษตรกรพ่นสาร ดังนั้นในระยะ 2-3 ปีที่ผ่านมาจึงพบว่าหนอนกระทู้ผักเริ่มเป็นปัญหาในการป้องกันกำจัดของเกษตรกร สาเหตุเนื่องจากหนอนมีขนาดตัวโตกว่าหนอนศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ และสามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งที่มีการปลูกผักต่อเนื่องตลอดทั้งปี ความสามารถในการสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงของหนอนกระทู้ผักจึงเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (อุทัย และคณะ, 2537)

ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura* NPV ; SlNPV) มีผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเป็นรูปหลายเหลี่ยม มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 1.8-2.5 ไมโครเมตร หรือเฉลี่ย 2.24 ไมโครเมตร ขนาดของอนุภาคไวรัส (virion) อยู่ระหว่าง 81.24 x 234.79 นาโนเมตร อนุภาคของไวรัสประกอบด้วย nucleocapsids จำนวน 2-4 ท่อน ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก เป็นชนิด multiple enveloped nucleocapsid คือ nucleocapsid รวมเป็นกลุ่มฝังอยู่ในผลึกโปรตีน (สมชัย และคณะ, 2550)

ลักษณะอาการโรคของหนอนกระทู้ผัก

เมื่อหนอนกระทู้ผักได้รับเชื้อไวรัส SlNPV โดยการกินเข้าไป ในช่วงเวลาแรก 2-3 วัน หนอนจะลดการกินอาหารลง สีผนังลำตัวจะซีดลง ต่อมาในช่วงระยะที่ 5-7 วัน หนอนจะหยุดกินอาหาร เกาะอยู่บนใบพืชนิ่ง ๆ และค่อย ๆ คืบคลานขึ้นสู่ส่วนบนสุดของต้นพืช และตายในลักษณะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ห้อยหัวลงมาคล้ายตัววี (ภาพที่ 5) เมื่อหนอนตายลำตัวจะเป็นสีดำ แตกเละง่าย โดยทั่วไปหนอนกระทู้ผักจะเกิดเป็นโรคและตายภายในระยะเวลา 5-10 วัน (อัจฉราและคณะ, 2551)

ภาพที่ 5 หนอนที่ตายจากการกินเชื้อไวรัส เอ็นพีวี

ข้อดีและข้อจำกัดของการนำไวรัส เอ็นพีวี มาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

การนำไวรัสโรคของแมลงชนิด ไวรัส เอ็นพีวี มาพัฒนาเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชบางชนิดในประเทศไทยมีจุดมุ่งหมายเพื่อเป็นวิธีการป้องกันกำจัดที่จะนำเข้ามาเสริมวิธีการป้องกันกำจัดโดยใช้สารเคมี ซึ่งเป็นวิธีการป้องกันกำจัดที่มีการใช้อยู่ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เพื่อช่วยลดปัญหามลภาวะเป็นพิษทั้งต่อเกษตรกรและปัญหาพิษตกค้างบนผลิตผลทางการเกษตร รวมถึงปัญหาราคาของสารเคมีที่สูงขึ้นส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิต และปัญหาแมลงสร้างความต้านทานต่อสารเคมีเป็นต้น แต่ไวรัส เอ็นพีวี ก็มีจุดอ่อนในตัวของมันเองเนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตจึงต้องมีองค์ประกอบหลายอย่างมาเกื้อกูลเพื่อช่วยให้การควบคุมได้ผลดี สิ่งเหล่านี้จะเป็นข้อจำกัดต่อการใช้ไวรัส เอ็นพีวี ให้มีประสิทธิภาพ การศึกษาค้นคว้าเพื่อนำข้อดีมาใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ และการศึกษาหาวิธีการหลีกเลี่ยงข้อจำกัดหรือจุดอ่อนของไวรัส เพื่อการนำมาใช้ให้ได้ประโยชน์สูงสุด นับเป็นสิ่งสำคัญยิ่งต่อการนำไวรัส เอ็นพีวี ไปใช้ให้ประสบผลสำเร็จดังเช่นการใช้สารเคมีกำจัดแมลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารพันธุกรรม

สารพันธุกรรม คือ สารชีวโมเลกุล (Biomolecules) ที่ทำหน้าที่เก็บข้อมูลรหัสสำหรับการทำงานของของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เอาไว้ และเมื่อสิ่งมีชีวิตมีการสืบพันธุ์ เช่น เซลล์มีการแบ่งเซลล์ ก็จะมีการแบ่งสารพันธุกรรมนี้ไปยังเซลล์ที่แบ่งไปแล้วด้วย โดยยังคงมีข้อมูลครบถ้วน

หน่วยพันธุกรรม หรือ ยีน (Gene) จะปรากฏอยู่บนโครโมโซม ประกอบด้วยดีเอ็นเอ ทำหน้าที่กำหนดลักษณะ ทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต หน่วยพันธุกรรม จะถูกถ่ายทอดจากสิ่งมีชีวิต รุ่นก่อนหน้าสู่ลูกหลาน เช่น ควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวกับกิจกรรมทั่ว ๆ ไปทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ไปจนถึงลักษณะปรากฏที่พบเห็นหรือสังเกตได้ด้วยตา เช่น รูปร่างหน้าตาของเด็กที่มีบางส่วนเหมือนกับแม่ สีสันของดอกไม้ รสชาติของอาหารนานาชนิด ล้วนแล้วแต่เป็นลักษณะที่บันทึกอยู่ในหน่วยพันธุกรรมทั้งสิ้น

สารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นสารพันธุกรรมในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ซึ่งพบได้จากนิวเคลียสของเซลล์ เรียกรวมว่า กรดนิวคลีอิค (Nucleic acids) โดยคุณสมบัติทางเคมีแบ่ง กรดนิวคลีอิคลง ได้เป็นสองชนิดย่อย คือ อาร์เอ็นเอ (RNA – Ribonucleic acid) และ ดีเอ็นเอ (DNA – Deoxyribonucleic acid) สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่มีสารพันธุกรรมเป็น ดีเอ็นเอ ยกเว้น ไวรัสบางชนิดเป็นอาร์เอ็นเอ (ไวรัสส่วนมาก มีสารพันธุกรรมเป็น ดีเอ็นเอ)

แหล่งในการเก็บข้อมูลทางพันธุกรรม (genetic information) ของสิ่งมีชีวิตคือกรดนิวคลีอิกชนิดดีเอ็นเอ (DNA, deoxyribonucleic acids) ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ 2 คน ชื่อ Watson และ Crick ได้เสนอแบบจำลองโครงสร้างดีเอ็นเอเป็นสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) 2 สาย พันกันเป็นเกลียวเวียนขวาเรียกว่า เกลียวคู่ (double helix) แต่ละสายประกอบด้วยหน่วยย่อยของนิวคลีโอไทด์ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซี่ (OH group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของน้ำตาลตัวแรกและหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของน้ำตาลตัวถัดไป โดยพบว่าสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายนี้จะพันกันในลักษณะวิ่งสวนทางตรงกันข้ามกัน (antiparallel) และถ้าดีเอ็นเอเป็นสายปลายเปิด (open-end linear strand) ที่ปลายสายของดีเอ็นเอแต่ละข้างจะพบปลาย 3’-OH (polyhedr group) ของสายหนึ่งและปลาย 5’-OH (phosphate group) ของอีกสายหนึ่งเสมอ ดีเอ็นเอสามารถทำหน้าที่เป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรม (Heredity) ของสิ่งมีชีวิตได้โดยอาศัยการเก็บในรูปของรหัสพันธุกรรม (genetic code) ซึ่งเมื่อถึงเวลาที่เซลล์ต้องการแบ่งตัวนั้นส่วนของดีเอ็นเอก็จะมีการจำลองตัวเอง (replication)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โดย ดีเอ็นเอ เกลียวคู่จะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวเพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ให้กับการสังเคราะห์โพลีนิวคลีโอไทด์สายใหม่ โดยการเติมนิวคลีโอไทด์ทีละหนึ่งโมเลกุลในทิศทาง 5’ – - > 3’ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งมีผลให้ดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่จำลองขึ้นใหม่จะประกอบด้วยโพลีนิวคลีโอไทด์จากสายต้นแบบเดิมกับสายที่เกิดจากการสังเคราะห์ใหม่เสมอ จึงเรียกการจำลองตัวเองในลักษณะนี้ว่าการจำลองตัวเองแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication) นอกจากนี้ ดีเอ็นเอ ยังมีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยการทำงานของยีนซึ่งเป็นหน่วยอยู่บน ดีเอ็นเอ แต่ละยีนควบคุมลักษณะที่สิ่งมีชีวิตแสดงออกแตกต่างกันออกไป ซึ่งการที่สิ่งมีชีวิตมีลักษณะ (phenotype) แตกต่างกันนั้น การควบคุมอย่างหนึ่งคือการที่สิ่งมีชีวิตนั้นมีการสร้างโปรตีนหรือเอนไซม์ที่แตกต่างกัน โดยเริ่มต้นขบวนการจากในนิวเคลียสโดยยีนมีการถอดรหัส (transcription) เป็นกรดนิวคลีอิคชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA,ribonucleic acid) เรียกว่า mRNA (messenger RNA) ซึ่งเป็นโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว โดยอาศัยเอนไซม์ RNA polymerase จากนั้น mRNA จะออกจากนิวเคลียสมายังไซโตพลาสซึมเพื่อทำการแปลรหัส (translation) เป็นโปรตีนหรือเอนไซม์เพื่อทำหน้าที่ในเซลล์อีกต่อหนึ่ง โดยอาศัย tRNA (transfer RNA) กรดอะมิโน rRNA (ribosomal RNA) ไรโบโซม และ translation factors ยีน (Gene) คือ ส่วนหนึ่งของโครโมโซม (Chromosome segment) หรือ ส่วนหนึ่งของสายดีเอ็นเอ (DNA segment) ที่สามารถถอดรหัส (transcription) ได้เป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) แล้วนำเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA)ที่ได้มาแปลรหัส (translation) เป็นสายโพลีเปปไตด์ (polypeptide) หนึ่งสายอีกทีหนึ่ง ยีนประกอบด้วย ส่วนที่สามารถถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA)ได้ เรียกว่า แอ๊กซอน (exon) และส่วนที่ไม่สามารถถอดรหัสได้เรียกว่า อินตรอน (Intron) (สุรินทร์, 2552)

ยีน (Gene) สามารถเป็นได้ทั้ง ดีเอ็นเอ (DNA) หรือว่า อาร์เอ็นเอ (RNA) ก็ได้ แต่ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงนั้นจะเป็นดีเอ็นเอ (DNA) ทั้งหมด เพราะเสถียรมากเหมาะแก่การเก็บข้อมูล ขณะที่อาร์เอ็นเอ (RNA) จะพบในพวกไวรัส (Virus) บางชนิด ยีน (Gene) ทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์จะรวมเรียกว่า จีโนม (genome) และโครงสร้างของจีโนม (genome)ในพวกโพรคารีโอตและยูคารีโอตจะแตกต่างกัน ถ้ายีน (Gene) เกิดผิดไปจากปกติเรียกว่า การกลายพันธุ์ (Mutation) ซึ่งเกิดเองตามธรรมชาติหรือถูกกระตุ้นให้เกิดก็ได้ โดยส่วนมากแล้วเมื่อยีนเกิดผิดปกติไปจะส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิต นั้นมากกว่าผลดี เช่น ในคน สามารถทำให้ป่วย เจ็บไข้ หรือถึงแก่ชีวิตได้ โรคที่เกิดจากสาเหตุนี้เรียกว่า โรคทางพันธุกรรม (genetic disease) ซึ่งจะถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปหรือไม่ก็ได้ โครโมโซม (chromosome) สามารถพบได้ในนิวเคลียสของเซลล์สิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดอาจมีจำนวนและรูปร่างโครโมโซม แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วทุก ๆ เซลล์ภายในของสิ่งมีชีวิตจะมีจำนวนโครโมโซม เท่ากัน ยกเว้นในเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะมีจำนวนโครโมโซมลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ครึ่งหนึ่ง และในเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียสซึ่งจะไม่พบโครโมโซม ถ้าหากตัดโครโมโซม ระยะเมตาเฟส (metaphase) ออกมาส่วนหนึ่งจะพบว่ามีลักษณะเป็นเส้นใยโครมาติน (chromatin fiber) ที่อัดตัวกันแน่น ซึ่งหากยืดเส้นใยเหล่านี้ออกจะพบว่าเป็นส่วนของนิวคลีโอโซม (nucleosome) ที่เชื่อมต่อกันและขดเป็นวงแหวนโซลีนอยด์ (solenoid) เรียกว่า ซุปเปอร์คอยด์ นิวคลีโอโซม (supercoiled nucleosome) ถ้ายืดเส้นใยนี้ออกอีกจะพบว่าแต่ละนิวคลีโอโซม (nucleosome) มีสายดีเอ็นเอ (DNA) พันอยู่ 2 รอบเรียก coiled nucleosome ซึ่งนิวคลีโอโซมเหล่านี้แท้จริงคือโปรตีนฮิสโตน (histone protein) 8 ก้อนที่เกาะติดกันเรียกทั่วไปว่า histone octamer และยังมีโปรตีนฮิสโตน 1 ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมให้สายดีเอ็นเอที่พันรอบนั้นคงอยู่ได้ และทำให้นิวคลีโอโซม เชื่อมเป็นสายต่อเนื่องกันด้วยจีโนม ซึ่งเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมทั้งหมดที่จำเป็นใช้ในการสร้างและจำเป็นต่อการดำรงชีวิตอย่างปกติของสิ่งมีชีวิตชนิดใดชนิดหนึ่ง (สุรินทร์, 2543)

จีโนม (Genome) อยู่บนดีเอ็นเอ (DNA) ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง จีโนม คือ ชุดของ ดีเอ็นเอ (DNA) ทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในนิวเคลียสของทุก ๆ เซลล์นั่นเอง จีโนม ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะแตกต่างกันและสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีขนาดของจีโนม แตกต่างกันโดยมีคำกล่าวว่า จีโนม คือ “แบบพิมพ์เขียว” (blueprint) ของสิ่งมีชีวิต ในจีโนม ของ มนุษย์ พืช และ สัตว์นั้น นอกจาก ดีเอ็นเอ (DNA) ในส่วนซึ่งเรียกกันว่ายีน (Gene) แล้ว ยังมีส่วนของ ดีเอ็นเอ ที่ไม่ใช่ยีนอยู่อีก และยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดทั้งหมด แต่ในการศึกษาจีโนมนั้น ต้องศึกษาทั้งหมดทั้งส่วนที่เป็นยีนและไม่ใช่ยีน ในคนปกติจะมีจีโนม 2 ชุด โดยมาจากทางพ่อ 1 ชุด จากทางแม่ 1 ชุด โครโมโซมเป็นที่อยู่ของหน่วยพันธุกรรม ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมและถ่ายทอดข้อมูล เกี่ยวกับ ลักษณะทางพันธุกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น ลักษณะของเส้นผม ลักษณะดวงตา เพศ และผิว การศึกษาลักษณะโครโมโซม จะต้องอาศัยการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยายสูง ๆ จึงจะสามารถมองเห็นรายละเอียดของโครโมโซมได้ (สุรินทร์, 2545)

การวิเคราะห์ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

เป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่ายีนเป็นแหล่งข่าวสารทางพันธุกรรม ทำหน้าที่บ่งชี้ลักษณะของชีวิตที่สืบทอดจากบรรพบุรุษไปสู่ลูกหลาน หรือจากเซลล์รุ่นหนึ่งไปสู่อีกรุ่นหนึ่ง ความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์จึงทำให้ทราบถึงบทบาทและความสำคัญของยีนที่มีต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครงสร้างทั่วไปของนิวคลีโอไทด์

หน่วยย่อยของดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ คือ นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ส่วน ได้แก่ สารประกอบพวกเบส น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟต ซึ่งสารประกอบพวกเบสมี 2 ประเภท คือ พิวรีน (purine) ได้แก่ adenine (A), guanine (G) และพวกไพริมิดีน (pyrimidine) ได้แก่ cytosins (C), thymine (T) ซึ่งพบเฉพาะในดีเอ็นเอ แต่ถ้าเป็นอาร์เอ็นเอ จะเป็น uracil (U) เบสนี้จะต่ออยู่กับน้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxribose) ในกรณีของดีเอ็นเอ หรือน้ำตาลไรโบสในกรณีของอาร์เอ็นเอ โดยมีหมู่ฟอสเฟตเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างตำแหน่ง 5′ ของน้ำตาลโมเลกุลหนึ่งกับตำแหน่ง 3′ ของน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่งด้วยพันธะฟอสเฟตไดเอสเทอร์ ทำให้สายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นมีทิศทางปลายหนึ่งเป็นปลาย 5′ และอีกปลายหนึ่งเป็นปลาย 3′

คุณสมบัติพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของไวรัสในเซลล์แมลงจะถูกควบคุมโดยยีน การเข้าทำลายเซลล์แมลงและการเพิ่มปริมาณไวรัสในเซลล์เกิดจากการทำงานของยีนต่าง ๆ บนจีโนมของไวรัส ทั้งสิ้น การศึกษาลำดับเบสของจีโนมของไวรัสในวงศ์ Baculoviridae จะทำให้ทราบว่า ไวรัสแต่ละชนิดมีชุดของยีนที่อนุรักษ์ไว้และมีอยู่ในสมาชิกในวงศ์เดียวกันทั้งหมด และมีชุดของยีนที่อาจมีในไวรัสบางชนิดแต่ไม่มีในไวรัสอีกชนิดในวงศ์เดียวกัน (ทิพย์วดี, 2549; สุรินทร์, 2545)

การวิเคราะห์ชนิดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ ประกอบด้วยขบวนการหลัก 2 ประการ คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอชิ้นย่อยตามรหัสของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการวิเคราะห์ และการแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ออกตามขนาดเล็กใหญ่ เรียงลำดับกันลงมาด้วยสารเคมีย่อยดีเอ็นเอของ Maxam และ Gilbert (1977) และวิธีการใช้เอนไซม์สังเคราะห์ดีเอ็นเอ เทคนิคเจล อิเล็คโตรโฟริซิส การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ มีอยู่ 2 วิธี ที่นิยม กระทำกัน คือ การใช้ดีเอ็นเอ ที่เรียกว่า dideoxyribonucleotide chain termination (Sanger *et al.,* 1977) ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางด้านพีซีอาร์ มาใช้ร่วมกับงานทางด้านการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ โดยการรวมเทคนิคทั้งสองวิธีการนี้เข้าด้วยกันเป็น automatic DNA sequencing โดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence) ติดฉลากดีเอ็นเอร่วมกับเทคนิค dideoxyribonucleotide chain termination สารเรืองแสงที่ใช้มี 4 ชนิด แต่ละชนิดนำมาต่อเข้ากับโมเลกุลของไพรเมอร์ (primer) เพื่อแยกทำปฏิกิริยา จัดให้มีการหยุดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่สมที่นิวคลีโอไทด์จำเพาะแต่ชนิดในหลอด 4 หลอด แล้วรวมปฏิกิริยาทั้ง 4 เข้าด้วยกัน ก่อนนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟริซิส สายดีเอ็นเอแต่ละสายที่ได้จากปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอนั้นจะมีขนาดไม่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากันขึ้นกับจำนวนนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ดีเอ็นเอสายที่มีการหยุดการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ต่างชนิดกันจะมีสารเรืองแสงที่ต่างชนิดกันติดอยู่ ดังนั้นเมื่อสายดีเอ็นเอแต่ละขนาดเรียงลำดับจากสายสั้นที่สุดเคลื่อนที่ลงมา เครื่องตรวจจับที่เป็นระบบเลเซอร์ก็จะตรวจจับความยาวช่วงคลื่นของสารเรืองแสงแต่ละชนิดได้ ทำให้ทราบว่าสายดีเอ็นเอแต่ละสายนั้นมีปลายสายเป็นนิวคลีโอไทด์ชนิดใด และเก็บข้อมูลไว้โดยคอมพิวเตอร์และสามารถวิเคราะห์ข้อมูลได้โดยไม่ต้องทำภาพรังสีในตัว (สุรินทร์, 2545; Smith *et al.*, 1986)

การศึกษาจีโนมเพื่อจำแนกไวรัส เอ็นพีวี

ลักษณะสำคัญที่ใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกไวรัสของแมลงในวงศ์ Baculoviridae จากไวรัสวงศ์อื่น คือ สารพันธุกรรมหรือจีโนมแบบดีเอ็นเอสายคู่พันเป็นเกลียววงกลม (supercoil circular double standed DNA) นิวคลีโอแคพสิดมีรูปร่างเป็นท่อนตรงและมีผนังล้อมรอบ ไวรัสในวงศ์นี้มีเพียงสกุลเดียว คือ Genus Baculovirus เดิมได้แบ่งออกเป็น 3 สกุลย่อย subgenus A ได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี (nucleopolyhedrovirus; NPV), subgenus B ไวรัส จีวี (granulosis virus; GV) และ subgenus C เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างผลึกโปรตีน nonoccluded virus (NOV)

ในอดีตการจำแนกไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคแมลงในวงศ์ Baculoviridae จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสและผลึกโปรตีนเป็นหลัก ต่อมาการพัฒนาด้านพันธุวิศกรรมมีการพัฒนาก้าวหน้าอย่างรวดเร็ว มีการศึกษายีนต่าง ๆ บนจีโนม จึงได้ใช้ความแตกต่างทางพันธุกรรมเป็นหลักในการจำแนก และยังศึกษาถึงวิวัฒนาการของไวรัสได้ด้วย โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน ความเหมือนหรือความแตกต่างของลำดับเบส (sequence similarity) ของยีนนั้น ๆ ในการจำแนกและบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสแต่ละชนิดในแบบ Phylogenetic tree ส่วนมากใช้เบสของยีนเพียงยีนเดียวเป็นหลัก (single gene phylogeny) (ทิพย์วดี, 2549; Pang, 2001)

ยีนที่นิยมใช้ในการจำแนกมากที่สุดของไวรัส เอ็นพีวี คือ polyhedron gene (*polh*) เนื่องจากไวรัสจะผลิต polyhedron ในปริมาณที่สูงในระยะสุดท้ายของการเข้าทำลายเซลของแมลง และ polyhedron ก็เป็นองค์ประกอบหลักที่มีการศึกษามาอย่างดีแล้ว สาร polyhedron เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 245-250 ชนิด ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในปริมาณมากของไวรัสกลุ่มนี้ ด้วยคุณสมบัตินี้จึงได้นำมาศึกษาลำดับของ polyhedron (Zanotto *et al* ., 1993., Ward *et al*., 2010)

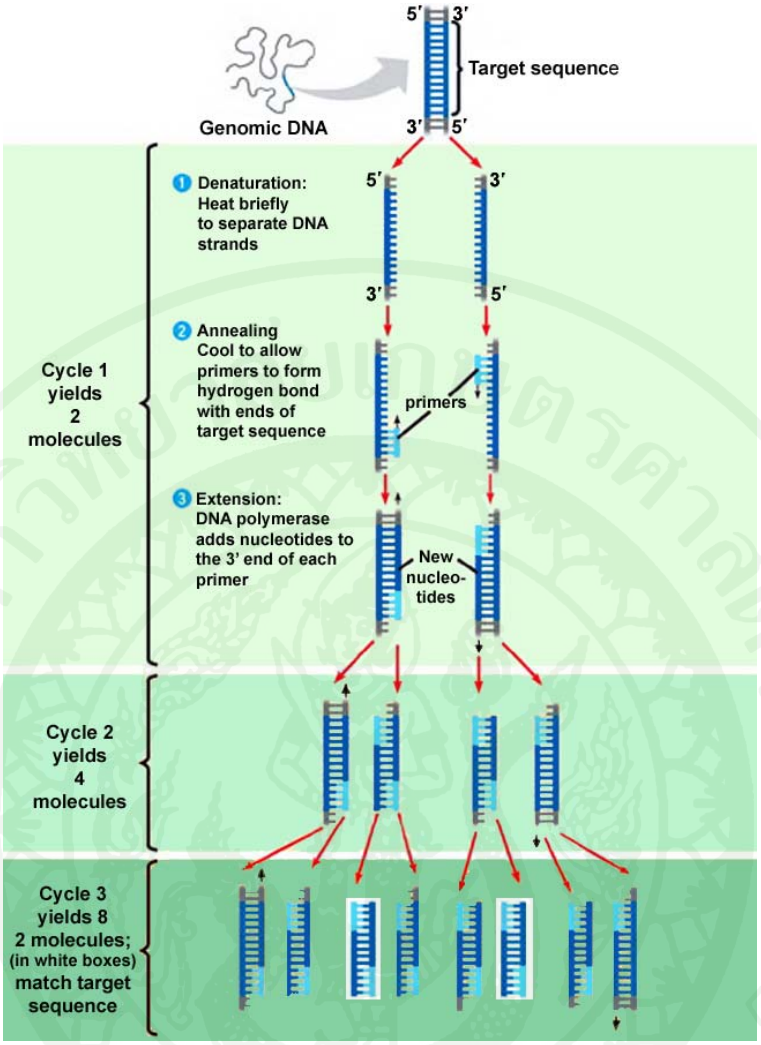
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจุบัน Lange *et al.* (2004) ได้พัฒนาระบบวิเคราะห์และจำแนกไวรัสในวงศ์ Baculoviridae ด้วยการศึกษาลำดับเบสของจีโนม โดยอาศัยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เพิ่มปริมาณยีนหรือดีเอ็นเอ ชิ้นสั้น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอนั้นบริสุทธิ์ก่อน ช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือตัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำมาโคลนก่อน ยีนที่มีการอนุรักษ์ไว้มากที่สุดได้ถูกนำมาใช้เป็นหลักในการออกแบบไพรเมอร์ ได้แก่ ยีน *polh*, gran, late expression factor 8 (lef-8) และ expression factor 9 (lef-9) (Kaewwises *et al*., 2006., Woo *et al*., 2006)

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นปฏิกิริยาที่มีประโยชน์มาก เนื่องจากสามารถทำให้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอให้มีจำนวนมากก่อนนำไปศึกษาขั้นต่อไป แม้ว่าจะมีดีเอ็นเอที่สนใจเริ่มต้นเพียง 1 โมเลกุล แต่ต้องทราบว่าลำดับเบสที่เฉพาะเจาะจงบางส่วน ที่บริเวณหัวและท้ายบางส่วน เช่น 20-25 เบส หลักการทำ PCR คือ แยกดีเอ็นเอที่สนใจ (template DNA) ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน เรียกขั้นตอนนี้ว่า Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ในครั้งแรก ต่อมาอีก 30 วินาที เติมเบสสายสั้นๆ ประมาณ 20 เบส ซึ่งสามารถจับกับปลายของดีเอ็นเอที่สนใจได้อย่างเฉพาะเจาะจง และปล่อยให้จับตัวกันที่อุณหภูมิ 30-36 องศาเซลเซียส เรียกขั้นตอนนี้ว่า Annealing ในสภาวะที่มี DNA polymerase และ dNTPs DNA polymerase จะต่อสายยาวโดยลอกแบบจากดีเอ็นเอที่สนใจที่ละเบส ไปจนสุดสายของดีเอ็นเอที่สนใจนั้น เรียกว่า Extension ที่อุณหภูมิ 65-45 องศาเซลเซียส นาน 2-5 นาที จากนั้นดีเอ็นเอที่สนใจและดีเอ็นเอที่ถูกสร้างขึ้นจากการจำลองแบบ ต่างทำหน้าที่เป็นต้นแบบ จนครบ 1 รอบ แล้วจึงเวียนกลับมาสู่ขั้นตอน denature ใหม่ แล้วเกิดวนเวียนซ้ำ ๆ อย่างนี้หลาย ๆ รอบ ประมาณ 30-35 รอบ โดยหลังจากเกิด ปฏิกิริยา PCR 1 รอบ จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุล และหลังจากเกิดปฏิกิริยา PCR 2 รอบ จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก 2 โมเลกุลเป็น 4 โมเลกุล ดังนั้นหากเกิดปฏิกิริยา n รอบ จะเกิดดีเอ็นเอจำนวน 2^n โดยเริ่มจากดีเอ็นเอเริ่มต้นเพียง 1 โมเลกุล (นภา, 2547) (ภาพที่ 6)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ขั้นตอนสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ที่มา : http://www.bio.miami.edu/~cmallery /150/gene/c7.20.7.pcr.jpg

ดังนั้นเทคนิค PCR จึงเป็นเทคนิคที่เลียนแบบการจำลองโมเลกุลดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิต (DNA replication) เพื่อเพิ่มปริมาณของสายดีเอ็นเอเฉพาะส่วนในสภาพของหลอดทดลอง (*in vitro*) แบบซ้ำๆกันหลายรอบ (repeat cycles) ซึ่งในหลอดทดลองจะประกอบด้วย

1. ดีเอ็นเอ ต้นแบบ (DNA Template)
2. เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูง แยกได้จากแบคทีเรีย Thermus aquaticus

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ไพรเมอร์ (primer) เป็นโอลิโกนิวนิวคลีโอไทด์สายสั้น ประมาณ 10-25 นิวคลีโอไทด์
4. dNTPs (deoxyribonucleotide triphosphate) 4 ชนิด ได้แก่ dATP, dTTP, aGTP และ dCTP
5. 10x Amplication buffer

ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

1. DNA denaturation เป็นการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. Primer annealing เป็นการจับตัวของไพร์เมอร์กับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ ที่อุณหภูมิประมาณ 40-65 องศาเซลเซียส

3. Primer extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอต่อจากส่วนของไพร์เมอร์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส โดยนิวคลีโอไทด์จะต่อเข้าที่ปลาย 3´- OH ของไพร์เมอร์ ด้วยปฏิกิริยาของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ชนิดที่ทนความร้อนสูง (Thermostable DNA polymerase)

เมื่อทำซ้ำหลายๆรอบ ดีเอ็นเอจะเพิ่มจำนวนอย่างทวีคูณแบบ exponential โดยจำนวนชิ้นผลผลิตดีเอ็นเอ (PCR product) คำนวณได้เท่ากับ 2^n (n= จำนวนรอบ) ดังนั้นการทำปฏิกิริยา PCR จำนวน 30 รอบ จะได้ชิ้นดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็น 1,073,741,824 ชิ้น (สุรินทร์, 2543.,นภา, 2547)

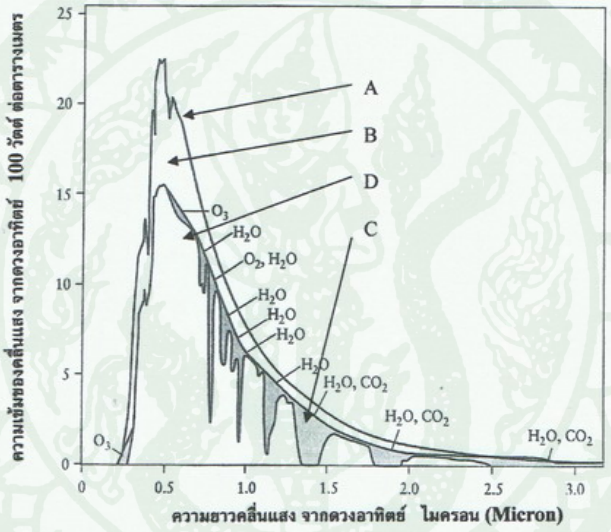
ผลของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อไวรัส เอ็นพีวี

แสงแดดและแสงยูวี

แสงแดดเป็นพลังงานรูปแบบหนึ่ง เกิดจากปฏิกิริยา nuclear fusion บนดวงอาทิตย์ เกิดจากการรวมตัวกันจากอะตอมของธาตุไฮโดรเจนกลายเป็นอะตอมของธาตุฮีเลี่ยม ปฏิกิริยานี้จะให้พลังงานมหาศาล พลังงานรูปหนึ่งที่เกิดขึ้นจะแผ่รังสีในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้ามายังโลก ในรูปของความร้อนและแสง ที่เราเรียกว่า แสงแดด หรือแสงอาทิตย์ คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่แผ่รังสีมาจากดวง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาทิตย์มีความยาวคลื่นแตกต่างกัน ตั้งแต่ความยาวคลื่นมากกว่า 1,000 ไมครอน จนถึงน้อยกว่า 0.2 ไมครอน (200 นาโนเมตร) ในบรรดาคลื่นแสงที่แผ่มาจากดวงอาทิตย์ทั้งหมดแสงสีเหลืองจะมีความเข้มสูงสุด มีความยาวคลื่น 0.55 ไมครอน (550 นาโนเมตร) ซึ่งแสดงไว้ในเส้นกราฟสเปคตรัม ในภาพที่ 7 จะเห็นได้ว่า คลื่นแสงส่วนหนึ่งถูกสะท้อนกลับโดยไอน้ำ ฝุ่นละออง เมฆ และก๊าซประมาณ 31 เปอร์เซ็นต์ และถูกดูดกลืนโดยโมเลกุลของน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และโอโซน ประมาณ 23 เปอร์เซ็นต์ เหลือตกกระทบพื้นโลกประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ และแสงแดดเป็นคลื่นแสงที่เหมาะสมต่อพืชสำหรับการสังเคราะห์แสงสร้างชีวมวล (Biomass) และมีส่วนทำให้พืชและสัตว์ดำรงชีวิตอยู่บนโลกนี้ได้



ภาพที่ 7 สเปคตรัม (spectrum) ของคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าจากดวงอาทิตย์

A สเปคตรัมเส้นบนเป็นความเข้มของคลื่นแสงก่อนเข้าสู่บรรยากาศ ของ พื้นโลก

B เป็นส่วนของคลื่นแสงที่ถูกสะท้อนกลับออกจากชั้นบรรยากาศ

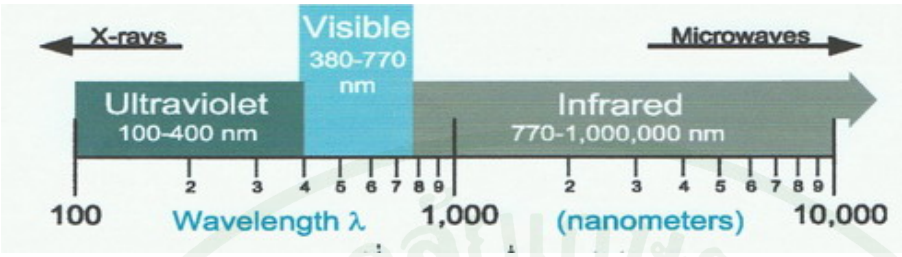
C พื้นที่ส่วนแรเงา เป็นคลื่นแสงส่วนที่ถูกดูดกลืนโดยโมเลกุลของไอน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และโอโซนในชั้นบรรยากาศ

D สเปคตรัมเส้นล่างเป็นความเข้มคลื่นแสงที่ส่องถึงผิวโลกที่ระดับน้ำทะเล วัดขณะที่ดวงอาทิตย์อยู่เหนือศีรษะ (พื้นที่ขาวใต้เส้นกราฟล่างสุด)

ที่มา : http://ozone.tmd.go.th/uvbasic.htm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มาจากดวงอาทิตย์ (คลื่นแสง) สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม ตามขนาดของความยาวคลื่นได้ ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความยาวคลื่นแสงกลุ่มต่าง ๆ

ที่มา : ozono.tmd.go.th/uvbasic.htm

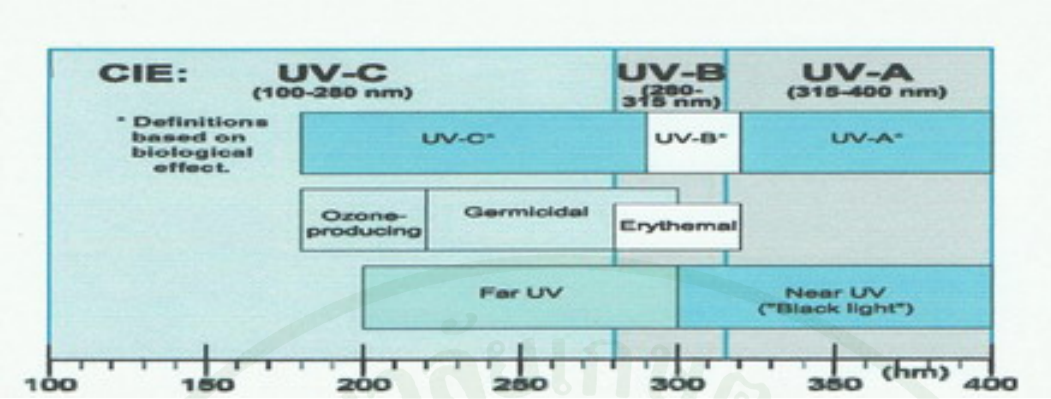
1. กลุ่มคลื่นแสงที่ตามองเห็น (visible light) มีความยาวคลื่น 0.4-0.8 ไมครอน (400-800 นาโนเมตร) เป็นกลุ่มคลื่นแสงสีต่างๆ ตั้งแต่คลื่นแสงสีม่วง สีคราม สีน้ำเงิน สีเขียว สีเหลือง สีแสด และสีแดง เรียงตามลำดับจากความยาวคลื่นจากน้อยไปมาก คลื่นแสงกลุ่มนี้เป็นคลื่นแสงที่ประสาทตาของมนุษย์ สามารถรับรู้ได้ ทำให้เราสามารถมองเห็นสิ่งต่าง ๆ ได้ และเป็นคลื่นแสงที่พืชใช้สังเคราะห์แสง

2. กลุ่มคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าความยาวคลื่นที่ตามองเห็น เป็นคลื่นที่มีความยาวคลื่นมากกว่า 0.8 ไมครอนขึ้นไป ได้แก่ คลื่นรังสีความร้อน คลื่นรังสีอินฟาเรด (infrared) คลื่นช่วงนี้ ประสาทสัมผัสของเราสามารถรับรู้ได้ในรูปความร้อน

3. กลุ่มคลื่นแสงที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่าความยาวคลื่นที่ตามองเห็น เป็นคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นน้อยกว่า 0.4 ไมครอนลงไป ได้แก่ รังสีหรือคลื่นแสงอัลตร้าไวโอเลต หรือแสงยูวี แสงอัลตร้าไวโอเลต หรือแสงยูวี เป็นพลังงานในรูปคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 0.4 ไมครอน ลงไปถึงน้อยกว่า 0.28 ไมครอน (400-280 นาโนเมตร) ซึ่งตามนุษย์ไม่สามารถมองเห็น แบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ ๆ ได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

ยูวี-เอ (UV-A) มีความยาวคลื่น 0.31 ถึง 0.40 ไมครอน (315-400 นาโนเมตร)
ยูวี-บี (UV-B) มีความยาวคลื่น 0.28 ถึง 0.31 ไมครอน (280-315 นาโนเมตร)
ยูวี-ซี (UV-C) มีความยาวคลื่นน้อยกว่า 0.28 ไมครอน (280 นาโนเมตร) แสดงในภาพที่ 9

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 ความยาวคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าของแสงยูวีชนิดต่าง ๆ

ที่มา: stvision.wordpress.com/2011/01/15/รังสียูวี

แสงอัลตร้าไวเลตเป็นแสงที่มีความยาวคลื่นสั้น ประมาณ 180 ถึง 380 นาโนเมตร แสงอาทิตย์ที่ส่องลงมายังพื้นโลกแต่ละวันจะมีพลังงานแสงอัลตร้าไวโอเลตอยู่ประมาณ 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ ของพลังงานแสงอาทิตย์ แสงยูวีที่ตกลงถึงพื้นโลกนั้นมีความยาวคลื่นตั้งแต่ 290 นาโนเมตรขึ้นไป แสงยูวีทุกช่วงความยาวคลื่นสามารถฆ่าหรือลดประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ ได้ ส่วนหลอดยูวีที่ใช้ทดลองกำจัดจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ จะเป็นหลอดยูวีความดันต่ำ (Low-pressure mercury vapor lamps) มีรายงานว่าแสงยูวีในแสงแดดมีผลต่อการเสื่อมสภาพของไวรัส เอ็นพีวีอย่างชัดเจน (Shapiro *et al*., 2002., Elnagar, 1982.) และแสงยูวีที่มีคลื่นแสงช่วง 290-320 นาโนเมตร เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่ทำให้ไวรัส เอ็นพีวีเสื่อมประสิทธิภาพ เช่น ไวรัสที่ใช้กำจัดหนอนคืบกระ หล่ำปลีสามารถคงประสิทธิภาพบนใบกระหล่ำปลีได้เพียง 2 วัน แต่อาจสามารถอยู่ได้นานถึง 10 วัน เมื่ออยู่ใต้ใบ หรือในกรณีในสภาพที่เป็นป่าไม้ ไวรัสจะคงทนได้นานกว่าในสภาพไร่ของเกษตรกร ไวรัส เอ็นพีวี ของหนอน gypsy moth สามารถอยู่ได้นานเป็นปีบนต้นโอ๊ค ในสวนป่า หรือ ไวรัส เอ็นพีวี ของหนอน European spruce sawfly อยู่ได้นานในป่าสนตลอดฤดูหนาวและสามารถก่อให้เกิดการระบาดได้ใหม่ในฤดูถัดไป (ทิพย์วดี, 2549., Young and Yearian, 1986)

สำหรับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ของหนอนสกุลอื่น เช่น *Heliothis* มีรายงานว่า แสงยูวีมีผลต่อประสิทธิภาพการทำให้เกิดโรคต่อหนอนเป็นอย่างมาก และมีหลักฐานอย่างชัดเจนว่าการเสื่อม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพหรือเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ (original activity remaining percentage, % OAR) ของเชื้อไวรัสจะเสื่อมลงจากแสงยูวีที่มีอยู่ในแสงแดด (Griego *et al*., 1985)

สำหรับไวรัส เอ็นพีวีของแมลงชนิดอื่น Morris (1971) ได้ทดลองกับเชื้อไวรัสของ weatern humlock looper พบว่า เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจะลดลง เมื่อให้เชื้อถูกแสงแดดก่อนทดสอบหนอน และได้ศึกษาถึงอิทธิพลของพลังงานแสงแดดต่อเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ของ *Neodiprion swainei* Middleton พบว่า แสงแดดมีผลทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมประสิทธิภาพอย่างเป็นสัดส่วนตรงกับเวลาที่ถูกแสงแดด Timas (1983) ได้ศึกษาผลของแสงยูวีต่อเชื้อไวรัส เอ็นพีวีของ gypsy moth; *Lymantria dispar* (Linnaeus) ซึ่งพบว่า แสงยูวีความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมประสิทธิภาพอย่างมากหลังจากได้รับแสงนานกว่า 30 วินาที ส่วนความยาวคลื่น 366 นาโนเมตร เชื้อจะเสื่อมประสิทธิภาพหลังได้รับแสงนาน 40 ชั่วโมงไปแล้ว ดังนั้นแสงยูวีในธรรมชาติที่มีอยู่ในแสงแดดจะทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมประสิทธิภาพมากในช่วงความยาวคลื่น 280-320 นาโนเมตร และเมื่อกำลังแสงมีค่า 400 mW/cm^2 จะทำให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวี เสื่อมประสิทธิภาพเกือบสมบูรณ์

อุณหภูมิ

ได้มีการศึกษาอิทธิพลของความร้อนและความเย็นที่มีต่อเชื้อ Granulosis virus ของ *Pieris brassicae* (Linnaeus) พบว่า เชื้อไวรัสบริสุทธิ์จะเสื่อมประสิทธิภาพเมื่อได้รับอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที, 65 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที, 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แต่จะไม่เสื่อมประสิทธิภาพเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 5 วัน หรือ 40 องศาเซลเซียสนาน 20 วัน และพบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวี บริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-3 องศาเซลเซียส Gudauskas and Canerday (1968) พบว่า อุณหภูมิที่ทำให้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีของผีเสื้อ *Heliothis* เสื่อมประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 75 -80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนในหนอนคืบกระหล่ำปลี *Trichoplusia ni* (Hübner) จะเสื่อมประสิทธิภาพเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 82 -88 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แต่เชื้อไวรัส เอ็นพีวีของผีเสื้อ *Heliothis virescens* (Fabricius) ยังสามารถทนอยู่ได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานเป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียความสามารถในการเกิดโรคในหนอน และยังมีประสิทธิภาพเหลืออยู่ในการทำให้เกิดโรคเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 93.3 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 30 นาที Lawrence *et al.* (2008) ได้ศึกษาไวรัสทั้งชนิด NPV และGV บางชนิด พบว่า ไวรัสของ หนอน *Pieris brassicae* L. (Linnaeus) ที่อุณหภูมิช่วง 40-70 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสลดลงเพียง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เล็กน้อยเมื่อทิ้งเชื้อไว้นาน 10 นาที และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถอยู่ได้นานถึง 10 วัน

McLeod *et al*. (1977) พบว่า การเพิ่มอุณหภูมิจาก 15 องศาเซลเซียส เป็น 45 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี แต่จะสูญเสียประสิทธิภาพอย่างมาก ถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงถึง45 องศาเซลเซียสพร้อมกับให้รับแสงยูวี

Martignoni and Iwai (1977) พบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ของ Douglas-fir Tussock Moth , *Orgyia pseudotsugata* strain BV (Multiple embedded type) จะเสื่อมประสิทธิภาพหมดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ส่วน strain SV (Single embedded type) จะเสื่อมประสิทธิภาพหมดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยทั่วไปในสภาพธรรมชาติอุณหภูมิมีผลน้อยต่อไวรัสพวก Baculovirus

การเก็บรักษาเชื้อไวรัสในสภาวะต่างๆที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อ

David and Gardiner (1967) รายงานว่าเชื้อไวรัสของ *Pieris brassicae* (Linnaeus) ยังคงมีประสิทธิภาพสูงนานถึง 4 ปีเมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 ถึง 3 องศาเซลเซียส และเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (20 องศาเซลเซียส) นาน 1 ปี โดยเชื้อยังคงมีประสิทธิภาพเช่นเดิม แต่ถ้าเก็บไว้นาน 2 ปี อัตราการตายของหนอนจะลดลงเหลือ 29 เปอร์เซ็นต์ และถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 15 ถึง 28 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่าง เชื้อไวรัสจะลดประสิทธิภาพเหลือ 22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้นาน 4 เดือน และเหลือเพียง 28 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บนาน 1 ปี Lawrence *et al.* (2008) ได้รายงานถึงการเก็บรักษาเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ว่าขึ้นอยู่กับชนิดและวิธีการเตรียมเชื้อ รวมถึงอุณหภูมิที่ใช้เก็บ กรณี *Bombyx mori* (Linnaeus) ที่เก็บในขวดแก้วในตู้เย็น สามารเก็บได้นานถึง 20 ปี แต่บางกรณีกลับพบว่าไวรัสบางชนิดที่ผลิตเพื่อการค้า แม้ว่าจะเก็บในตู้เย็นเช่นกัน ประสิทธิภาพกลับลดถึง 46 เปอร์เซ็นต์ในเวลา 2 ปี

การทดสอบประสิทธิภาพสารกำจัดแมลงศัตรูพืช

สารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ในปัจจุบัน ถือว่าเป็นปัจจัยหนึ่งในขบวนการผลิตพืชผลทางการเกษตร เนื่องจากการระบาดทำลายจากแมลงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและเป็นประจำเกือบทุกฤดูกาลปลูก ถึงแม้จะมีวิธีการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชอยู่หลายวิธี แต่การฉีดพ่นสารไม่ว่าจะเป็นสารฆ่าแมลง สารสกัดจากพืช รวมถึงจุลินทรีย์ที่ใช้กำจัดแมลงทั้งหลายก็ยังเป็นสิ่งจำเป็นเมื่อพบการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบาดของแมลง การทดสอบหาประสิทธิภาพของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อศึกษาประสิทธิภาพ และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับวางแผนป้องกันกำจัดแมลงต่อไปในอนาคต และวิธีการทดสอบที่ให้ผลอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพนั้น สามารถทดสอบในสภาพห้องปฏิบัติการก่อนแล้วจึงนำผลทดสอบนี้ไปใช้ในสภาพไร่ต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบสารกำจัดแมลงในห้องปฏิบัติการ

1. แมลงที่ใช้ในการทดสอบ แมลงเป็นสิ่งที่มีชีวิตเหมือนกับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ซึ่งจะมีความแตกต่างผันแปร แม้แต่ใน species เดียวกัน และความแตกต่างเหล่านี้เนื่องมาจาก

ก. ขนาดของลำตัว แม้จะเป็นแมลงใน species เดียวกัน แต่ถ้ามีขนาดโตกว่า จะทำให้แมลงมีความต้านทานต่อสารฆ่าแมลงมากกว่า อย่างไรก็ตามในห้องปฏิบัติการ เราสามารถควบคุมขนาดของแมลงได้ดี โดยการควบคุม population density ของแมลงกับปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยง

ข. เพศของแมลง ปกติการทดสอบสารฆ่าแมลง มักพบว่าแมลงเพศผู้แพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงมากกว่าเพศเมีย อาจเป็นสาเหตุมาจากแมลงเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ นอกจากนั้นในแมลงบางชนิดถึงแม้ว่าเพศผู้และเพศเมียจะมีขนาดเท่ากัน แต่ผลในการแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงต่างกัน ซึ่งเนื่องมาจากแมลงเพศผู้และเพศเมียมี enzyme ซึ่งมีความสามารถในการสลายตัวสารฆ่าแมลงได้แตกต่างกัน

ค. ระยะการเจริญเติบโตของแมลง สารฆ่าแมลงบางอย่างอาจให้ผลดีในการฆ่าแมลงบาง stage เท่านั้น สารฆ่าแมลงบางอย่าง เช่น arsenate หรือพวกสารหนู มีผลในการฆ่าพวกหนอนสูง แต่ไม่สามารถฆ่าแมลงในระยะไข่ ดักแด้และตัวเต็มวัย ส่วน DDT มีพิษสูงกับตัวหนอน ตัวเต็มวัย แต่ไม่มีผลในการฆ่าแมลงในระยะไข่และดักแด้ เป็นต้น

ง. อายุของแมลง อายุของแมลงก็มีผลในการแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงแตกต่างกันออกไป เช่นพวกไรแดง ในระยะไข่ใกล้ฟักจะอ่อนแอต่อสารพวกน้ำมันมากขึ้น แมลงวันที่ออกจากดักแด้ใหม่ๆ จะต้านทานต่อสารฆ่าแมลงพวก Pyrethrin มากกว่าพวกที่ฟักออกมานานแล้ว ปกติแมลงจะมีความต้านทานสูงในช่วงก่อนมีการลอกคราบ และหลังการลอกคราบแล้วจะอ่อนแอต่อสารฆ่าแมลงสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่วนแมลงที่ต่าง species กัน ถึงแม้จะมีรูปร่างใกล้เคียงกันมาก แต่ก็ยังมีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลทำให้อ่อนแอสารฆ่าแมลงต่างกันไปด้วย ได้แก่

ก. ระบบย่อยอาหาร

ข. อัตราความเร็วในการขับถ่าย

ค. ความสามารถในการอาเจียน หรือคายอาหารที่กินออกมา

ลำไส้แมลงที่มี pH สูง 6 – 10 จะเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของกรด arsenic ได้ดี อัตราการขับถ่ายจะแตกต่างกันไป เนื่องจากการกินอาหารถ้าให้กินจนอิ่มการขับถ่ายจะเร็ว ถ้าให้อดอาหารจะขับถ่ายช้า พวกตั๊กแตนมีความสามารถในการสำรอก ถ้านำมาทดสอบเกี่ยวกับสารฆ่าแมลงประเภทกินตายก็อาจให้ผลการทดลองที่ไม่ดี

2. สภาพแวดล้อมซึ่งมีผลทำให้สารฆ่าแมลงมีพิษต่อแมลงมากหรือน้อย ได้แก่ อาหาร อุณหภูมิ ความชื้น และแสง

ก. อาหาร อาหารที่มีคุณค่าต่ำ ทำให้การเจริญเติบโตของแมลง และขนาดลำตัวต่างกัน มีผลต่อการแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงต่างกันออกไป

ข. อุณหภูมิ ปกติแมลงที่จะใช้ทดสอบจะเลี้ยงในอุณหภูมิคงที่ ระหว่าง 25-27 องศาเซลเซียส เพราะอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแมลง แมลงที่เลี้ยงในอุณหภูมิเย็นจะมีขนาดโตกว่าเมื่อเลี้ยงที่อากาศร้อน นอกจากนี้อุณหภูมิก่อนการทดสอบ ขณะทดสอบ และหลังทดสอบสารฆ่าแมลงก็มีผลทำให้แมลงแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงได้ต่างกัน กล่าวคือ ก่อนทดลอง ถ้าให้อุณหภูมิต่ำจะทำให้แมลงแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงมากกว่าอุณหภูมิสูง ส่วนขณะทำการทดลอง ถ้าอุณหภูมิสูงจะทำให้แมลงมีความต้านทานสารฆ่าแมลงสูง ส่วนหลังจากการทดลองสารฆ่าแมลง ถ้าเก็บแมลงไว้ที่อุณหภูมิเย็น การสลายตัวของสารฆ่าแมลงจะช้า การขับถ่ายจะช้า แมลงก็จะแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงได้สูงขึ้น

ค. ความชื้น มีผลไม่มากต่อการแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงของแมลงที่ใช้ทดสอบ แต่จะไปมีผลทางอ้อมต่อการเจริญเติบโต ในกลุ่มของแมลงที่กินพืชเป็นอาหารความชื้นจะมีผลต่อการเจริญเติบโตน้อย ไม่เหมือนกับพวกแมลงศัตรูในโรงเก็บ (store insect)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ง. แสง จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของแมลงเช่นกัน สำหรับแมลงบางชนิด เช่น เพลี้ยอ่อน ถ้าเลี้ยงในที่ไม่มีแสงจะทำให้มีเพลี้ยอ่อนพวกมีปีกมาก แต่ถ้าเลี้ยงในที่มีแสงบ้างมืดบ้าง พวกมีปีกจะลดน้อยลง นอกจากนั้นแสงยังเป็นตัวเปลี่ยนกิจกรรมของแมลงซึ่งจะมีผลต่อการแพ้ฤทธิ์สารฆ่าแมลงเช่นกัน

3. คุณสมบัติทางเคมีของสารฆ่าแมลง ที่มีอิทธิพลต่อการเป็นพิษ ได้แก่

- ความสามารถในการแทรกซึมไปตามผิวลำตัวแมลง
- ความสามารถในการแทรกซึมผ่านลำไส้
- ขนาดอนุภาค มีอิทธิพลต่อความเป็นพิษของสารฆ่าแมลง ถ้ามีขนาดอนุภาคเล็กก็มีโอกาสไปสัมผัสแมลงได้มากขึ้น คลุมได้ทั่วถึงเท่าขนาดอนุภาคใหญ่ ๆ

4. หนทางที่สารฆ่าแมลงจะเข้าทำลาย ส่วนใหญ่สารฆ่าแมลงเข้าสู่ร่างกายแมลงโดยผ่านทางผนังลำตัว (cuticle) นอกจากนั้นสามารถเข้าทางระบบการหายใจ ทางปาก ทางอวัยวะอื่น ๆ การที่สารฆ่าแมลงจะเข้าสู่ร่างกายของแมลงทางอวัยวะส่วนใด ย่อมขึ้นอยู่กับชนิดของสารฆ่าแมลงและชนิดของแมลงเป็นสำคัญ เช่นพวก pyrethrum เข้าสู่ร่างกายแมลงทางรูหายใจ malathion เข้าสู่ร่างกายแมลงสาบทางขามากที่สุด ส่วนแมลงวัน ยุงและผึ้ง จะเข้าทาง tarsi มากที่สุด (ธรรมนูญ และเกรียงไกร, 2528., Busvine, 1971)

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี

วิธีการทดสอบมีหลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิด ประเภทของสาร กล่าวคือ ถ้าเป็นสารเคมีกำจัดแมลง สามารถแบ่งได้เป็น 8 วิธี คือ

1. โดยวิธีการฉีดสารฆ่าแมลงเข้าไปในลำตัวแมลง (Injection method) เป็นการฉีดสารฆ่าแมลงเข้าไปในช่องว่างระหว่างลำตัว (body cavity) ของแมลงตามปริมาณที่กำหนด วิธีการนี้เป็นการทดสอบกับแมลงแบบตัวต่อตัว และแมลงที่ใช้ต้องมีขนาดโตพอสมควร การฉีดสารฆ่าแมลงเข้าไปในลำตัวแมลงโดยตรงนี้ ทำให้สารฆ่าแมลงผ่านผนังลำตัวเข้าไปทางสายเลือดโดยตรงเท่ากับเป็นการวัดประสิทธิภาพสูงสุดของสารฆ่าแมลงแต่ละชนิด ความละเอียดถูกต้องของวิธีการนี้ค่อนข้างสูงและไม่จำเป็นต้องใช้แมลงเป็นจำนวนมาก วิธีการ Injection จะให้ผลที่แน่นอนและแม่นยำสูง ใช้สารฆ่าแมลงจำนวนน้อย ความเข้มข้นต่ำ และให้ผลรวดเร็วโดยใช้เครื่องมือ Microsyringe applicator

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. โดยวิธีการหยดสารฆ่าแมลงบนตัวแมลง (Topical application) เป็นวิธีการที่ทำให้สารฆ่าแมลงสัมผัสโดยตรงกับตัวแมลง ให้ประโยชน์อย่างเห็นได้ชัด ในการศึกษาถึงปฏิกิริยาที่สารฆ่าแมลงมีต่อแมลงโดยตรง เป็นการทดสอบสารฆ่าแมลงกับแมลงแบบตัวต่อตัว โดยใช้เครื่องมือ Microsyringe applicator เช่นกัน โดยหยดสารฆ่าแมลงลงไปบนส่วนอกของแมลง ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นจุดรวมของปมประสาท และเป็นส่วนที่แมลงไม่สามารถที่จะกำจัดสารฆ่าแมลงออกไปได้จากลำตัว

สองวิธีที่กล่าวมานี้ทดสอบโดยใช้เครื่องมือ Microsyringe applicator ซึ่งก่อนทำการทดลองต้องวัดประสิทธิภาพของเครื่องเสียก่อน โดยใช้สารปรอทเป็นตัววัด เนื่องจากปรอทเป็นสารที่ไม่เกาะติดแก้ว และไม่เปลี่ยนสภาพได้ง่ายในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป

3. โดยวิธีการให้แมลงกิน (Feeding method) มีหลายวิธีแต่ที่นิยมใช้มากคือวิธี Sandwich method ซึ่งอาหารที่ให้อาจเป็นใบพืช เป็นวิธีการซึ่งเหมาะสำหรับการทดสอบสารฆ่าแมลงชนิดกินตาย โดยใบพืชที่ให้แมลงกินควรพอดี แมลงกินหมดสำหรับการทดสอบแบบตัวต่อตัว โดยนำใบพืชที่มีขนาดเท่ากันหรือตัดให้มีขนาดและรูปร่างเท่ากัน ใบหนึ่งนำไปหยดสารฆ่าแมลงที่ใช้ทดสอบ นำอีกใบไปประกบให้สนิท โดยไม่ให้สารฆ่าแมลงที่หยดไว้ไหลออกมา ใช้เข็มหมุดเสียบไว้ ถ้าเป็นสารฆ่าแมลงชนิดผงก็ใช้วิธีฉีดพ่นไปบนใบพืชใบหนึ่ง ส่วนอีกใบทาด้วยแป้งเปียกแล้วนำมาประกบให้สนิทกับใบที่ฉีดพ่นสารฆ่าแมลงไว้ จากนั้นปล่อยแมลงลงไปกิน เมื่อกินหมดก็เปลี่ยนใบใหม่ให้แทน

สำหรับแมลงปากดูด พวกมวนต่าง ๆ จะผสมสารฆ่าแมลงกับน้ำแล้วชุบแท่งสำลีไว้ให้แมลงดื่มพร้อมกับใส่พืชอาหารไว้ต่างหากอีกทีหนึ่ง

4. วิธีการจุ่มตัวแมลง (Dipping method) ใช้ทดสอบเป็นบางกรณี ซึ่งการทดสอบด้วยวิธีดังกล่าวไม่สามารถกระทำได้ เช่น การทดสอบกับแมลงที่อาศัยอยู่ในน้ำ ไม่สามารถทนต่อสภาพปกติได้ โดยการคีบแมลงที่ใช้ทดสอบจุ่มลงในสารฆ่าแมลงตามเวลาที่กำหนด นำขึ้นมาอยู่ในสภาพเดิม วิธีการนี้สามารถนำมาใช้กับแมลงชนิดอื่น ๆ ได้ ซึ่งไม่ต้องการความละเอียดมากนักให้ผลทั้งในแง่สารฆ่าแมลงประเภทถูกตัวตายและกินตาย แต่เป็นวิธีการที่เราไม่ทราบปริมาณสารฆ่าแมลงที่แท้จริง ที่ติดตัวแมลงและเป็นผลทำให้แมลงตาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. วิธีการจุ่มใบพืช (Leaf dipping method) โดยการจุ่มใบพืชอาหารของแมลงที่ใช้ทดสอบไปในสารฆ่าแมลงตามเวลาที่กำหนด นำขึ้นมาทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำแมลงมาปล่อยให้กินและปริมาณของสารฆ่าแมลงที่แท้จริงที่แมลงกินเข้าไปไม่ทราบแน่นอน

6. โดยการให้สัมผัสสารฆ่าแมลง (Contact หรือ Residual exposure method) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทดสอบสารฆ่าแมลงที่มีพิษในทางสัมผัส โดยละลายสารฆ่าแมลงในตัวทำละลายที่ระเหยง่ายใส่ในภาชนะที่ใช้ทดสอบ นำไประเหยให้แห้งแล้วปล่อยแมลงที่ต้องการทดสอบลงไป จากนั้นภายในเวลาที่กำหนดจึงนำแมลงกลับมาสู่สภาพเดิม หรืออาจเรียกว่า Dry film method ก็ได้

7. โดยการพ่นสารฆ่าแมลงโดยตรง (Direct spray) ใช้ทดสอบได้กับแมลงเป็นกลุ่ม โดยการฉีดพ่นสารฆ่าแมลงให้ถูกตัวแมลง หรือพืชอาหารโดยให้ปริมาณของสารฆ่าแมลงตกลงบนแมลงหรือพืชอาหารเป็นมาตรฐานเดียวกัน โดยการกำหนดเวลาและความดันของเครื่อง สำหรับแมลงจะใส่ไว้ในภาชนะที่สารฆ่าแมลงสามารถผ่านได้ เพื่อทำการ spray สารฆ่าแมลงจะผ่านไปตกตามตัวของแมลงในอัตราที่เท่ากัน ซึ่งเครื่อง spray ที่ใช้อาจเป็น Potter's spray tower หรือ turn table spray

8. โดยการพ่นผง (Dusting) เครื่องมือที่ใช้อาจเป็น Bell jar Dusting Dusting tower หรือ Dusting tunnel ก็ได้ แต่ทั้งสามชนิดก็มีหลักการเหมือนกันคือ การเป่าลมในภาชนะจำกัด เพื่อให้ตัวสารฆ่าแมลงในรูปผงกระจายไปอย่างทั่วถึงบนพื้นผิวที่เราต้องการ และปริมาณของสารฆ่าแมลงที่ตกบนพื้นที่นั้น ๆ สามารถคำนวณได้จากการชั่งน้ำหนัก โดยเฉพาะ Bell jar Dusting จะมีการกระจายของสารฆ่าแมลงดีกว่าอันอื่น ๆ

โดยปกติ ในการทดสอบสารฆ่าแมลงกับแมลงแบบตัวต่อตัว มักใช้ปริมาณแมลงต่ำกว่า 25 ตัว ต่อ treatment ส่วนการทดสอบสารฆ่าแมลงกับแมลงแบบกลุ่มจะใช้แมลง 40 – 50 ตัวเป็นอย่างต่ำ แต่สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี จะมีความแตกต่างค่อนข้างมากจากสารเคมีฆ่าแมลงซึ่งส่วนใหญ่มาจากขบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากไวรัส เอ็นพีวี ผลิตจากแมลงอาศัย (host) จึงมีความแปรปรวนตามปัจจัยสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ไวรัสที่ผลิตได้ในแต่ละครั้งอาจมีประสิทธิภาพแตกต่างกัน การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัสกับแมลงอาศัยจึงเป็นสิ่งสำคัญ โดยมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. เพื่อให้ทราบว่าไวรัส เอ็นพีวี ที่ผลิต มีความสามารถทำให้แมลงเป็นโรคตายได้ดีมากน้อยเพียงใด รวมถึงระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายนาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ทำให้ทราบคุณภาพและประสิทธิภาพว่าได้มาตรฐานตามข้อกำหนดหรือไม่ เพื่อให้สามารถปรับอัตราความเข้มข้น หรืออัตราการนำไปใช้ในสภาพไร่ได้อย่างเหมาะสม โดยทั่วไปแล้วผลจาก Bioassay ในห้องปฏิบัติการจะนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปปรับใช้ในสภาพไร่ต่อไป

3. สามารถใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่าง ๆ เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุด

การทดสอบประสิทธิภาพของไวรัส ต้องมีการตรวจนับปริมาณไวรัส เอ็นพีวี ก่อนนำไปทดสอบ ซึ่งไวรัสกลุ่มนี้สามารถตรวจนับได้ง่าย เพราะสร้างผลึกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเอาไว้เพื่อปกป้องตัวเองจากสภาพแวดล้อมภายนอก ผลึกโปรตีนนี้เรียกว่า polyhedral inclusion bodies (PIBs) หรือ occlusion bodies (OBs) หน่วยที่ใช้วัดเรียกเป็นจำนวน PIBs หรือ OBs ต่อปริมาตรเช่น มิลลิลิตร หรือ มิลลิกรัม

เทคนิคการทำ Bioassay

การทำ Bioasay กับแมลงทดลองชนิดต่าง ๆ จำเป็นต้องศึกษาอัตราความเข้มข้นของไวรัส ลักษณะอาการเกิดโรค ระยะเวลาที่ทำให้แมลงทดลองตาย แต่เนื่องจากแมลงมีขนาดที่หลากหลาย อุปนิสัยการกินที่แตกต่างกัน ทำให้การทำ bioasay จึงมีหลายวิธีตามความเหมาะสมกับชนิดและขนาดของแมลง รวมถึงวิธีการที่จะใช้ในทดลอง ซึ่งมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน คือ การใช้ไวรัสเคลือบบนผิวหน้าของอาหาร (Surface contamination) เป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก สามารถปฏิบัติกับอาหารเทียมหรือใบพืช โดยเตรียมสารละลายแขวนลอยของไวรัส ในอัตราที่ต้องการ

กรณีที่ใช้ใบผักทดสอบ ถ้าเป็นพืชที่มีไข (Wax) เคลือบบนใบ เช่น ใบคะน้า ควรผสมสารจับใบลงไปเล็กน้อย เพื่อลดความตึงผิวของใบผัก ช่วยให้ไวรัสเกาะติดบนใบผักได้ดีขึ้น เมื่อจุ่มใบผักลงในสารละลายแขวนลอยของไวรัส เอ็นพีวี แล้วนำขึ้นผึ่งในห้องปกติรอจนใบแห้ง จึงนำใบผักใส่จานแก้วหรือกล่องพลาสติกเพื่อให้หนอนที่ใช้ทดสอบกินต่อไป เมื่อหนอนทดสอบกินใบผักครบ 24 ชั่วโมง ให้เปลี่ยนใบผักใหม่ที่ไม่มีเชื้อไวรัส ตรวจผลการตายของหนอนทุกวัน ประมาณ 7-15 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงที่ใช้ทดสอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการใช้อาหารเทียมแทนใบผัก มีวิธีปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ให้เคลือบผิวหน้าของอาหารเทียมที่บรรจุอยู่ในภาชนะเลี้ยงด้วยสารละลายแขวนลอยไวรัสที่เตรียมไว้ในอัตราที่ต้องการ ปล่อยหนอนทดลองลงไปกินตลอดการทดลองโดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารเทียมตลอดการทดสอบ ตรวจผลการตายของหนอนทุกวัน ประมาณ 7-15 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงที่ใช้ทดสอบ วิธีนี้ค่อนข้างสะดวกในการดำเนินการ ใช้ได้ดีกับแมลงที่มีนิสัยกัดกินผิวหน้าของอาหาร โดยเฉพาะหนอนกระทู้ผัก และหนอนกระทู้หอม ยกเว้นหนอนที่มีนิสัยกัดกินเจาะเข้าไปในอาหารเทียม ทำให้หนอนได้รับเชื้อน้อยกว่าอัตราที่กำหนด ทำให้เกิดความแปรปรวนสูงต่อเปอร์เซ็นต์ของหนอนทดลอง (อุทัย, 2534, สมชัย, 2542)

การประเมินผลกำหนดอัตราการตายของแมลง

ในการทดสอบสารฆ่าแมลงจำเป็นต้องทำมาตรฐานของการวัดอัตราการตายไว้ และแมลงมักมีการตายที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งถ้ามีการตายของแมลงเกิดขึ้นใน control ก็จำเป็นต้องใช้ Abbott 's formula (1925)

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

ส่วนการกำหนดว่าแมลงที่ทดสอบตายหรือไม่ตาย อาจดูจาก

1. ขาบิดหรือไม่ เช่นพวกไรเมื่อใกล้ลอกคราบจะเหยียดขาและเกาะนิ่งอยู่เฉย ๆ ต้องอาศัยดูจากขา ถ้าขาบิดแสดงว่าตาย ถ้าไม่บิดแสดงว่ายังไม่ตาย

2. เดินได้หรือไม่ ในการทดสอบ บางครั้งจะพบว่าแมลงที่ใช้ทดสอบสามารถขยับตัวได้ ถ้าเพียงแต่ขยับตัวแต่ไม่สามารถเดินได้ก็ถือว่าแมลงตายแล้ว

3. ความสามารถในการลากลำตัวเคลื่อนย้าย ใช้สำหรับพิจารณาแมลงที่ทดสอบพวกหนอน ถ้าไม่สามารถลากลำตัวเคลื่อนย้ายไปได้ให้ถือว่าตาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ความสามารถในการเคลื่อนย้ายหนีความร้อน หรือเคลื่อนเข้าหาแสง แมลงที่ใช้ทดสอบบางอย่าง อาจเป็นแมลงที่ชอบเกาะนิ่ง ๆ ไม่ค่อยมีการเคลื่อนย้าย เราก็ทำการทดสอบว่าแมลงตายหรือไม่ โดยใช้ความร้อน ถ้ายังไม่ตายจะเคลื่อนหนีความร้อน ส่วนพวกลูกน้ำยุงจะเคลื่อนเข้าหาแสง เป็นต้น

5. ความสามารถในการบินและเกาะ ใช้สำหรับพิจารณาแมลงที่บิน เช่น แมลงหวี่ บางครั้งเราจะพบว่าแมลงหวี่ยังบินได้แต่เป็นเพียงบินขึ้นไป หมุนแล้วตกลงมา ไม่สามารถบินขึ้นเกาะได้ ให้ถือว่าตายแล้ว

การประเมินผลการทดสอบสารฆ่าแมลงว่าแมลงที่ทดสอบตายหรือไม่ ปกติจะตรวจผลการทดสอบภายใน 24 ชั่วโมง หลังจากการทดสอบ หรือ 24 ชั่วโมงหลังจากแมลงที่ทดสอบได้รับสารฆ่าแมลงเข้าไป (James, 1971)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบและการผลิตไวรัส เอ็น พี วี

    1.1 เครื่องชั่งไฟฟ้า PB1502-5 (Mettler, Switzerland)
    1.2 ภาชนะชนิดต่าง ๆ เช่น ถาดพลาสติก และถาดโลหะ
    1.3 เทอร์โมมิเตอร์
    1.4 เครื่อง Ultracentrifuge SW 27 (Roter, United Kingdom)
    1.5 อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงหนอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ อาหารเทียม ถ้วยพลาสติกเลี้ยงหนอน
    1.6 กล้องจุลทรรศน์ ชนิดคอนทราส Model BX 50 (Olympus, Japan)

2. อุปกรณ์ในการศึกษาอายุเก็บรักษา

    2.1 เครื่องผนึกถุง
    2.2 ขวดพลาสติกขาว
    2.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

    3.1 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาอายุการเก็บรักษา

        3.1.1 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ B 50 (Memmert, Germany)
        3.1.2 หลอดยูวีบี ชนิดบี 26W (Phillip, Netherlands)
        3.1.3 เครื่องวัดแสงยูวี ชนิด บี UV-340 (LT Lutron, Taiwan)

    3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

        3.2.1 เครื่องคอมพิวเตอร์ Satellite 200 (TOSHIBA , Japan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3.2 โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ ได้แก่ SPSS เวอร์ชั่น 14

4. วัตถุดิบอื่นๆ

4.1 เชื้อไวรัส เอ็นพีวี 3 ชนิดได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus (SlNPV), ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* nucleopolyhedrovirus (SeNPV) และไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedrovirus (HaNPV)

4.2 ชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก (BIO DOA V3)

4.3.สารผสมหรือสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Anti microbial, Spreader และ UV protectants

4.4 หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Fabricius)

4.5 อาหารเทียมเลี้ยงหนอน (รายละเอียดในภาคผนวก)

วิธีการ

1. การเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อผลิตไวรัส เอ็นพีวี

หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litula* (Fabricius) ที่ใช้ในการศึกษานี้ เก็บจากแปลงพืชผักชนิดต่างๆ ของเกษตรกร ในเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการของอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร โดยเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 27±1 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ 70 เปอร์เซ็นต์ จนหนอนเข้าดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัย ผสมพันธุ์และวางไข่ตามลำดับ

1.1 ระยะไข่

หลังจากปล่อยให้ตัวเต็มวัยตัวผู้และตัวเมียผสมพันธุ์กันแล้ว ตัวเมียจะวางไข่ติดกับกระดาษไขที่บุข้างกล่อง และวางข้างถ้วยใส่น้ำผึ้งที่เป็นอาหารของตัวเต็มวัย เก็บไข่ทุกวันโดยเปลี่ยนกระดาษไขที่บุข้างกล่องและเปลี่ยนถ้วยใส่น้ำผึ้งใหม่แทน นำไข่ใกล้ฟักที่เริ่มเปลี่ยนเป็นสีดำแช่ลงในฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เปลือกไข่ ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ผึ่งให้แห้ง นำมาใส่กล่องพลาสติกสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 6x10x2.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิ้ว หรือถ้วยพลาสติกกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว สูง 3 นิ้ว ซึ่งมีอาหารเทียมที่ผสมฟอร์มาลินตามสูตรของอุทัย (2525) โดยคว่ำให้ตัวกล่องที่มีอาหารอยู่ด้านบนและฝากล่องที่มีกระดาษไขและถ้วยวางอยู่ด้านล่าง

1.2 ระยะหนอน

เมื่อตัวหนอนฟักออกจากไข่จะไต่ขึ้นไปกินอาหารเทียม และเจริญเติบโตในภาชนะเลี้ยงจนเข้าวัย 2-3 คือมีอายุระหว่าง 6-9 วัน แยกหนอนไปเลี้ยงในถ้วยพลาสติก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 นิ้ว สูง 2.5 นิ้ว ซึ่งบรรจุอาหารเทียมหนา 1 เซนติเมตร ใส่หนอนถ้วยละ 2-3 ตัว เพื่อไม่ให้แออัดเกินไป สำหรับหนอนที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ ใช้อาหารเทียมซึ่งผสมฟอร์มาลิน แต่หนอนที่จะนำไปใช้ผลิตขยายเชื้อไวรัส จะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมที่ไม่ใส่ฟอร์มาลิน เนื่องจากฟอร์มาลินมีคุณสมบัติในการลดประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส และหนอนจะเจริญเติบโตจนกระทั่งเข้าดักแด้ที่ก้นถ้วยอาหาร

1.3 ระยะดักแด้

เก็บดักแด้จากก้นถ้วยอาหารมารวมกัน แช่ในฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที เพื่อทำลายจุลินทรีย์ต่างๆ ที่ติดมาตามผิวนอกของดักแด้ ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งนำไปใส่โหลแก้วหัวท้ายเปิดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.5 นิ้ว สูง 5.0 นิ้ว ปิดปากด้านบนด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ภาพที่ 10) เก็บกล่องไว้ในที่มืดจนกระทั่งดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัย

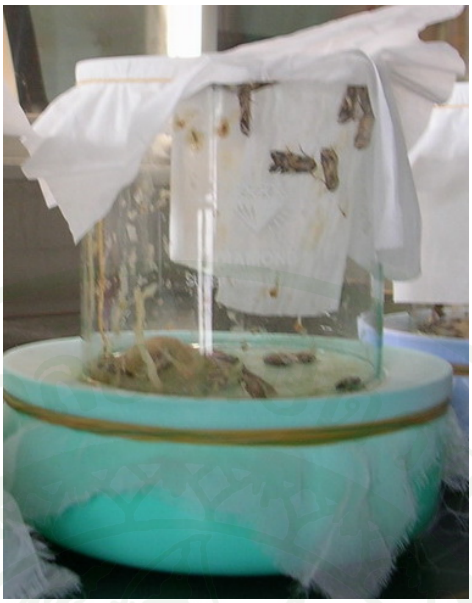
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 ดักแด้ของหนอนกระทู้ผักที่รอฟักเป็นผีเสื้อตัวเต็มวัย

1.4 ระยะตัวเต็มวัย

เมื่อดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัยในโหลแก้ว คัดตัวเต็มวัยให้เหลือทั้งเพศผู้และเพศเมีย โหลละ 10 คู่ ปิดปากกล่องด้วยผ้าขาวบาง บุภายในด้วยกระดาษไขใส่ถ้วยพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำผึ้งไว้ในกล่อง เพื่อเป็นอาหารของผีเสื้อ ด้านล่างของกล่องหล่อน้ำไว้เพื่อให้ความชื้นแก่ตัวเต็มวัย ในช่วงผสมพันธุ์ (ภาพที่ 11) เลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ 70 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงจนถึงผีเสื้อผสมพันธุ์กันแล้ววางไข่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 ผีเสื้อของหนอนกระทู้ผักที่รอผสมพันธุ์แล้ววางไข่

2. แหล่งของเชื้อและการเพิ่มปริมาณของเชื้อ

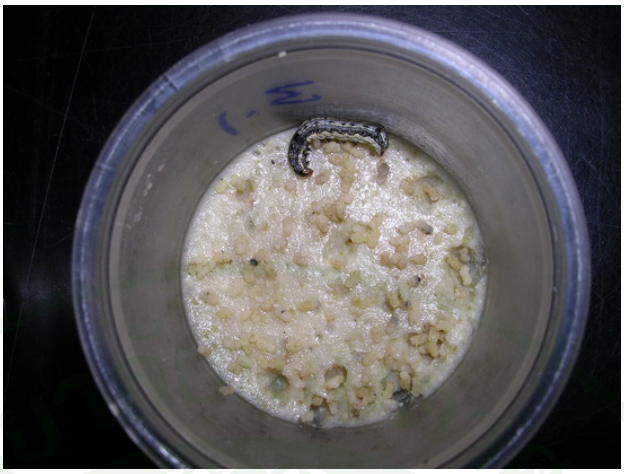
2.1 แหล่งของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี

เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ของหนอนกระทู้ผักที่ใช้ในการศึกษานี้ ได้มาจากเชื้อบริสุทธิ์ของกรมวิชาการเกษตร ซึ่งเก็บรวบรวมจากหนอนที่เป็นโรคตายด้วยไวรัส เอ็นพีวี จากแหล่งเพาะปลูกพืชชนิดต่าง ๆ ของประเทศไทย

2.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสโดยใช้หนอนกระทู้ผักวัย 3 ซึ่งมีอายุประมาณ 8-9 วันเป็นแมลงอาศัย ด้วยการทาเชื้อไวรัสลงบนอาหารเทียม ในถ้วยพลาสติกใสสำหรับใช้เชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.5 นิ้ว สูง 1.5 นิ้ว ใส่หนอนกระทู้ผักลงไปถ้วยละ 1 ตัว ใช้เวลาประมาณ 5-7 วัน หนอนจะแสดงอาการติดโรคตาย (ภาพที่ 12) และเป็นระยะที่ให้จำนวนผลึกของไวรัสสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 12 หนอนกระทู้ผักที่ตายหลังจากได้รับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี

เก็บหนอนที่ตายด้วยเชื้อบรรจุในขวดสีชา แต่ถ้าตัวหนอนแตกเละ ก็ให้หยดน้ำกลั่นลงไปเล็กน้อยแล้วดูดซากหนอนด้วย pasteur pipette บรรจุในขวด เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เมื่อได้ปริมาณมากพอแล้ว จึงทำการปั่นซากหนอนที่เก็บไว้ให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น (blender) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางซ้อนกัน ๒ ชั้น เพื่อแยกส่วนที่ไม่ต้องการออก เช่น ซากหนอนหรือเศษอาหารเทียม (ภาพที่ 13) แล้วนำสารละลายที่ผ่านการกรองนี้มาตรวจนับจำนวนผลึก ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด (hemacytometer) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อปรับอัตราความเข้มข้นของจำนวนผลึกให้เท่ากับ $1x10^{9}$ ผลึกต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 13 เชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ที่ผ่านการปั่นละเอียดและกรองแล้ว

3. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

3.1 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification)

นำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี sucrose density gradient centrifugation โดยทำ gradient ของสารละลายน้ำตาล 6 ชั้นในหลอด centrifuge โดยให้น้ำตาลแต่ละชั้นมีความหนาเท่ากับ 6 มิลลิลิตร และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมีค่า 60, 58, 56, 54, 52 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืนให้น้ำตาลละลายเข้าหากันจนมองไม่เห็นการแบ่งชั้น จากนั้นใส่เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ผ่านการกรองดังกล่าวข้างต้นแล้วลงไปบนผิวหน้าสารละลายน้ำตาลประมาณ 2 มิลลิเมตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง Ultracentrifuge ใช้หัว Roter SW 27 ที่ความเร็วประมาณ 25,000 รอบต่อนาที (rpm) นาน 1.5 ชั่วโมง จะเห็นชั้นของผลึกโปรตีนของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี เป็นชั้นสีขาวขุ่นที่ระยะสูงประมาณ 3.3 เซนติเมตร จากก้นหลอด ดูดชั้นของเชื้อไวรัส เอ็นพีวีขึ้นมา เติมน้ำกลั่นที่สะอาดลงไปเพื่อเจือจางสารละลายน้ำตาล นำมาปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบ นาน 20 นาที ผลึกโปรตีนของเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี จะตกตะกอนที่ก้นหลอด เทน้ำทิ้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 2-3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้จนตะกอนละลายขึ้นมาหมด นำมา dialysis โดยแช่น้ำกลั่นในตู้เย็นข้ามคืน เพื่อล้างน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ออก จากนั้นมาทำให้บริสุทธิ์ซ้ำอีกครั้งตามวิธีการข้างต้น แล้วนำเชื้อ NPV ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของผลึกโปรตีนด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เครื่อง hemacytometer นำเชื้อไวรัส เอ็นพีวี นี้เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (อุทัย, 2534)

3.2 การศึกษาจีโนมและลำดับเบส

3.2.1 การสกัด DNA ของเชื้อ Nucleopolyhedrovirus (NPV) และการตรวจสอบยีน Polyhedrin (*polh)* ด้วยกระบวนการ PCR

นำไวรัสที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 มาปั่นตกตะกอนเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำกลั่นด้วยความเร็ว12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นสกัด total DNA โดยบดตัวอย่างตะกอนเชื้อ Nucleopolyhydrovirus ใน extraction buffer (2% CTAB, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.02 M EDTA, 1.4 M NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ให้ละเอียดด้วยแท่งบดพลาสติก ในหลอด microcentrifuge tube จากนั้นเติม 25 mM B-mercaptoethanol ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดน้ำใสใส่ในหลอดใหม่ เติม phenol: chroloform: isoamyl alcohol (25:24:1 โดยปริมาตร) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนน้ำใสที่ดูดได้ ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสใส่ในหลอดใหม่ เติม 0.1 เท่า โดยปริมาตรของ 3 M CH_3COONa (pH 5.2) และ 1 เท่า โดยปริมาตรของ isopropanol ที่เย็นจัด พลิกหลอดไปมาเบา ๆ นำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้งให้หมด ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง จากนั้นทำตะกอนให้แห้งโดยใช้ vacuum แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer (0.01 M Tris-pH 8.0, 0.001 M EDTA) ที่เติม RnaseA (ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Fluton *et al.*, 1995) แล้วนำ DNA ที่สกัดได้ไปใช้ในขั้นตอนการตรวจสอบการมีอยู่ของยีน Polyhedrin (*polh)* ด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *Polh*-NPV-F และ *Polh*-NPV-R สำหรับตรวจสอบยีน *polh* (Seufi, 2008) (ตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการมีอยู่ของยีน *polh* ของเชื้อ Nucleopolyhedrovirus ด้วยวิธี PCR

primer name	primer sequence
Polh-NPV-F	5' –GG(GT) CC(GT) GGC AAG AAT CAG AA- 3'
Polh-NPV-R	5' –GCG TC(TG) GG(TG) GCG AAC TCT TT(TG) ATT TT- 3'

ปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

10 x PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris HCl, (pH 8.3), 1 mg /ml BSA, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$)	2.5 ไมโครลิตร
2 mM dNTP mixture	1.25 ไมโครลิตร
20 mM ไพรเมอร์ แต่ละเส้น	0.25 ไมโครลิตร
5 ยูนิตต่อไมโครลิตรของ *Taq* DNA polymerase (RBC bioscience, Taiwan)	0.1 ไมโครลิตร

เริ่มปฏิกิริยา PCR ในรอบแรกสำหรับ DNA denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา จำนวน 35 รอบ โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ DNA denaturation ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, primer annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส 2 นาที, และ DNA extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที ตามลำดับ และทำปฏิกิริยาสำหรับ final DNA extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5 x TBE (0.045 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.045 M Boric acid, 0.013 M EDTA).

3.2.2 การโคลน DNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR

ทำการโคลน PCR products ของยีน *polh* ที่ได้เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pJET1/blunt vector (Fermentas, Lithuania) ขนาด 3,128 คู่เบส ตามคำแนะนำในคู่มือของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นนำ recombinant plasmid ที่ได้ถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ XL1-blue ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกมาตรวจสอบยีนที่โคลนเข้าไปในพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน *polh* (ตารางที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่อยู่ใน recombinant plasmid โดยใช้บริการของ Genome institute ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และตรวจวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNASTAR Software (Laser gene, Wisconsin, USA.) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่มีรายงานใน GenBank (ตารางที่ 2)

จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 โคลนที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เอ็นพีวีที่มีรายงานอยู่ใน GenBank ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ท โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) แล้วทำการเปรียบเทียบระดับกรดอะมิโน โดยการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ท ด้วยโปรแกรม Blastx (website: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTX) และนำลำดับจีโนมเหล่านี้มาจำแนกความสัมพันธ์โดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม ClustalW (website: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview) ผ่านเครือข่ายระบบอินเตอร์เน็ท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 เชื้อไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่าง ๆ จำนวน 13 สายพันธุ์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank

Viruses	Abbreviations	Accession numbers	Authors
Thailand :			
Unknow 1 : HaNPV DOA	HaNPV DOA	-	
Unknow 2 : SeNPV DOA	SeNPV DOA	-	
Unknow 3 : SlNPV DOA	SlNPV DOA	-	
1. Bombyx mori nucleopolyhedrovirus	BmoNPV	AY779044	Kaewwises *et al*., 2004
China :			
2. Bombyx mandarina nucleopolyhedrovirus	BmoNPV	NC012672	Xu e*t al*.,2010
3. Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus	HaNPV	NC003094	Zhang *et al*., 2005
India :			
4. Helicoverpa armigera NPV strain Bathinda	HaNPV strain Bathinda	FJ157292	Gupta *et al*.,2008
5. Helicoverpa armigera NPV strain Jodhan	HaNPV strain Jodhan	FJ157294	Gupta *et al*.,2008
6. Helicoverpa armigera NPV strain PAU	HaNPV strain PAU	FJ157291	Gupta *et al*.,2008
7. Helicoverpa armigera NPV strain PDBC	HaNPV strain PDBC	FJ157293	Gupta *et al*.,2008
Netherland :			
8. Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus	SeNPV	AF169823	Van *et al*.,1992
Newzealand :			
9. Epiphyas postvittana nucleopolyhedrovirus	EpNPV	NC003083	Hyink *et al*., 2002

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Viruses	Abbreviations	Accession numbers	Authors
United Kingdom :			
10. Autographa califomica nucleopolyhedrovirus	AcNPV	NC001623	Ayres *et al*.,1994
11. Autographa califomica nucleopolyhedrovirus clone C6	AcNPV clone C6	L22858	Ayres *et al*.,1994
United state of America :			
12. Bombyx mori NPV polyhedron gene	BmoNPV	NC001962	Gomi *et al*.,1999
13. Plusia orichaicea nucleopolyhedrovirus	PoNPV	AF019882	Carner *et al.,*1998

4. การศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลต (UV) ที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

เตรียมตู้ฉายแสง UV ชนิด B ความยาวคลื่นแสง ประมาณ 290 นาโนเมตร เป็นแหล่งกำเนิดแสงใช้หลอดยูวี Phillip 26 W ที่มีกำลังส่องสว่าง (output) 26 วัตต์ต่อ 100 ชั่วโมง จำนวน 2 หลอด ติดตั้งหลอดให้มีระยะครอบคลุมทุกตัวอย่างเท่ากันทั่วพื้นที่สำหรับวางตัวอย่าง และวัดระดับแสงด้วยเครื่องวัดแสงยูวี LT Lutron UV-340 ให้ได้พลังงานแสงตกลงพื้นที่เท่ากับ 1 $\mu W/cm^2$ เท่ากันหมด ระยะห่างของตัวอย่างถึงแหล่งกำเนิดแสงประมาณ 19 เซนติเมตร แล้วนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวีหนอนกระทู้ผัก ที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปรับความเข้มข้นให้ได้ 3 ระดับ คือ $0.25x10^9$, $0.5x10^9$ และ $1x10^9$ผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร ผสมสารจับใบ (sticky) 0.1 % (Teepol™) หยดสารละลายแขวนลอยของเชื้อไวรัสที่เตรียมไว้ลงบนอาหารเทียมที่เตรียมไว้แล้วในถ้วยพลาสติกขนาด 20 ออนซ์ ซึ่งมีพื้นที่ผิวหน้าอาหารเทียมประมาณ 8 ตารางเซนติเมตร หนาประมาณ 2 มิลลิเมตร หยดสารละลายลงไปถ้วยละ 15 ไมโครลิตร แล้วเกลี่ยสารละลายที่หยดลงไปให้ทั่วพื้นผิวหน้าของอาหารเทียม ทิ้งให้แห้งในสภาพห้องที่ปลอดเชื้อ แล้วนำไปฉายแสงตู้ให้แสง UV ตามวิธีของ Hienton *et al.* (1958) เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงจนครบ 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว นำอาหารเทียมทั้งหมด มาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำให้เกิดโรคโดยการทำ bioassay กับหนอนกระทู้ผัก วัย 3 อายุประมาณ 7-9 วัน ปล่อยหนอนกระทู้ผักที่เตรียมไว้ลงไปถ้วยละ 1 ตัว ใช้หนอนทดสอบ 40 ตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อกรรมวิธี นำถ้วยอาหารซ้อนกันเพื่อให้มีพื้นที่ระหว่างถ้วยประมาณ 0.5 เซนติเมตร เพื่อบังคับให้หนอนที่ทดสอบกินอาหารและไม่คลานหนีไปจากอาหาร (สมชัยและคณะ, 2542) เปรียบเทียบกับไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ไม่ได้รับแสง และน้ำกลั่น วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ใช้เชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ไม่ได้รับแสงและน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม บันทึกการตายของหนอนทุกวันหลังจากให้เชื้อจนหนอนตายหรือเข้าดักแด้หมด ถ้ามีหนอนตายใน control ให้ทำการปรับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนโดยใช้สูตรของ Abbott (1925) แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ปรับค่ามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5. การศึกษาผลของอุณหภูมิในระดับต่าง ๆ และช่วงความยาวนานของการได้รับอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี ที่เตรียมตามวิธีการในข้อ 2 มาปรับความเข้มข้นให้ได้ประมาณ $1x10^9$ ผลึกโปรตีนต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง (vial) หลอดละ 15 มิลลิลิตร นำไปวางไว้ในตู้ incubator GCA corporation อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตู้ละ 3 หลอด วางหลอดไว้นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำหลอดออก 1 หลอดทุก ๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่ผ่านการทดลองแล้วทั้งหมดมาทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อด้วยการทำ bioassay กับหนอนกระทู้ผักแบบเดียวกับอุปกรณ์และวิธีการข้อ 4 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ซ้ำ ใช้เชื้อ ไวรัส เอ็นพีวีที่ไม่ได้รับการ treat และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม (control) บันทึกจำนวนหนอนที่ตายทุกวันจนหนอนตายหรือเข้าดักแด้หมด ถ้ามีหนอนตายใน control ให้ทำการปรับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนโดยใช้สูตรของ Abbott (1925) แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ปรับค่ามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

6. การศึกษาอายุการเก็บรักษา ชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักทั้งรูปสารละลายแขวนลอยและสูตรสำเร็จรูป

นำไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ที่ผลิตในรูปสารละลายแขวนลอยและชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปของกรมวิชาการเกษตร (Bio DOA V3) ใส่ขวดพลาสติกขาวขนาด 30 มิลลิลิตร ขวดละ 25 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 24 ขวด รวมทั้งหมด 48 ขวด แบ่งไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส ในจำนวนเท่า ๆ กัน โดยเก็บไว้นาน 1, 3, 6, 9 และ 12 เดือน เมื่อครบกำหนดนำเชื้อที่เก็บไว้ทั้ง 2 สภาวะ อย่างละขวด มาทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อด้วยการทำ bioassay กับหนอนกระทู้ผัก แบบเดียวกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการในข้อ 4 วางแผนการทดลองแบบ CRD ใช้เชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่แยกมาจากแปลงใหม่ๆ และน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุม (control) บันทึกจำนวนหนอนที่ตายทุกวันจนกว่าหนอนจะตายหรือเข้าดักแด้หมด ถ้ามีหนอนตายใน control ให้ทำการปรับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนโดยใช้สูตรของ Abbott (1925) แล้วนำเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ปรับค่ามาวิเคราะห์ผลทางสถิติ

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองด้วยการตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายมาวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง treatment ด้วยการทดสอบแบบ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 14 (ภาคผนวก ค.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่

- ห้องปฏิบัติการ อาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

- ห้องปฏิบัติการ สายวิชาวิทยาศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาทำการวิจัย

การทดลองเริ่มตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2552 สิ้นสุดการทดลองเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2553

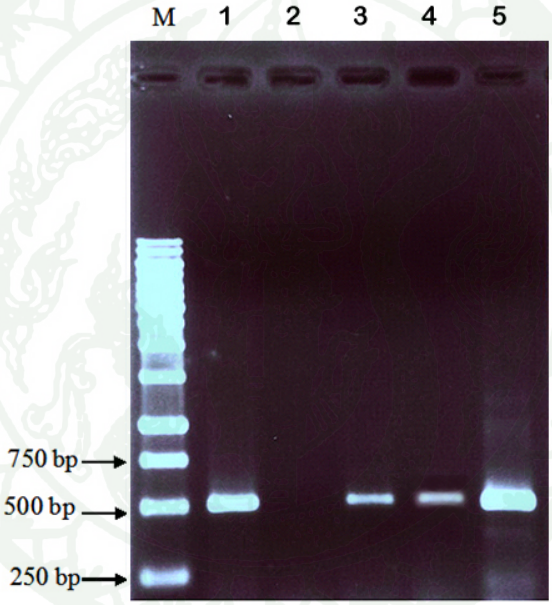
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาจีโนมและลำดับเบสของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี

1.1 PCR product ของยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี

จากการเพิ่มปริมาณยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ตัวอย่างด้วยกระบวนการ PCR โดยใช้ ไพรเมอร์ *Polh*-NPV-F และ *Polh*-NPV-R พบว่าไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ตัวอย่างให้แถบ DNA ขนาดประมาณ 530 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของยีน *polh* สำหรับใช้ในการจำแนกไวรัส เอ็นพีวี (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 530 คู่เบส ที่ตรวจพบจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณของยีน *polh* ของ ไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ตัวอย่าง โดยวิธี PCR

M = 1 kb ladder-DNA marker (Fermentas, Lithuania)

1 = PCR product ของ ยีน *polh* ซึ่งเป็น positive control

2 = deionized water ซึ่งเป็น negative control

3 = HaNPV เป็น unknown 1

4 = SeNPV เป็น unknown 2

5 = SlNPV เป็น unknown 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 โคลนที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เอ็นพีวีที่มีรายงานอยู่ใน GenBank โดยการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) พบว่า ยีน *polh* ของSlNPV มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของเชื้อ Spodotera exigua MNPV ที่รายงานโดย *et al.* (1992) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 693 ค่า expect value เท่ากับ 0 และมีค่า identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

ส่วนยีน *polh* ของ SeNPV มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของเชื้อ Spodoptera exigua MNPV polyhedron gene ที่รายงานโดย (1992) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 749 ค่า expect value เท่ากับ 0 และมีค่า identity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

และยีน *polh* ของ HaNPV มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของเชื้อ Helicoverpa armigera SNPV ที่รายงานโดย (2005) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 743 ค่า expect value เท่ากับ 0 และมีค่า identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 โคลน พบว่ามีค่าระดับความเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์สูง คือ มีค่า score bit อยู่ในช่วง 693-749 ค่า expect value เท่ากับ 0 และมีค่า identities อยู่ในระดับตั้งแต่ 98-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่า gene ทั้ง 3 โคลน ที่ได้เป็นยีน *polh* จริง โดยมีความเหมือนกันกับยีน *polh* ที่มีรายงานอยู่แล้วใน GeneBank (ระดับความเชื่อมั่นจะต้องมีค่า score bits มากกว่า 200 และค่า Expect value มีค่าใกล้ 0) (ภาพที่ 15)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
SeNPV       GTCAAACCGGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCCGCGAA 60
SlNPV       GTCAAGCCCGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCAGGGAA 60
HaNPV       GTTAAGCCCGACACAATGAAGCTTGTAGTTAACTGGAGCGGTCGCGAATTTCTTCGCGAA 60
            ** ** ** ***** ***** ** ** ** ***********    ** *****  * ***

SeNPV       ACTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGCTTTCCCATCGTCAACGATCAAGAAATCATGGAC 120
SlNPV       ACTTGGACCCGTTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTCAACGATCAAGAAATAATGGAC 120
HaNPV       ACTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGTTTTCCCATTGTAAACGACCAAGAAATTATGGAC 120
            ******** ***************** ** ***** ** ***** ******** ******

SeNPV       GTTTTCCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTTCCGATTTTTGGCT 180
SlNPV       GTCTATCTCGTCATCAACATGAGGCCCACTAGACCCAACCGATGCTACAGATTCTTGGCG 180
HaNPV       GTGTTTCTGTCTGTTAATATGCGACCAACCAAACCGAACCGTTGTTACCGATTCTTAGCG 180
            ** *  **     * ** *** * ** ** * *** ***** ** * * **** ** **

SeNPV       CAGCACGCTCTCCGTTGCGATCCCGACTACGTTCCTCACGAAGTCATCCGCATCGTCGAG 240
SlNPV       CAACACGCTCTCCGTTGCGATCCTGACTACGTTCCTCACGAAGTGATCCGCATCGTCGAG 240
HaNPV       CAACACGCTCTGCGTTGTGATCCCGACTATATTCCTCACGAAGTCATTCGTATTGTAGAA 240
            ** ******** ***** ***** *****  ************** ** ** ** ** **

SeNPV       CCCGTGTACGTCGGCACCAACAACGAATACCGCATCAGTTTAGCCAAAAAGGGCGGCGGT 300
SlNPV       CCCGTATACGTCGGCTCCAACAACGAGTACCGCATCAGCTTGGCCAAAAAGGGCGGCGGC 300
HaNPV       CCTTCCTATGTAGGCAGTAACAACGAGTACAGAATTAGTTTAGCCAAAAAATACGGCGGT 300
            **    ** ** ***   ******** *** * ** ** ** ********   ******

SeNPV       TGCCCCGTCATGAATCTCCACTCCGAGTACACCAACTCGTTCGAGGAATTCATCAACCGC 360
SlNPV       TGCCCGGTCATGAATCTACACTCTGAGTACACGCACTCTTTCGAAGAATTCATCAACCGC 360
HaNPV       TGTCCCGTTATGAACTTGCACGCTGAATACACTAATTCCTTTGAAGATTTCATTACCAAC 360
            ** ** ** *****  * *** * ** *****  * ** ** ** ** ***** * *  *

SeNPV       GTCATTTGGGAGAACTTTTACAAACCCATCGTTTACGTAGGAACC 405
SlNPV       GTCATCTGGGAAAACTTCTACAAACCCATCGTGTACGTAGGAACC 405
HaNPV       GTAATTTGGGAGAACTTCTACAAACCAATCGTTTACGTAGGCACT 405
            ** ** ***** ***** ******** ***** ******** **
```

ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน

เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของตัวอย่างไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทย จากกรมวิชาการเกษตร จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ HaNPV DOA, SeNPV DOA และ SlNPV DOA กับไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์อื่น ๆ ที่ได้มีรายงานใน Genbank ด้วยวิธี Multiple Alignment โดยใช้โปรแกรม Megalign ของ DNASTAR Software พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี ที่ศึกษาทั้งหมด มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity ตั้งแต่ 72-100 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบจากตารางก่อนหน้านี้ ซึ่งไวรัส HaNPV มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับไวรัสสายพันธุ์อื่น 4 สายพันธุ์ คือ *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda, *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan, *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU และ *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC และมีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *Helicoverpa armigera* NPV (NC001962) จากสาธารณรัฐประชาชนจีน ส่วนไวรัส SeNPV DOA มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ SeNPV (AF169823) ราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ แต่ไวรัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

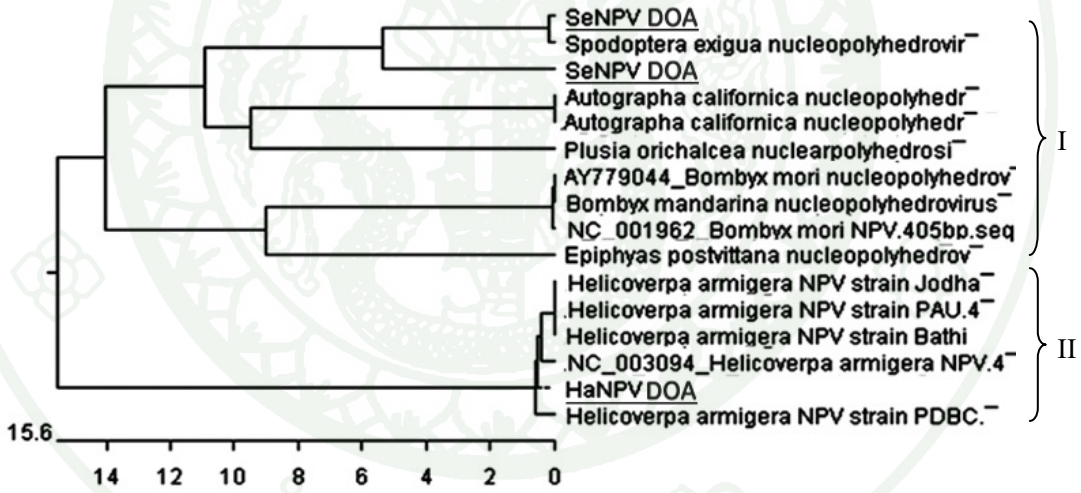
SlNPV DOA มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ SeNPV (AF169823) จากแหล่งเดียวกัน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี

Viruses/Genes	*polh* gene		
	HaNPV DOA	SeNPV DOA	SlNPV DOA
Unknown 1 : HaNPV DOA	-	79	77
Unknown 2 : SeNPV DOA	79	-	90
Unknown 3 : SlNPV DOA	77	90	-
1. *Autographa californica* NPV	75	79	82
2. *Autographa californica* NPV clone C6	75	79	82
3. *Bombyx mori* NPV	72	77	77
4. *Bombyx mandarina* NPV	72	77	77
5. *Epiphyas postvittana* NPV	76	78	79
6. *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda	99	77	76
7. *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan	99	78	76
8. *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU	99	78	76
9. *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC	99	79	77
10. *Bombyx mori* NPV _olyhedron gene	72	77	77
11. *Helicoverpa armigera* NPV	100	79	77
12. *Plusia orichalcea* NPV	77	82	82
13. *Spodoptera exigua* NPV	79	100	90

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ จีโนมของไวรัสเอ็นพีทั้ง 16 ชนิด คือ Unknown 1 HaNPV DOA, Unknown 2 SeNPV DOA, Unknown 3 SlNPV DOA, *Autographa californica* NPV, *Autographa californica* NPV clone C6, *Bombyx mori* NPV, *Bombyx mandarina* NPV, *Epiphyas postvittana* NPV, *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda, *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan, *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU, *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC, *Bombyx mori* NPV polyhedron gene, *Helicoverpa armigera* NPV, *Plusia orichalcea* NPV และ *Spodoptera exigua* NPV มาจำแนกกลุ่มโดยการสร้าง phylogenetic tree สามารถจำแนกความสัมพันธ์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยมี *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda, *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan, *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU, *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC, *Helicoverpa armigera* NPV เป็น กลุ่มแรก และกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของไวรัส เอ็นพีวี กลุ่มที่เหลือโดยที่ Unknown 2 SeNPV DOA มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Spodoptera exigua* NPV จากสาธารณรัฐประชาชนจีนมากที่สุด รองลงมา คือ Unknown 3 SlNPV DOA (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 Phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวีชนิดต่างๆ

1.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ของไวรัสทั้ง 3 ตัวอย่าง เปรียบเทียบกับไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์อื่น ๆ

ทำการเปรียบเทียบระดับกรดอะมิโน โดยการแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเป็นลำดับกรดอะมิโน ด้วยโปรแกรม Blastx (website: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blastx) พบว่ายีน *polh* ของทั้ง 3 โคลน มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ (ภาพที่ 17)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
SeNPV           VKPDTMKLVVNWSGKEFLRETWTRFMEDSFPIVNDQEIMDVFLVINMRPTRPNRCFRFLA 60
SlNPV           VKPDTMKLVVNWSGKEFLRETWTRFMEDSFPIVNDQEIMDVYLVINMRPTRPNRCYRFLA 60
HaNPV           VKPDTMKLVVNWSGREFLRETWTRFMEDSFPIVNDQEIMDVFLSVNMRPTKPNRCYRFLA 60
                **************:**************************:* :*****:****:****

SeNPV           QHALRCDPDYVPHEVIRIVEPVYVGTNNEYRISLAKKGGGCPVMNLHSEYTNSFEEFINR 120
SlNPV           QHALRCDPDYVPHEVIRIVEPVYVGSNNEYRISLAKKGGGCPVMNLHSEYTHSFEEFINR 120
HaNPV           QHALRCDPDYIPHEVIRIVEPSYVGSNNEYRISLAKKYGGCPVMNLHAEYTNSFEDFITN 120
                **********:********** ***:*********** *********:***:***:**..

SeNPV           VIWENFYKPIVYVGT 135
SlNPV           VIWENFYKPIVYVGT 135
HaNPV           VIWENFYKPIVYVGT 135
                ***************
```

ภาพที่ 17 ลำดับกรดอะมิโนของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ ยีน *polh* ของ SlNPV มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ของเชื้อ *Spodoptera exigua* MNPV ที่รายงานโดย Rowley, *et al.* (2010) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 285 ค่า expect value เท่ากับ $7e^{-98}$ และมีค่า identity เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

ยีน *polh* ของ SeNPV มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ของเชื้อ *Spodoptera exigua* MNPV ที่รายงานโดย El-Dougdoug, *et al.* (2009) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 288 ค่า expect value เท่ากับ $1e^{-98}$ และมีค่า identity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

และยีน *polh* ของ HaNPV มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ของเชื้อ *Helicoverpa armigera* SNPV ที่รายงานโดย Lange, *et al.* (2004) โดยมีค่า score bits เท่ากับ 288 ค่า expect value เท่ากับ $2e^{-99}$ และมีค่า identity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของทั้ง 3 โคลน วิเคราะห์โดยโปรแกรม Blastx พบว่ามีค่าระดับความเชื่อถืออยู่ในเกณฑ์สูง คือมีค่า score bit อยู่ในช่วง 285-288 ค่า expect value เท่ากับ $7e^{-98}$-$2e^{-99}$ และมีค่า identity ระหว่าง 98-100 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปได้ว่ายีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 โคลนที่ได้มีความเหมือนกันกับไวรัส เอ็นพีวี ที่มีอยู่แล้วในระดับสูงมาก (รายละเอียดในภาคผนวก)

เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับไวรัส เอ็นพีวี สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์ identity แปรผันตั้งแต่ 82-100 เปอร์เซ็นต์ โดยไวรัส HaNPV มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับไวรัส เอ็นพีวี จากสาธารณรัฐอินเดีย 3 สายพันธุ์ คือ *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan, *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU, *Helicoverpa armigera* NPV

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

strain PDBC และ *Helicoverpa armigera* NPV (NC001962) จากสหรัฐอเมริกา รองลงมาค่าเปอร์เซ็นต์ identity เท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับไวรัสสายพันธุ์อื่นเพียงชนิดเดียว คือ *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda จากสาธารณรัฐอินเดีย เช่นเดียวกัน ส่วนไวรัส SeNPV DOA มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ SeNPV (AF169823) จากราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์ สำหรับ ไวรัส SlNPV DOA มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity สูงสุดเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ SeNPV (AF169823) จากราชอาณาจักรเนเธอร์แลนด์เช่นเดียวกัน (ตารางที่ 4)

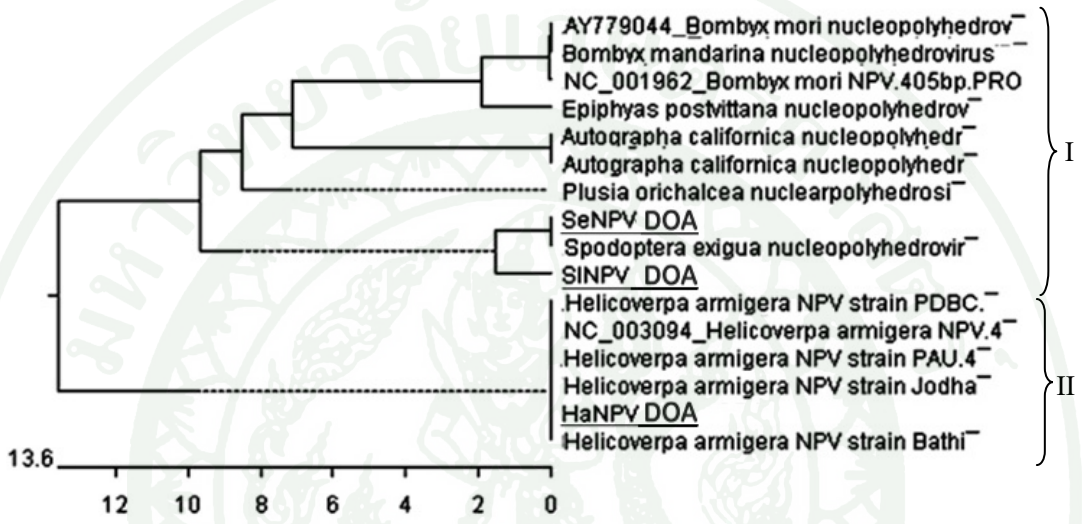
ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับกรดอะมิโนของยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวี

Viruses/Genes	*polh* gene		
	HaNPV DOA	SeNPV DOA	SlNPV DOA
Unknown 1 : HaNPV DOA	-	90	90
Unknown 2 : SeNPV DOA	90	-	97
Unknown 3 : SlNPV DOA	90	97	-
1. *Autographa californica* NPV	87	97	89
2. *Autographa californica* NPV clone C6	87	89	89
3. *Bombyx mori* NPV	82	86	87
4. *Bombyx mandarina* NPV	82	86	87
5. *Epiphyas postvittana* NPV	84	89	88
6. *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda	99	90	90
7. *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan	100	90	90
8. *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU	100	90	90
9. *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC	100	90	90
10. *Bombyx mori* NPV polyhedron gene	82	86	87
11. *Helicoverpa armigera* NPV	100	90	90
12. *Plusia orichalcea* NPV	90	96	95
13. *Spodoptera exigua* NPV	90	100	97

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโน จีโนมของไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 16 ชนิดนี้ มาจำแนกกลุ่มโดยการสร้าง phylogenetic tree สามารถจำแนกความสัมพันธ์ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คล้ายกับการใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ โดยกลุ่มแรกประกอบด้วย Unknown 1 HaNPV ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับ *Helicoverpa armigera* NPV strain Bathinda, *Helicoverpa armigera* NPV strain Jodhan, *Helicoverpa armigera* NPV strain PAU, *Helicoverpa armigera* NPV strain PDBC จากสาธารณรัฐอินเดีย , *Helicoverpa*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

armigera NPV จากสหรัฐอเมริกาและ *Helicoverpa armigera* NPV จากสาธารณรัฐประชาชนจีน เป็นกลุ่มแรก และกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มของไวรัส เอ็นพีวี กลุ่มที่เหลือ โดยที่ Unknown 2 SeNPV DOA มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *Spodoptera exigua* NPV จากสาธารณรัฐประชาชนจีนมากที่สุด รองลงมาคือUnknown 3 SlNPV DOA ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์มาหาสายสัมพันธ์ (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 Phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนยีน *polh* ของไวรัส เอ็นพีวีชนิดต่างๆ

การนำสารพันธุกรรมหรือ DNA มาใช้จำแนกหมวดหมู่ของไวรัส เอ็นพีวี กำจัดแมลง ซึ่งแต่เดิมใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ขนาด น้ำหนักของอนุภาคไวรัส รวมถึงชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ไวรัสใช้เป็นเซลล์อาศัยตามธรรมชาติ ซึ่งไม่เพียงพอต่อการระบุจำแนกชนิดของไวรัสเหล่านี้ เนื่องจากไวรัส เอ็นพีวีมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างมาก โดยเฉพาะไวรัส เอ็นพีวีของหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera และเป็นปัญหาที่ถกเถียงกันมาตลอด เนื่องจากบางครั้งพบว่าไวรัสที่แยกจากแมลงชนิดเดียวกันแต่ต่างสถานที่ อาจมีลักษณะทางชีววิทยาและพันธุกรรมที่ต่างกัน หรือบางครั้งกลับพบว่า ไวรัสที่แยกจากแมลงต่างชนิดกัน แต่อยู่ในสภาพแวดล้อมเดียวกัน กลับมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน (ทิพย์วดี, 2549) ดังนั้นการใช้สารพันธุกรรมได้แก่ ยีน *polh* ที่มีหน้าที่ควบคุมการสร้างผลึกโปรตีนที่หุ้มห่ออนุภาคไวรัส เอ็นพีวี เพื่อป้องกันอนุภาคไวรัสจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเมื่ออยู่นอกตัวแมลง และเป็นยีนอนุรักษ์ในสมาชิกของไวรัส เอ็นพีวี เพราะไวรัสต่างชนิดกัน ก็จะมียีน *polh* ที่ต่างกัน ทำให้สร้างโปรตีนหุ้มห่ออนุภาคไวรัส เอ็นพีวี ต่างชนิดเช่นกัน มาใช้ในการจำแนกรหัสพันธุกรรมของไวรัส เอ็นพีวีแต่ละชนิด และการวิเคราะห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความสัมพันธ์ด้วย phylogenetic tree โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือลำดับกรดอะมิโน เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ จะช่วยให้การจำแนกชนิดของไวรัส เอ็นพีวีทั้งสามชนิดถูกต้องแม่นยำขึ้น และยังเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการศึกษาพันธุกรรมของไวรัส เอ็นพีวี ชนิดอื่นในประเทศไทยต่อไป

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ตัวอย่างนี้เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆใน GenBank พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity แปรผันตั้งแต่ 77-90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity ตั้งแต่ 90-97 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าไวรัส SeNPV DOAและ SlNPV DOA มีความใกล้ชิดกันมากกว่าไวรัส HaNPV DOA มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน เท่ากับ 90 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อพิจารณา phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน พบว่า ไวรัส SlNPV DOA และSeNPV DOA จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับไวรัสของ *Spodoptera exigua* ใน GenBank สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนซึ่งมีค่าตั้งแต่ 90-100 เปอร์เซ็นต์ และ 97-100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไวรัส HaNPV DOA ถูกจัดแยกออกมาอย่างชัดเจน โดยอยู่ในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Helicoverpa armigera* สายพันธุ์ต่าง ๆ ใน GenBank เช่นเดียวกัน สอดคล้องกับค่าเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนซึ่งมีค่าตั้งแต่ 99-100 เปอร์เซ็นต์ ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน อาจสรุปได้ว่าไวรัส SlNPV มีความเหมือนและความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับไวรัส SeNPV มากกว่าไวรัส HaNPV และทั้งไวรัส SeNPV และไวรัส HaNPV มีความเหมือนและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดไวรัสเอ็นพีวี ที่มีรายงานอยู่แล้วใน GenBank

2. การศึกษาผลของแสงอัลตราไวโอเลตชนิด บี (UVB) ที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

การศึกษาผลของแสงยูวี ชนิดบี ที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก หลังจากเชื้อไวรัสได้รับแสงยูวี ชนิดบี ความยาวคลื่น 290 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ประสิทธิภาพในการฆ่าหนอน (bioassay) เป็นตัววัดประสิทธิภาพ ผลการศึกษาเมื่อเริ่มทดสอบ พบว่าเชื้อมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี จะมีประสิทธิภาพลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับแสงยูวี ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของเชื้อเป็นสำคัญ กล่าวคือไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ที่มีอัตราความเข้มข้นปกติ คือ $1x10^9$ PIBs/ml สามารถทนแสงยูวีชนิดบี ได้นานที่สุดถึง 10 ชั่วโมง รองลงมาคือไวรัส เอ็นพีวี อัตราความเข้มข้น $0.5 x10^9$ PIBs/ml สามารถทนแสงยูวีชนิดบี ได้นานถึง 7 ชั่วโมงและ ไวรัส เอ็นพีวี อัตราความเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

0.25 x10^9 PIBs/ml สามารถทนแสงยูวีชนิดบี ได้นานเพียง 5 ชั่วโมงตามลำดับ โดยไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นปกติ 1x10^9 PIBs/ml ซึ่งเป็นอัตราแนะนำให้ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลง และมีความเข้มข้นสูงที่สุดในการทดลองนี้ พบเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ก่อนฉายแสงยูวี เท่ากับ 90.0 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากเชื้อผ่านการฉายแสงยูวีไปแล้วในระยะเวลาหนึ่ง โดยนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงทุกชั่วโมงไปทดสอบ Bioassay กับหนอนกระทู้ผัก วัย 3 พบว่า ใน 2 ชั่วโมงแรกของการรับแสงยูวี เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่เวลา 0 ชั่วโมง แต่หลังจาก 3 ชั่วโมงไปแล้วพบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเริ่มมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจะลดลงตามลำดับ และต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเชื้อได้รับแสงยูวีไปแล้ว 5 ชั่วโมง เมื่อเชื้อรับแสงยูวีนานถึง10 ชั่วโมง พบว่าหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายเหลือเพียง 6.58 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการตายของหนอนอีกเลยที่ 11 ชั่วโมงเป็นต้นไป เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งของอัตราปกติ คือ 0.5 x10^9 PIBs/ml พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ก่อนฉายแสงยูวี เฉลี่ย 76.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างจากเชื้อที่ผ่านแสงยูวีนาน 1 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 70.0 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มพบความแตกต่างทางสถิติที่เวลา 3 ชั่วโมง เป็นต้นไปและหลังจากเชื้อผ่านการฉายแสงไปแล้วในระยะเวลาหนึ่งโดยปฏิบัติการทดสอบเช่นเดียวกัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนลดลงอย่างรวดเร็ว ภายในเวลาเพียง 3 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนลดลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อยังมีประสิทธิภาพนานถึง 7 ชั่วโมงโดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเท่ากับ 14.0 เปอร์เซ็นต์

เมื่อลดความเข้มข้นของเชื้อไวรัสลงหนึ่งในสี่ของความเข้มข้นปกติ คือ 0.25 x10^9 PIBs/ml พบว่า ประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสหลังผ่านแสงยูวีไปแล้ว 2 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไม่แตกต่างทางสถิติกับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ก่อนฉายรังสี เฉลี่ยเท่ากับ 68.0, 52.0 และ 48.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และหลังจากเชื้อผ่านการฉายแสงต่อไปในระยะเวลาหนึ่ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนลดลงตามลำดับโดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติจนถึง 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจึงลดต่ำลงอย่างรวดเร็วและเชื้อยังมีประสิทธิภาพนานถึง 5 ชั่วโมง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 6.0 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับการศึกษาของ Shapiro *et al.*, (2002) ในไวรัส เอ็นพีวีในกลุ่มใกล้เคียงกัน ที่ทดสอบในหนอนเจาะฝักข้าวโพด *Helicoverpa armigera* และหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* โดยประสิทธิภาพของเชื้อไวรัสที่มีความเข้มข้นสูงจะมีการเสื่อมประสิทธิภาพลดลงช้ากว่าเชื้อไวรัสความเข้มข้นต่ำ แม้ว่าจะเป็นไวรัสต่างชนิดกัน แต่ไวรัส เอ็นพีวีของ *Spodoptera litula* มีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับไวรัส เอ็นพีวีของ *Spodoptera exigua* จึงอาจมีความสามารถที่คล้ายคลึงกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ผลของแสงยูวี ชนิดบี ที่มีต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นของไวรัส เอ็นพีวี (PIBs/ml)	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่เวลาต่างๆ (ชม.)[1]						
	0	1	2	3	4	5	6
0.25 x10 ^{9}	68.0± 1.30 b[2]A[3]	52.0± 1.30 cA	48.0± 0.84 cAB	32.0± 0.84 bB	26.0± 0.89 bB	6.0± 0.71 cC	0 c
0.5 x10 ^{9}	76.0± 1.00 bA	70.0± 1.00 bAB	62.0± 0.84 bBC	44.0± 1.14 bC	38.0± 0.84 bD	30.0± 0.71 bDE	22.0± 0.83bEF
1x10 ^{9}	90.0± 0.55 aA	86.0± 0.55 aA	78.0± 0.84 aAB	72.0± 1.67 aB	64.0± 1.67 aBC	56.0± 1.14 aCD	44.0± 1.14aD
น้ำกลั่น	6.0± 0.68 c	0 d	4.0± 0.54 d	0 c	0 c	2.0±0.44 c	0 c
C.V. (%)	19.94	16.65	16.14	31.30	32.40	32.37	42.85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ความเข้มข้นของไวรัส เอ็นพีวี (PIBs/ml)	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักที่เวลาต่างๆ (ชม.)[1]						C.V. (%)
	7	8	9	10	11	12	
0.25 x10 ^{9}	0 b	0	0	0	0	0	8.80
0.5 x10 ^{9}	14.0± 0.67 aF	0	0	0	0	0	19.60
1x10 ^{9}	24.0± 1.00aD	20.0± 1.52E	10.0± 2.12EF	6.58± 1.02EF	0	0	19.70
น้ำกลั่น	0 b	0	0	0	0	0	ns
C.V. (%)	0.99	-	-	-	-	-	

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนปรับด้วยค่า Abbott's formula

[2] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRT

[3] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณา เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส (Original activity remaining percent ;% OAR) เพื่อบ่งบอกถึงความคงอยู่ของเชื้อไวรัส (active virus remaining) และเป็นค่าอ้างอิงที่ขึ้นกับประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ก่อนทดลองและหลังทดลองในอัตราความเข้มข้นที่เท่ากัน (Shapiro *et al.*, 2002) ในการทดลองนี้ใช้ค่าจากอัตราส่วนระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ได้รับแสงยูวี ณ เวลาต่างๆ หารด้วย ค่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ไม่ได้รับแสงยูวี เมื่อเริ่มการทดลอง ผลการทดลองพบว่า % OAR ของเชื้อไวรัส มีแนวโน้มลดลงในทุกความเข้มข้น โดยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นต่ำสุดหรือความเข้มข้นลดลงเหลือหนึ่งในสี่ของความเข้มข้นมาตรฐาน มี % OAR ลดลงอย่างรวดเร็วมากที่สุด รองลงมาที่ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นมาตรฐาน และความเข้มข้นมาตรฐาน โดยมีค่า % OAR เท่ากับ 0 ภายใน 6 ชั่วโมง, 8 ชั่วโมงและ 11 ชั่วโมงตามลำดับ โดยพบว่าเชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด ใน 1 ชั่วโมง มี % OAR ลดลงเหลือ 76.47 เปอร์เซ็นต์ และลดลงเหลือ 47.06 เปอร์เซ็นต์ใน 3 ชั่วโมง เมื่อรับแสงยูวีนาน 5 ชั่วโมง มี % OAR เหลือเพียง 8.82 เปอร์เซ็นต์

เชื้อไวรัสที่ความเข้มข้นลดลงครึ่งหนึ่งจากความเข้มข้นมาตรฐานมีค่า % OAR ค่อยๆลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อเชื้อรับแสงยูวีนาน 1-2 ชั่วโมงแรก เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ยังมี % OAR สูง มีค่าอยู่ระหว่าง 81.58-92.11 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าลดลงเหลือ 50.0 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเมื่อเชื้อรับแสงนาน 7 ชั่วโมง ค่า % OAR เหลือเพียง 18.42 เปอร์เซ็นต์

ส่วนเชื้อที่มีความเข้มข้นมาตรฐานพบว่าค่า % OAR นานถึง 9 ชั่วโมงโดยมีค่าสูงเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการรับแสงยูวี มีค่า % OAR เฉลี่ยอยู่ระหว่าง 62.22-95.56 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นค่า % OAR ลดต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเชื้อไวรัสมีค่า % OAR นานถึง 10 ชั่วโมงโดยมีค่า % OAR เฉลี่ยเท่ากับ 7.31 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

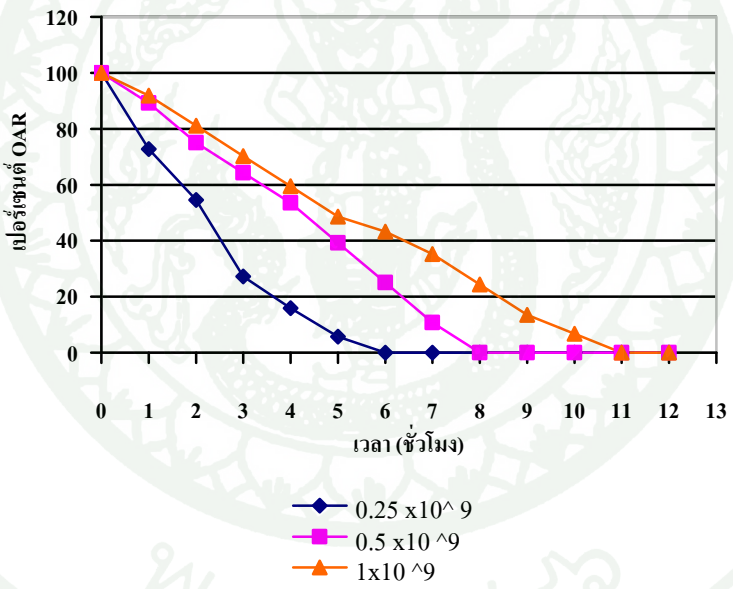
ตารางที่ 6 ผลของแสงยูวี ชนิดบี ที่มีต่อประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่ระยะเวลาต่างๆ

ความเข้มข้นของไวรัส เอ็นพีวี (PIBs/ml)	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของหนอนกระทู้ผัก ที่เวลาต่างๆ (ชม.)[1]												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.25×10^9	100	76.47	70.59	47.06	38.24	8.82	0	0	0	0	0	0	0
0.5×10^9	100	92.11	81.58	57.89	50.00	39.47	28.95	18.42	0	0	0	0	0
1×10^9	100	95.56	86.67	80.00	71.11	62.22	48.89	26.67	22.22	11.11	7.31	0	0

[1] เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ (% OAR) = $\frac{\text{\% การตายของหนอนที่ระยะเวลาต่างๆ}}{\text{\% การตายของหนอนที่ 0 ชม.}} \times 100$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาจากกราฟในภาพที่ 19 จะเห็นว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นต่ำที่สุด คือ $0.25x10^{9}$ PIBs/ml มีความลาดชันของเส้นกราฟมากที่สุด แสดงว่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับแสงยูวีตามระยะเวลาที่ได้รับแสง มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อนานถึง 5 ชั่วโมง รองลงมา เป็น ไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นปานกลาง คือ $0.50x10^{9}$ PIBs/ml มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัสลดลงในลักษณะค่อยๆ ลดลงใกล้เคียงกับไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ $1.0 x10^{9}$ PIBs/ml แต่หลังจากรับแสงยูวีไปแล้ว 4 ชั่วโมง เชื้อไวรัสมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อถึง 7 ชั่วโมง ส่วนเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ที่ความเข้มข้นสูงสุดจะมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อในลักษณะค่อยๆลดลงในอัตราที่น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาจากกราฟจะพบว่า เส้นกราฟมีความลาดชันน้อยที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อนานถึง 10 ชั่วโมง



ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หลังรับแสงยูวีที่เวลาต่าง ๆ

โดยทั่วไปแสงยูวีจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ของไวรัส เอ็นพีวี โดยสาร Thymine ที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานของสาย DNA เกิดการรวมตัวของวงแหวน cyclobutane ระหว่างเบส ทำให้เกิดการปิดกั้นการสังเคราะห์ DNA และเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ในอัตราสูง (Harm, 1980) ดังนั้นเมื่อ DNA ที่เป็นสิ่งจำเป็นในการดำรงชีวิตและการรักษาลักษณะสำคัญต่าง ๆ รวมถึงการควบคุมการเข้าทำลายแมลงของหนอนเสียหาย จึงทำให้กลไกการเข้าทำลายหนอนเปลี่ยนแปลงไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในที่สุด ซึ่งการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า แสงยูวีมีผลต่อความทนทานของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี อย่างชัดเจนสอดคล้องกับการศึกษาของ Hienton *et al*. (1958) ได้เคยรายงานถึงพลังงานแสงอาทิตย์ที่ส่องมาสู่พื้นโลกในแต่ละวัน พลังงานของแสงอัลตร้าไวโอเลตเพียง 1-5 เปอร์เซ็นต์สามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อเชื้อไวรัส เอ็นพีวี และจากการประมาณค่าพลังงานของแสงอุลตร้าไวโอเลตในระดับ 1-5 เปอร์เซ็นต์ ของศิรินันธ์ (2528) ได้คำนวณพลังงานแสงอัลตร้าไวโอเลต 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าพลังงาน 16,800 $\mu W.cm^{-2}/s$, 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าพลังงาน 84,000 $\mu W.cm^{-2}/s$ และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่าพลังงาน 168,000 $\mu W.cm^{-2}/s$ แต่หลอดยูวี ชนิดบี ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้พลังงานคิดเป็น 4,333 $\mu W.cm^{-2}/s$ เพราะฉะนั้นการรับแสงอุลตร้าไวโอเลตเพียง 1 เปอร์เซ็นต์จะใช้เวลา 3 นาที 9 วินาที การรับแสงอัลตร้าไวโอเลต 5 เปอร์เซ็นต์ใช้เวลา 19 นาที 38 วินาที และการรับแสงอัลตร้าไวโอเลต 10 เปอร์เซ็นต์ใช้เวลา 39 นาที 17 วินาที ดังนั้นจะเห็นได้ว่า ถ้าพลังงานแสงอัลตร้าไวโอเลตที่ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไวรัส เอ็นพีวีที่มีความเข้มข้นต่ำทั้งสองอัตรา คือ $0.25x10^9$ และ $5.0 x10^9$ PIBs/ml สามารถอยู่ได้นานเกิน 3 นาที แต่ก็เสื่อมประสิทธิภาพลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเหลือเพียง 32.0 และ 44.0 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 นาที ตามลำดับ แต่ไวรัสความเข้มข้นสูง $1 x10^9$ PIBs/ml สามารถทนแสงอัลตร้าไวโอเลตได้เพียง 10 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) ก็เสื่อมประสิทธิภาพหมดแล้ว ซึ่งยังรับพลังงานแสงไม่ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากต้องรับพลังงานแสงนานถึง 19 นาที 38 วินาที ถึงแม้ว่าการทดลองนี้อาจใช้พลังงานแสงอัลตร้าไวโอเลตต่ำกว่าความเป็นจริง ทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากการทดลองต่ำกว่ากว่าที่ควรเป็น แต่จากการศึกษานี้ก็ทำให้ทราบว่า ในกรณีเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน เมื่อได้รับพลังงานแสงยูวีชนิดบีเกือบ 5 เปอร์เซ็นต์ก็เสื่อมประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 11 ชั่วโมงแล้ว แต่ในสภาพธรรมชาตินอกจากแสงยูวีชนิดบีแล้ว ยังมีพลังงานแสงในย่านความถี่อื่น ๆ ที่มีผลต่อความคงทนของเชื้อเช่นกัน ซึ่งยังไม่ได้นำมาศึกษา แต่ก็สามารถสรุปในเบื้องต้นได้ว่า แสงยูวีชนิดบี มีผลต่อความทนทานของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักอย่างมาก และความเข้มข้นของเชื้อก็มีผลต่อระดับความทนทานต่อแสงยูวี เพราะจะช่วยยืดระยะเวลาให้เชื้อคงอยู่ได้ในสภาพธรรมชาตินานกว่าเดิม

อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี อาจจะไม่ใช่วิธีการที่เหมาะสมที่สุด เนื่องจาก อุทัย (2534) ได้ทำการทดสอบการเพิ่มอัตราการใช้ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะสมอฝ้าย พบว่า ความเข้มข้นของไวรัส ที่เพิ่มขึ้น มีผลน้อยมากต่อเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนอาศัย (host) การใช้ไวรัสในอัตราที่เหมาะสมรวมถึงช่วงเวลาที่เหมาะสม จะช่วยให้การใช้ไวรัส เอ็นพีวีกำจัดหนอนได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยการปฏิบัติตามคำแนะนำของ อัจฉรา และคณะ (2551) ที่แนะนำว่าควรหลีกเลี่ยงแสงแดดเมื่อจำเป็นต้องใช้เชื้อไวรัส เอ็นพีวี กำจัดแมลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การฉีดพ่นในเวลาเย็นตั้งแต่ 15.00 น.เป็นต้นไป จะช่วยป้องกันเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ให้มีประสิทธิภาพคงเหลือพอที่จะกำจัดหนอนได้ นอกจากนี้ความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำเกินไป จะทำให้ความคงทนในสภาพแวดล้อมตอนกลางวันน้อยเกินไป เชื้ออาจตายหมดก่อนที่หนอนจะรับเชื้อเข้าไป ดังนั้นการพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงเป็นอีกปัจจัยที่ต้องคำนึง แต่การเพิ่มเชื้อให้มีความเข้มข้นสูงๆก็อาจกระทบต่อราคาต้นทุนของชีวผลิตภัณฑ์นี้

3. การศึกษาผลของอุณหภูมิในระดับต่าง ๆ และช่วงความยาวนานของการได้รับอุณหภูมิที่มีต่อประสิทธิภาพของเชื้อ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิที่ระดับต่าง ๆ ได้แก่ 30, 35, 40, 45, และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อดูผลของอุณหภูมิกับระยะเวลาต่างๆต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก (ตารางที่ 7) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่อยู่ในอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทุกระยะเวลา เชื้อไวรัส เอ็นพีวีที่อยู่ในอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างทางสถิติกับเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดสด (ผลิตใหม่) โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนอยู่เฉลี่ยระหว่าง 85.96-92.98 เปอร์เซ็นต์ และของเชื้อชนิดสดมีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 94.74 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส ค่อนข้างสูง อยู่ระหว่าง 90.73-98.14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับเชื้อสดที่มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

รองลงมาคือ การเก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 และ 72 ชั่วโมงประสิทธิภาพของเชื้อเริ่มแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกับการเก็บไว้นาน 24 ชั่วโมงของแต่ละอุณหภูมิที่ศึกษา มีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 77.19-84.21 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือเชื้อไวรัสอยู่ระหว่าง 81.48-88.89 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติกับเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่เก็บเชื้อนาน 24 ชั่วโมง ทั้งสองอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 82.46 และ 78.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ มีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัสอยู่ระหว่าง 87.04 และ 83.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่ออุณหภูมิการเก็บเชื้อไวรัสสูงขึ้นเป็น 45 และ50 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บเชื้อนานเกิน 24 ชั่วโมง จะทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงอย่างชัดเจน โดยประสิทธิภาพของเชื้อที่เก็บนาน 48 ชั่วโมง ขึ้นไปมีประสิทธิภาพลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเก็บเชื้อที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิเดียวกันที่เวลา 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 50.88-68.42 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัสอยู่ระหว่าง 53.70-72.21 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่างๆในแต่ละช่วงเวลาที่มีผลต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก

อุณหภูมิ (°C)	เวลาต่างๆ (ชม.)	เปอร์เซนต์การตาย[1]	% OAR[2]
30 °C	24	92.98± 0.52 ab[3]	98.14
	48	89.47± 0.63 abc	94.43
	72	85.96 ± 0.52 abcd	90.73
35 °C	24	91.23± 0.75 abc	96.30
	48	82.46± 0.52 cd	87.04
	72	84.21± 0.55 bcd	88.89
40 °C	24	85.96± 0.52 abcd	90.73
	48	78.95± 0.89 de	83.33
	72	77.19± 0.75 def	81.48
45 °C	24	82.46± 0.82 cd	87.04
	48	71.93± 0.82 efg	75.92
	72	68.42± 0.63 fgh	72.21
50 °C	24	78.95± 0.89 de	83.33
	48	64.91± 0.82 gh	68.51
	72	50.88± 0.82 h	53.70
เชื้อสด	-	94.74± 0.55 a	100
น้ำกลั่น	-	5.00± 0.55	-
C.V. (%)	-	7.72	-

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนปรับด้วย Abbott's formula

[2] % OAR(Original activities remainding percentage) ได้จาก อัตราส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนจากอุณหภูมิต่างๆ กับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนด้วยเชื้อสด

[3] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรเหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นโดยวิธี DMRT

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นที่อุณหภูมิห้องทั่วไปประมาณ 30 องศาเซลเซียส การเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวีนาน 72 ชั่วโมงไม่ทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่นานขึ้น และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 35 และ 40 องศาเซลเซียส ใน 24 ชั่วโมงแรก ยังไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อเก็บเชื้อนานขึ้นเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงประสิทธิภาพของเชื้อเริ่มมีแนวโน้มลดลงเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ พบว่ามีค่าลดลงตามลำดับ และยิ่งชัดเจนมากขึ้นเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อต่ำที่สุดเมื่อเทียบกับกรรมวิธีทั้งหมด มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ยเท่ากับ 50.88 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือเพียง 53.70 เปอร์เซ็นต์

เนื่องจากอุณหภูมิที่กำหนดในการศึกษานี้ เป็นช่วงอุณหภูมิที่ครอบคลุมอุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยในปัจจุบัน คืออยู่ระหว่าง 30 -45 องศาเซลเซียส และจากผลกระทบของสภาวะโลกร้อนในปัจจุบัน จึงได้ปรับให้สูงขึ้นอีกระดับ คือ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่พบได้ยากในสภาพไร่ของไทยในปัจจุบัน แต่เพื่อให้การทดลองครอบคลุมได้มากขึ้น จึงได้ทำการทดสอบว่าสภาพอุณหภูมิต่างๆจะมีผลต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักอย่างไร จากการทดลอง อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป และเก็บนานเกิน 48 ชั่วโมง จะมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ถึงแม้จะมีรายงานโดย Tinsley (1979) ว่า อุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียสในอากาศ หรืออุณหภูมิของดินที่ 50 องศาเซลเซียสจะไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวี แต่การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าวติดต่อกันเกิน 24 ชั่วโมงประสิทธิภาพของเชื้อจะลดลง และยิ่งอุณหภูมิสูงมากขึ้น การเก็บเชื้อไว้นานเกิน 24 ชั่วโมงจะทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงอย่างชัดเจนสอดคล้องกับรายงานของ Gudauskas and Canerday (1968) ที่กล่าวถึงไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Heliothis* ที่เป็นหนอนในตระกูลเดียวกัน คือ Family Noctuidae จะลดประสิทธิภาพลงอย่างรวดเร็วเมื่อเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 10 นาที และประสิทธิภาพของไวรัส เอ็นพีวีของหนอน *Trichoplusia* ลดลง 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซึ่งผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี แต่ก็ขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัสเช่นกัน และนอกจากนี้ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก เป็นไวรัสชนิด multiple enveloped nucleocapsid คือ มี nucleocapsid รวมเป็นกลุ่มฝังตัวอยู่ในผลึกโปรตีน (สมชัยและคณะ, 2550) และ Burges (1981) รายงานว่าไวรัส เอ็นพีวี ชนิด multiple enveloped nucleocapsid มีแนวโน้มทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าไวรัส เอ็นพีวี ในกลุ่ม single enveloped nucleocapsid ในกรณีนี้ สำหรับประเทศไทยซึ่งมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิในแต่ละฤดูกาลไม่สูงแตกต่างกันมากนัก แต่สภาพอากาศที่เปลี่ยนไปในปัจจุบัน โดยเฉพาะช่วงฤดูแล้งที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 40 องศาเซลเซียส การใช้เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ฉีดพ่นในแปลงพืชอาจเป็นอีกปัจจัยที่ต้องคำนึง โดยเฉพาะในเรื่องความถี่ของการใช้ไวรัส เอ็นพีวี ฉีดพ่นในแปลง ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 40 องศาเซลเซียส อาจจำเป็นต้องฉีดพ่นเชื้อไวรัส ซ้ำภายใน 2-3 วัน

4. การศึกษาอายุการเก็บรักษา ชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักทั้งรูปสารละลายแขวนลอยและสูตรผงสำเร็จรูป

การศึกษาอายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ทั้งรูปสารละลายแขวนลอยซึ่งเป็นเชื้อธรรมดาที่ยังไม่ได้ผสมสารเพิ่มฤทธิ์ใดๆ และสูตรผงสำเร็จรูปที่ผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆแล้ว (สำหรับจำหน่าย) โดยศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดหนอนกระทู้ผัก หลังจากเก็บที่อุณหภูมิต่ำ 5 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น และสภาพห้องซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ย 30 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 8 มีดังนี้

การเก็บรักษาเชื้อไวรัส เอ็นพีวี เมื่อเริ่มทำการทดสอบ (ที่เวลา 0 เดือน) พบว่าเชื้อไวรัส เอ็นพีวีทั้งชนิดธรรมดาและชนิดที่ผสมสำเร็จรูปแล้ว มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ พบหนอนตายเฉลี่ย 90.00-94.00 เปอร์เซ็นต์ แต่จะแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม ที่พบหนอนตายเพียงเล็กน้อย เฉลี่ย 1.20 เปอร์เซ็นต์

การเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวี นาน 3 เดือน พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อลดลงทุกกรรมวิธี โดยการเก็บเชื้อสูตรสำเร็จรูปยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 90.00 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในตู้เย็น เชื้อไวรัส สูตรสำเร็จและเชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในสภาพห้อง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 85.20, 78.40 และ 60.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับทุกกรรมวิธี โดยกรรมวิธีควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนต่ำที่สุดเฉลี่ย 2.00 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวี นาน 6 เดือน พบว่าทุกกรรมวิธีประสิทธิภาพของเชื้อมีแน้วโน้มลดลงเช่นเดียวกับการเก็บที่ระยะ 3 เดือน โดยยังคงพบว่าการเก็บเชื้อสูตรสำเร็จรูปในสภาพอุณหภูมิต่ำเชื้อยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 87.60 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในตู้เย็น เชื้อไวรัส สูตรสำเร็จและเชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในสภาพห้อง มีเปอร์เซ็นต์การตายของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หนอนเฉลี่ย 80.80, 66.40 และ 36.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกรรมวิธีควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การตายของต่ำที่สุดเฉลี่ย 2.40 เปอร์เซ็นต์

การเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวี นาน 9 เดือน พบว่า ประสิทธิภาพของเชื้อลดลงค่อนข้างมาก มีบางกรรมวิธี พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย ต่ำกว่า 50.00 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าการเก็บเชื้อสูตรสำเร็จรูปในสภาพอุณหภูมิต่ำยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 79.20 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือ รองลงมาคือ เชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในตู้เย็น เชื้อไวรัส สูตรสำเร็จและเชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในสภาพห้อง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 74.00, 45.60 และ 19.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกรรมวิธีควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำที่สุดเฉลี่ย 1.20 เปอร์เซ็นต์

และการเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวี นาน 12 เดือน พบว่าประสิทธิภาพของเชื้อลดลงทุกกรรมวิธี โดยการเก็บเชื้อสูตรสำเร็จรูปยังคงมีประสิทธิภาพสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีที่เหลือ มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 74.40 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในตู้เย็น เชื้อไวรัส สูตรสำเร็จและเชื้อไวรัสธรรมดาที่เก็บในสภาพห้อง มีเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเฉลี่ย 60.00, 32.80 และ 11.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยกรรมวิธีควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การตายของต่ำที่สุดเฉลี่ย 1.60 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก วัดจากเปอร์เซ็นต์การตายของหนอน ที่เวลาต่าง ๆ

ชนิดเชื้อไวรัสเอ็นพีวี	อุณหภูมิเก็บ (^{O}C)	เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนที่ระยะเวลาต่าง ๆ (เดือน) [1]					C.V. (%)
		0	3	6	9	12	
ธรรมดา	5	92.00±1.58 a[2]A[3]	85.20±1.14 bA	80.80±1.14 bB	74.00±1.58 bC	60.00±1.58 bB	8.50
	30	90.00±1.14 aA	60.80±1.14 dB	36.80±1.14dC	19.20±1.14 dD	1.20±1.52 dE	5.60
สำเร็จรูป	5	94.00±1.58 aA	90.00±1.87 aAB	87.60±1.30aB	79.20±14 aBC	74.40±1.30 aC	3.40
	30	92.00±1.30 aA	78.40 ±1.30 cB	66.40±1.92cC	45.60±1.92 cD	32.80±1.14 cE	4.90
น้ำกลั่น		1.20 ±0.89 b	2.00± 1.22 e	2.40 ± 0.83 e	1.20 ±0.89 e	1.60±1.30 e	ns
C.V. (%)		3.64	17.18	4.81	6.32	7.66	

[1] เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนปรับด้วย Abbott's formula

[2] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRT

[3] ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยวิธี DMRT

ns = ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของชีวผลิตภัณฑ์จากตารางที่ 9 พบว่าการอยู่รอดของเชื้อไวรัส มีเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงในทุกกรรมวิธี แต่การเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิด คือ ชนิดธรรมดาและชนิดสูตรสำเร็จ ที่อุณหภูมิต่ำ (5 องศาเซลเซียส) ชีวผลิตภัณฑ์มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือเกิน 50 เปอร์เซ็นต์นานถึง 12 เดือน มีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือเท่ากับ 65.22 และ 79.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ทั้งสองชนิด โดยชนิดสูตรสำเร็จรูปมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ 49.57 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้นาน 9 เดือน และชนิดธรรมดา มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ 40.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บไว้นาน 6 เดือน และเมื่อครบ 12 เดือน ชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวีที่เก็บในสภาพห้องทั้งสองชนิด มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อต่ำมาก มีค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อเพียง 35.65 และ 12.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก วัดจากเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อ ที่เวลาต่าง ๆ

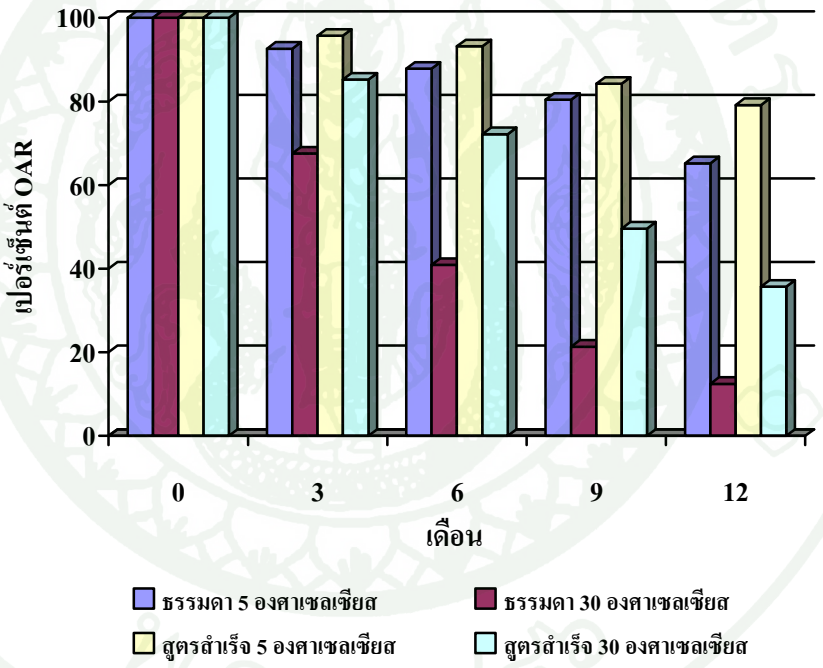
ชนิดเชื้อไวรัส เอ็นพีวี	อุณหภูมิที่เก็บ (^{o}C)	เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ [1] (% OAR)				
		0 เดือน	3 เดือน	6 เดือน	9 เดือน	12 เดือน
ธรรมดา	5	100	92.61	87.83	80.43	65.22
	30	100	67.56	40.89	21.33	12.44
สำเร็จรูป	5	100	95.74	93.19	84.26	79.15
	30	100	85.22	72.17	49.57	35.65

[1] % OAR คิดจากอัตราส่วนเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในแต่ละเดือนเทียบกับเปอร์เซ็นต์การตาย ของหนอนที่เริ่มต้นทดสอบ (0 เดือน)

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อที่เวลาต่างๆมาเขียนเป็นกราฟแท่งเป็นตัวชี้วัด เพื่อให้พิจารณาได้ชัดเจนยิ่งขึ้น จากภาพที่ 20 พบว่า กราฟแท่งมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บและอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา โดยไวรัส เอ็นพีวี ชนิดสูตรสำเร็จรูป ที่เก็บในตู้เย็น (กราฟแท่งสีไข่ไก่) พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆตามลำดับ รองลงมาคือ ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดธรรมดาที่เก็บในตู้เย็นเช่นเดียวกัน (กราฟแท่งสีน้ำเงิน) มีแนวโน้ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือลดลงในอัตราที่สูงขึ้นเล็กน้อยในช่วงแรกของการเก็บ และแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อครบ 12 เดือน ส่วนการเก็บรักษาในสภาพห้อง พบว่า ไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสองชนิดให้ผลในอัตราคล้ายคลึงกัน โดยไวรัส เอ็นพีวี ชนิดธรรมดา (กราฟแท่งสีเลือดหมู) มีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือลดลงอย่างรวดเร็วมากที่สุด โดยพบว่าตั้งแต่เดือนที่ 3 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือลดลงอย่างมาก แตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับไวรัส เอ็นพีวี ชนิดธรรมดาที่เก็บในตู้เย็น รองลงมา คือ ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดสูตรสำเร็จรูป ที่เก็บในสภาพห้อง (กราฟแท่งสีฟ้า) มีอัตราการลดลงของเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือค่อยๆลดลงในช่วงแรก คือ 3-6 เดือน หลังจากนั้นเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือจึงลดลงอย่างรวดเร็วแต่ในอัตราที่น้อยกว่าไวรัส เอ็นพีวี ชนิดธรรมดาที่เก็บในสภาพห้อง



ภาพที่ 20 เปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือ (%OAR) ของเชื้อ ที่เวลาต่าง ๆ

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า การเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ชนิดสูตรสำเร็จรูปที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส (ในตู้เย็น) ซึ่งเป็นวิธีที่ปฏิบัติกันอยู่แล้ว สำหรับชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดอื่น ได้แก่ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม และหนอนเจาะสมอฝ้าย จะช่วยยืดอายุชีวผลิตภัณฑ์นี้ได้นานถึง 12 เดือนโดยยังคงมีประสิทธิภาพกำจัดหนอนสูงถึง 74.40 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเชื้อมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือถึง 79.15 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เชื้อไวรัส เอ็นพีวี ธรรมดา ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเช่นกัน แม้ว่าจะสามารถเก็บได้นานถึง 12 เดือน แต่ประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนลดลงเหลือเพียง 60.00 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าผลิตภัณฑ์สูตรสำเร็จอย่างชัดเจน ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากส่วนผสมในสูตรสำเร็จที่เติมสาร ซึ่งประกอบด้วย สารเสริมฤทธิ์ (adjuvant) และสารต้านจุลชีพต่างๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียและยีสต์ (antimicrobs) เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและป้องกันการเสื่อมสภาพของเชื้อไวรัสที่อาจมีสาเหตุเนื่องจากกระบวนการผลิต เนื่องจากเชื้อไวรัส เอ็นพีวีจะต้องแยกสกัดเชื้อออกจากหนอน จึงมีโอกาสสูงที่จะมีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดต่างๆที่มีอยู่แล้วในกระเพาะอาหารของหนอน ซึ่งในการผลิตชีวผลิตภัณฑ์ชนิดนี้จึงมีข้อกำหนดว่า ถ้ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น จะต้องอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ คือต้องไม่เกิน 10^7 โคโลนีต่อกรัม เพราะถ้าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเหล่านี้มีมากเกินไป จะไปทำลายผลึกโปรตีนที่ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ส่งผลให้ประสิทธิภาพของไวรัสลดลง (Shieh and Bohmfalk, 1980; อุทัยและคณะ, 2537) ดังนั้นถ้าเก็บเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ในสภาพห้องที่อุณหภูมิทั่วๆไป จะส่งเสริมให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในเชื้อเจริญเติบโตได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการศึกษานี้ที่พบว่า เมื่อเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิด คือ ชนิดธรรมดา และสูตรสำเร็จ ที่เก็บในสภาพห้อง พบว่า ประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ลดลงอย่างรวดเร็วทั้งสองชนิด โดยเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ชนิดธรรมดามีประสิทธิภาพกำจัดหนอนต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บนานถึง 6 เดือน ในขณะที่ไวรัส เอ็นพีวี สูตรสำเร็จ ถึงแม้จะเติมสารเคมีต้านจุลชีพลงไป แต่อาจมีฤทธิ์ไม่เพียงพอในการยับยั้งจุลชีพเหล่านี้ แต่ก็สามารถยืดอายุการเก็บเชื้อได้นานขึ้นกว่าเชื้อธรรมดาโดยประสิทธิภาพกำจัดหนอนและเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บนานถึง 9 เดือน และเหลือไม่ถึง 40.00 เปอร์เซ็นต์ เมื่อครบ 12 เดือน (ตารางที่ 9)

แม้ว่าการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผักในตู้เย็น จะเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าเชื้อไวรัสจะคงมีประสิทธิภาพเหมือนเดิมทุกประการ การเก็บในตู้เย็นจะชะลอการเสื่อมสภาพของเชื้อให้ช้าลง เชื้อก็ยังคงเสื่อมสภาพตลอดเวลา ซึ่งเป็นเรื่องปกติของเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหลายที่ต้องเสื่อมสภาพไปตามกาลเวลา นอกจากนี้สภาพที่เย็นก็ไม่จำเป็นต้องเก็บรักษาในตู้เย็นเสมอไป การเก็บในห้องที่อุณหภูมิตอนกลางวันไม่สูงมาก สามารถถ่ายเทอากาศได้ดี หรือฝังไว้ใต้ดินก็สามารถรักษาเชื้อไวรัสให้คงทนอยู่ได้นานหลายเดือน (ทิพย์วดี, 2549) แต่โดยทั่วไปวิธีการเก็บของเกษตรกรเมื่อเปิดใช้ผลิตภัณฑ์ที่ยังใช้ไม่หมด มักจะเก็บผลิตภัณฑ์ที่เหลือโดยขาดความระมัดระวัง ส่วนใหญ่จะเก็บผลิตภัณฑ์เหล่านี้ในลักษณะที่หยิบฉวยได้สะดวก ไม่ได้คำนึงสภาพแวดล้อมของการเก็บ ทำให้ผลิตภัณฑ์ได้รับอุณหภูมิสูงตลอดวัน และบางครั้งอาจโดนแสงแดดร่วมด้วย ยิ่งทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมสภาพอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รวดเร็ว ซึ่งสารเคมีกำจัดแมลงก็ให้ผลเช่นเดียวกัน เพราะฉะนั้นการแนะนำให้ใช้ชีวผลิตภัณฑ์ไวรัสเอ็นพีวี กำจัดแมลง จึงเป็นที่ต้องทำความเข้าใจให้กับเกษตรกรให้เข้าใจถึงคุณลักษณะของจุลินทรีย์แล้ว ยังต้องให้เข้าใจถึงการเก็บรักษาอย่างถูกวิธี จึงจะช่วยให้การใช้ชีวผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ประสบความสำเร็จ สามารถนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ไวรัส SlNPV DOA, SeNPV DOA และ HaNPV DOA ของกรมวิชาการเกษตรที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank สรุปได้ว่า ไวรัส SlNPV DOA และ SeNPV DOA เป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับไวรัส *Spodotera exigua* NPV ส่วนไวรัส HaNPV DOA เป็นเชื้อในกลุ่มเดียวกับ *Helicoverpa armigera* NPV โดยเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน และ phylogenetic tree ซึ่งสอดคล้องกันอย่างชัดเจน โดยไวรัส เอ็นพีวี ทั้งสามชนิดที่นำมาศึกษานี้ มีเพียง 2 ชนิด ได้แก่ ไวรัส SlNPV DOA และ SeNPV DOA มีความสัมพันธ์ค่อนข้างใกล้ชิดทั้งลำดับของนิวคลีโอไทด์และลำดับของกรดอะมิโน และแตกต่างจากไวรัส HaNPV DOA อย่างชัดเจน มีค่าเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *polh* เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ identity ของลำดับกรดอะมิโน เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์

คุณสมบัติบางประการที่สำคัญของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ได้แก่ ความทนทานต่อแสงยูวี ชนิด บี ที่เป็นปัจจัยหลักต่อการเสื่อมประสิทธิภาพของเชื้อพบว่า เชื้อไวรัสความเข้มข้นสูง $1.0x10^9$ PIBs/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นมาตรฐาน มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสภาพที่ต้องรับแสงยูวีนานถึง 5 ชั่วโมง เชื้อจึงลดประสิทธิภาพลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อเท่ากับ 62.22 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นเชื้อสามารถทนต่อแสงยูวีได้ไม่เกิน 3 ชั่วโมงเชื้อก็มีประสิทธิภาพลดลงต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อเท่ากับ 57.89 เปอร์เซ็นต์

อุณหภูมิทั่วไปไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี โดยเฉพาะอุณหภูมิในช่วง 30 องศาเซลเซียส แม้จะเก็บไว้นานถึง 72 ชั่วโมง เชื้อยังคงมีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนสูงเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 85.96-92.98 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อสูงถึง 90.73-98.14 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเก็บเชื้อไวรัสที่อุณหภูมิสูงเกิน 35 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อเก็บเชื้อไว้เกิน 24 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการฆ่าหนอนของเชื้อจะลดลงอย่างชัดเจน มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 50.88-84.21 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้ออยู่ระหว่าง 53.70-88.89 เปอร์เซ็นต์ โดยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนและเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือจะลดลงตามอุณหภูมิและเวลาที่เพิ่มมากขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อายุการเก็บรักษาชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก พบว่าการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 5 องศาเซลเซียส จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้ดีกว่าการเก็บไว้ในสภาพห้อง โดยชีวผลิตภัณฑ์ไวรัส เอ็นพีวี ชนิดสำเร็จรูปจะเก็บได้นานถึง 12 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนถึง 74.40 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อสูงถึง 79.15 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเก็บเชื้อธรรมดาที่ยังไม่ผสมส่วนผสมอื่นๆ พบว่า มีประสิทธิภาพลดลงแตกต่างจากชีวผลิตภัณฑ์สำเร็จรูป มีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนเมื่อเก็บนาน 12 เดือน เท่ากับ 60.00 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อ 65.22 เปอร์เซ็นต์

ข้อเสนอแนะ

จากสถานการณ์ในปัจจุบัน หนอนกระทู้ผักจัดเป็นแมลงศัตรูพืชที่เป็นปัญหามากขึ้นอย่างต่อเนื่อง การแก้ปัญหาด้วยการใช้สารเคมีกำจัดแมลงเป็นหลัก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ตั้งแต่เกษตรกร ผู้บริโภค แมลงตามธรรมชาติที่มีประโยชน์ รวมถึงสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ดังนั้น การนำชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก ไปใช้ทดแทนสารเคมีกำจัดแมลง ก็เป็นทางเลือกหนึ่งให้แก่เกษตรกร ซึ่งการทดลองนี้ได้ศึกษาชนิดของไวรัส เอ็นพีวี และปัจจัยสำคัญที่เป็นประโยชน์ ช่วยให้การใช้ชีวผลิตภัณฑ์นี้มีประสิทธิภาพมากขึ้น วิธีการเก็บรักษาตลอดจนปัจจัยของแสงที่เป็นตัวการสำคัญของการเสื่อมสภาพของชีวผลิตภัณฑ์ ไวรัส เอ็นพีวี เป็นสิ่งที่ต้องระมัดระวัง และคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตรได้แนะนำให้ใช้เชื้อชนิดนี้ฉีดพ่นในแปลงพืชหลัง 15.00 น.เป็นต้นไป จะช่วยให้เชื้อปลอดภัยจากแสงยูวี แต่เนื่องจากสภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงอย่างมากในปัจจุบันทำให้แสงอาทิตย์และแสงยูวีที่ตกมาสู่ผิวโลกอาจมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น เพราะชั้นโอโซนในบรรยากาศรอบโลกที่เป็นตัวกั้นแสงยูวีได้ลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นพลังงานแสงยูวีที่ใช้ในการทดลองนี้อาจต่ำกว่าสภาพความเป็นจริง จึงอาจทำให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนค่อนข้างต่ำกว่าเท่าที่ควรเป็น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ควรจะศึกษาพลังงานแสงยูวีที่แท้จริงในแต่ละวัน เพื่อให้สามารถประมาณการถึงพลังงานที่แท้จริงของแสงยูวีที่แผ่มาที่ผิวโลก จะช่วยให้สามารถประเมินประสิทธิภาพคงเหลือของเชื้อไวรัส เอ็นพีวีได้อย่างแม่นยำขึ้น นอกจากนี้เครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดแสงยูวี ชนิดบี ที่มีความแม่นยำมีราคาค่อนข้างสูง และเครื่องวัดแสงยูวี ชนิดบี ที่ใช้ในการทดลองนี้ให้ค่าการวัดที่ค่อนข้างหยาบ เมื่อนำไปเทียบกับข้อมูลแสงยูวีจากกรมอุตุนิยมวิทยา จึงอาจมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง แต่ก็สามารถนำผลการทดลองนี้มาศึกษาเพื่อดูแนวโน้มและประเมินความเสี่ยงในด้านปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวีต่อแสงยูวี ชนิดบีได้ในเบื้องต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. **ไวรัสของแมลง : นิวคลีโอโพลิฮีโดรไวรัส.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 395 หน้า

ธรรมนูญ พุทธสมัย และ เกรียงไกร จำเริญมา. 2528. **การทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงและสัตว์-ศัตรูพืช.** กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 33 หน้า

นภา ศิวรังสรรค์. 2547. **ปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร. 135 หน้า

พิสิษฐ์ เสพสวัสดิ์, ศรีสมร พิทักษ์, วิเชียร บำรุงศรี, เตือนจิตต์ สัตยาวิรุฑธิ์ และสาธร สิริสิงห์. 2535. **แมลงศัตรูพืชไร่ตระกูลถั่วและการป้องกันกำจัด.** *ใน* แมลงและสัตว์ศัตรูที่สำคัญของพืชเศรษฐกิจและการบริหาร. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. น. 163-185.

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, กิตติ อ้อไธสง, สุเทพ สหายา และเกศรา จีระจรรยา. 2542. **การศึกษาความเป็นพิษของสารฆ่าแมลงกลุ่มต่างๆต่อหนอนกระทู้หอม.** *ใน* รายงานวิจัยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูฝ้ายและพืชเส้นใย กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 15 หน้า

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, อุทัย เกตุนุติ และ อัจฉรา ตันติโชดก. 2550. **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อไวรัส NPV.** *ใน* เอกสารประกอบการอบรม แมลง-สัตว์ศัตรูพืชและการป้องกันกำจัด ครั้งที่ 13 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 137 หน้า

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 282 น.

_____. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 116 หน้า

_____. 2552. **เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 269 หน้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิรินันท์ เอี่ยมประภา. 2528. **คุณสมบัติบางประการและผลของสภาพแวดล้อมที่มีต่อประสิทธิภาพและความคงทนของเชื้อไวรัสของหนอนกระทู้หอม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อัจฉรา ตันติโชดก, สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี, อิศเรส เทียนทัด และอุทัย เกตุนุติ. 2551. ไวรัส เอ็นพีวี ชีวินทรีย์กำจัดหนอน. น.155-184.*ใน* **เทคโนยีการใช้ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตร**,กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

อุทัย เกตุนุติ. 2525. **การเลี้ยงแมลงด้วยอาหารเทียม.** การสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ครั้งที่ 1. กองกีฏและสัตววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 268 หน้า

_____. 2534. การควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วยเชื้อไวรัส. น. 118-147.*ใน* **การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี.** กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

_____, อัจฉรา ตันติโชดก และ พิมลพร นันทะ. 2537. ปรับปรุงการผลิตและทำสูตรสำเร็จของไวรัส NPV. *ใน* **รายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 9 . กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.** 21-24 มิถุนายน 2537 โรงแรม แกรนด์ จอมเทียนพาเลซ ชลบุรี.น. 457-484.

Abbott, W.S. 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. **J. Econ. Entomol.** 39:401-423.

Burges, H. D. 1981. **Microbial Control of Pests and Plants Diseasea 1970-1980**. Academic Press Inc. London. 949 p.

Busvine, J. R. 1971. **Techinques for Testing Insecticides**. The Commonwealth Institute of Entomology, London. 345 p.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

David, W. A. L. and B. O. C. Gardiner. 1967. The effect of heat, cold and prolonged storage on the granulosis virus of *Pieris brassicae.* **J. Inverterbrate Pathol**. 9(4) : 555-562.

El-Dougdoug, K.A., Ahmed,Y. E., Bekheet, H. K. and Ebrahim, A. G. 2009. **Molecular characterization of Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus**. Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blastx_July 15, 2009.

Elnagar, S. 1982. The inactivation of nuclear polyhedrosis virus by ultraviolet radiation. **Bulletin Entomology Society Egypt Economic Series**. 13: 171-174.

Griego, V. M., M. G. Martigmoni and A. E. Claycomb. 1985. Inactivation of Nuclear polyhedrosis virus (Baculovirus subgroup A) by Monochromatic UV Radiation. App. **Environ. Micro**. 49: 709-710.

Gudauskas, R. T. and D. Canerday. 1968. The effect of heat, buffer salt and H-ion concentration and ultraviolet and ultraviolet light on the infectivity of *Heliothis* and *Trichoplusia* nuclear polyhedrosis viruses. **J. Inverterbrate pathol**. 12(3): 405-411.

Harm, W. 1980. **Biologial effects of ultra-violet radiation**. Cambridge University Press.

Hienton, T. E., D. E. Wiant and O. A. Brown. 1958. **Electricity in Agricultural Engineering**. John Wiley & Sons, Inc., New York. 393 p.

Hunter-Fujita, F.R., Enteistle, P.F., Evans,H.F. and Crook, N.E. 1998. **Insect Viruses and Pest Management**. John Wiley & Sons, Inc., New York. 620 p.

James, R. B. 1971. **A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides**. The Commonwealth Institue of Entomology , London. 345 p.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kaewwises, M., Chaeychomsri, S., Chowpongpang, S. and Attathom, T. 2006. Identification of the Polyhedrin Gene of Thai *Bombyx mori* Nucleoppolyhedrovirus. **Science Asia** (32) 2006.

Lange, M.,Wang, H. And Jehle, J. A. 2004. Toward a molecular identification and classification system of lepidopteran-specific baculoviruses. **J. Virology**. 325(1): 36-47.

Lawrence, A. C., H. L. Headrick and S. P. Arthurs. 2008. Effect of Temperature on Long-Term Storage of Codling Moth Granulosisvirus Formulations. **J. Econ. Entomol**. Vol. 101 (2): 288-294.

Martignoni, M. E. and P. J. Iwai. 1977. Thermal inactivation characteristics of two strains of nuclear polyhedrosis virus (Baculovirus subgroup A) pathogenic for *Orgyia pseudotsugata.* **J. Invertebrate Pathol.** 30(2): 255-262.

Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1977. A new meyhod for sequencing DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci.** U.S.A. 74 : 560-567.

Mcleod, P. J., W. C. Yearian and S. Y. Young III. 1977. Inactivation of *Baculovirus heliothis* by ultraviolet irradiation, dew and temperature.**J. Invertebrate pathol.** 18(2): 292-294.

Morris, O. M. 1971. The effect of sunlight , ultraviolet and gamma irradiations and temperature on the infectivity of a nuclear polyhedrosis virus. **J. Inverterbrate pathol.** 18(2): 292-294.

Pang, Y., Yu, J., Wang L., Hu X., Bao W., Li G. and Chen C. 2001. Sequence analysis of the *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus genome. **Virology**. 287:391-404.

Rowley,D.L., Farrar,R.R. Jr., Blackburn,M.B. and Harrison,R.L. 2010. Genetic and biological variation among nucleopolyhedrovirusisolates from the fall armyworm, Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Virus Genes.** 40 (3): 458-468.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci.** U.S.A. 74: 5463-5467.

Shapiro, M. Farrar, R. R Jr., Domek, J. and Tavid, I. 2002. Effects of Virus Concentration and Ultraviolet Irradiation on the Activity of Corn Earworm and Beet armyworm (Lepidoptera : Noctuidae) Nucleopolyhedrovirus. **J Econ. Entomol.** 95(8): 243-249.

Seufi A. M. 2008. Characterization of an Egyptian *Spodoptera littoralis* nucleopolyhedrovirus and a possible use of a highly conserved region from polyhedrin gene for nucleopolyhedrovirus detection. **Virol J.** 5: 13.

Shieh, T. R. and G. T. Bohmfalk. 1980. Production and efficacyof baculoviruses. **Biotech. And Bioeng.** 22: 1357-1378.

Smith, L.M., J.Z. Sander, R.J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. Connell, C. Heiner, S.B.H. Kent and L.F. Hood. 1986. Fluorescence detection in automated analysis. **Nature**. 32: 674.

Sushil K. K. 2000. **Microbial Pest Control**. Marcel Dekker, Inc., New York. 300 pp.

Tinsley, T.W. 1979. THe Potential of Insect Pathogenic Viruses as Pesticidal Agents. **Ann. Rev. Entomol.** 24: 63-67.

Timas, U. 1983. The effect of UV radiation on the nuclear polyhedrosisi virus of the gypsy moth, *Lymantia dispar* L. (Lepidoptera:Lymantiidae).Abstr. in Rev. **Appl. Entomol. Ser A.** 71:186.

Woo, S. D., Choi K. H., Je Y. H. and Jin B. R. 2006. Characterization of the *Helicoverpa assulta* nucleopolyhedrovirus genome and sequence analysis of the polyhedron gene region. **J. Biosci.** 31 (3): 329-338.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Van Strien, E. A., Zuidema, D., Goldbach, R.W. and Vlak, J. M. 1992. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the polyhedrin gene of Spodoptera exigua nuclear polyhedrosis virus. **J. Gen. Virol.** 73 (11): 2813-2821.

Ward, V.K., Sneddon, K. M. B., Hyink, O. and Kalmakoff, J. 2010. Baculovirus Genomics : A resource for Biocontrol. (Edited by Rajeev K. Upadhyay) in Advances in Microbial Control of Insect Pests. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 127-144 p.

Young, S. Y. and Yearian, W. C. 1986. Formulation and application of baculoviruses. *In* ::The Biology of Baculoviruses, Vol. 2. R. R. Granados and B. A.Federici (eds.) CRC Press. Boca Raton. Florida. pp. 157-179.

Zanotto, P. M., Kessing, B. D. and Maruniak, J.E. 1993. Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations; **J. Invertebr. Pathol.** 62: 147-164.

Zhang, C. X., Ma, X. C. and Guo, Z. J. 2005. Comparison of the complete genome sequence between C1 and G4 isolates of the Helicoverpa armigera single nucleocapsid nucleopolyhedrovirus. **J.Virology** 333 (1): 190-199.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการเตรียมอาหารเทียมเลี้ยงแมลง

1. อาหารเทียม (สูตรของอาหารเทียมแสดงอยู่ในตารางผนวกที่ 1)

2. อุปกรณ์ที่จำเป็นในการเตรียมอาหารเทียม ได้แก่ เตาไฟเพื่อใช้เคี่ยววุ้น เครื่องปั่นผสมอาหารเทียมขนาดจุ 1.5 ลิตร หรือ 3.75 ลิตร ภาชนะใช้เคี่ยววุ้น ภาชนะตวง (beaker) ขนาด 1,000, 500, 100 และ 50 มิลลิลิตร อย่างละ 2 ชิ้น กระบอกตวง (cylinder) ขนาด 25 มิลลิลิตร 1 อัน เครื่องชั่งชนิดหยาบ 1 เครื่อง ไม้พายใช้เคี่ยววุ้น 1 อัน ภาชนะเลี้ยงแมลง ตะกร้าบรรจุภาชนะเลี้ยงแมลง

3. ขั้นตอนในการเตรียมเริ่มต้นด้วยการชั่งส่วนประกอบของอาหารเทียมตามสูตร (ตารางที่ 6) จากนั้นแบ่งน้ำออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปใส่ภาชนะเพื่อใช้เคี่ยววุ้น อีกส่วนหนึ่งนำไปใส่เครื่องปั่นผสมอาหาร จากนั้นเทส่วนประกอบของอาหารเทียมชุดแรกเข้าเครื่องผสมอาหารเทียม เช่น ถั่วเขียวบด ยีสต์ casein และ formalin เดินเครื่องผสมอาหารเทียม 1-2 นาที นำ methyl parahydroxy benzoate และ sorbic acid ไปละลายใน ethyl alcohol อัตรา 30% W/V แล้วเทลงในเครื่องผสมอาหารเทียมเดินเครื่องผสมนาน 1 นาที จากนั้นนำวุ้นที่เคี่ยวจนเดือดปล่อยทิ้งเอาไว้จนความร้อนลดลงเหลืออุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นำมาเทลงในเครื่องผสมอาหารเดินเครื่อง 1-2 นาที ระหว่างที่เดินเครื่องผสมอาหารค่อย ๆ เติม ไวตามินรวม และ ascorbic acid ลงไปทีละน้อยจนหมด เดินเครื่องผสมอาหารต่ออีก 1 นาที เมื่ออาหารผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วรีบเทใส่ บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเทใส่ภาชนะเลี้ยง โดยทั่ว ๆ ไป จะเทอาหารเทียมหนาประมาณ 0.7-1 เซนติเมตร ปล่อยให้อาหารเทียมเย็นอาหารเทียมจะแข็งตัว เก็บทิ้ง ค้างคืนไว้ 1 คืน เพื่อให้ส่วนประกอบของอาหารเทียมซึมเข้าเป็นเนื้อเดียวกันก่อนที่จะนำไปเลี้ยงแมลงต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 สูตรอาหารเทียมเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อนำไปผลิตไวรัส เอ็นพีวี (อุทัย, 2534)

ส่วนผสม Ingredient	ปริมาณของส่วนผสม
ถั่วเขียวบด Mung bean meal	130.0 g
ใบกะหล่ำปลีแห้งบดละเอียด	-
Dried baker's yeast	10.0 g
Methyl parahydroxybenzoate	2.5 g
Sorbic acid	1.5 g
Ascorbic acid	3.0 g
Casein	3.0 g
Choline chloride	0.5 g
Wesson's salt mixture	-
Agar	13.0 g
Formalin 40%	2.0 ml
Vitamin stock*	10.0 ml
น้ำกรอง	750.0 ml

* Vitamin stock (ส่วนผสมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร)

Niacin	600 mg.
Inositol	500 mg.
Calcium panthothenate	600 mg.
Thiamine	150 mg.
Riboflavin	300 mg.
Pyridoxin	150 mg.
Folic acid	150 mg.
Biotin	12 mg.
Vitamin B_{12}	2 mg.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน

Partial polyhedrin gene (*polh*) of SlNPV sized 405 bp

GTCAAGCCCGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCAGGGAA
ACTTGGACCCGTTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTCAACGATCAAGAAATAATGGACG
TCTATCTCGTCATCAACATGAGGCCCACTAGACCCAACCGATGCTACAGATTCTTGGCGCA
ACACGCTCTCCGTTGCGATCCTGACTACGTTCCTCACGAAGTGATCCGCATCGTCGAGCCCG
TATACGTCGGCTCCAACAACGAGTACCGCATCAGCTTGGCCAAAAAGGGCGGCGGCTGCCC
GGTCATGAATCTACACTCTGAGTACACGCACTCTTTCGAAGAATTCATCAACCGCGTCATCT
GGGAAAACTTCTACAAACCCATCGTGTACGTAGGAACC

> Spodotera litura nuclear polyhydrosis virus polh gene for polyhedrin

Length=1057

Score = 693 bits (375), Expect = 0.0

Identities = 398/408 (98เปอร์เซ็นต์), Gaps = 6/408 (1เปอร์เซ็นต์)

Strand=Plus/Plus

Partial polyhedrin gene (*polh*) of SeNPV sized 405 bp

GTCAAACCGGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCCGCGAA
ACTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGCTTTCCCATCGTCAACGATCAAGAAATCATGGACG
TTTTCCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTTCCGATTTTTGGCTCAG
CACGCTCTCCGTTGCGATCCCGACTACGTTCCTCACGAAGTCATCCGCATCGTCGAGCCCGT
GTACGTCGGCACCAACAACGAATACCGCATCAGTTTAGCCAAAAAGGGCGGCGGTTGCCC
CGTCATGAATCTCCACTCCGAGTACACCAACTCGTTCGAGGAATTCATCAACCGCGTCATTT
GGGAGAACTTTTACAAACCCATCGTTTACGTAGGAACC

> Spodoptera exigua MNPV polyhedrin gene, Length=608

Score = 749 bits (405), Expect = 0.0

Identities = 405/405 (100เปอร์เซ็นต์), Gaps = 0/405 (0เปอร์เซ็นต์)

Strand=Plus/Plus

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Partial polyhedrin gene (*polh*) of HaNPV sized 405 bp

GTTAAGCCCGACACAATGAAGCTTGTAGTTAACTGGAGCGGTCGCGAATTTCTTCGCGAAA
CTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGTTTTCCCATTGTAAACGACCAAGAAATTATGGACGT
GTTTCTGTCTGTTAATATGCGACCAACCAAACCGAACCGTTGTTACCGATTCTTAGCGCAAC
ACGCTCTGCGTTGTGATCCCGACTATATTCCTCACGAAGTCATTCGTATTGTAGAACCTTCC
TATGTAGGCAGTAACAACGAGTACAGAATTAGTTTAGCCAAAAAATACGGCGGTTGTCCCG
TTATGAACTTGCACGCTGAATACACTAATTCCTTTGAAGATTTCATTACCAACGTAATTTGG
GAGAACTTCTACAAACCAATCGTTTACGTAGGCACT

> Helicoverpa armigera SNPV isolate 3010 polyhedrin(polh) gene Length=511

Score = 743 bits (402), Expect = 0.0

Identities = 404/405 (99เปอร์เซ็นต์), Gaps = 0/405 (0เปอร์เซ็นต์)

Strand=Plus/Plus

ลำดับกรดอะมิโนของไวรัส เอ็นพีวี ในประเทศไทยทั้ง 3 โคลน

> SlNPV

GTCAAGCCCGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCAGGGAA
ACTTGGACCCGTTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATCGTCAACGATCAAGAAATAATGGACG
TCTATCTCGTCATCAACATGAGGCCCACTAGACCCAACCGATGCTACAGATTCTTGGCGCA
ACACGCTCTCCGTTGCGATCCTGACTACGTTCCTCACGAAGTGATCCGCATCGTCGAGCCCG
TATACGTCGGCTCCAACAACGAGTACCGCATCAGCTTGGCCAAAAAGGGCGGCGGCTGCCC
GGTCATGAATCTACACTCTGAGTACACGCACTCTTTCGAAGAATTCATCAACCGCGTCATCT
GGGAAAACTTCTACAAACCCATCGTGTACGTAGGAACC

polyhedrin [Spodoptera frugiperda MNPV]

Length=170

Score = 285 bits (728), Expect = 7e-98

Identities = 132/135 (98เปอร์เซ็นต์), Positives = 135/135 (100เปอร์เซ็นต์), Gaps = 0/135 (0เปอร์เซ็นต์)

Frame = +1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

> **SeNPV**

GTCAAACCGGACACGATGAAACTGGTCGTCAACTGGAGCGGCAAAGAGTTTCTCCGCGAA
ACTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGCTTTCCCATCGTCAACGATCAAGAAATCATGGACG
TTTTCCTCGTAATCAACATGAGACCAACGAGACCTAACCGTTGCTTCCGATTTTTGGCTCAG
CACGCTCTCCGTTGCGATCCCGACTACGTTCCTCACGAAGTCATCCGCATCGTCGAGCCCGT
GTACGTCGGCACCAACAACGAATACCGCATCAGTTTAGCCAAAAAGGGCGGCGGTTGCCC
CGTCATGAATCTCCACTCCGAGTACACCAACTCGTTCGAGGAATTCATCAACCGCGTCATTT
GGGAGAACTTTTACAAACCCATCGTTTACGTAGGAACC

polyhedrin [Spodoptera exigua MNPV]

Length=201

Score = 288 bits (736), Expect = 1e-98

Identities = 135/135 (100เปอร์เซ็นต์), Positives = 135/135 (100เปอร์เซ็นต์), Gaps = 0/135 (0เปอร์เซ็นต์)

Frame = +1

> **HaNPV**

GTTAAGCCCGACACAATGAAGCTTGTAGTTAACTGGAGCGGTCGCGAATTTCTTCGCGAAA
CTTGGACGCGTTTCATGGAAGACAGTTTTCCCATTGTAAACGACCAAGAAATTATGGACGT
GTTTCTGTCTGTTAATATGCGACCAACCAAACCGAACCGTTGTTACCGATTCTTAGCGCAAC
ACGCTCTGCGTTGTGATCCCGACTATATTCCTCACGAAGTCATTCGTATTGTAGAACCTTCC
TATGTAGGCAGTAACAACGAGTACAGAATTAGTTTAGCCAAAAAATACGGCGGTTGTCCCG
TTATGAACTTGCACGCTGAATACACTAATTCCTTTGAAGATTTCATTACCAACGTAATTTGG
GAGAACTTCTACAAACCAATCGTTTACGTAGGCACT

polyhedrin [Busseola fusca nucleopolyhedrovirus]

Length=170

Score = 288 bits (738), Expect = 2e-99

Identities = 135/135 (100เปอร์เซ็นต์), Positives = 135/135 (100เปอร์เซ็นต์), Gaps = 0/135 (0เปอร์เซ็นต์)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 23 มีนาคม 2504
สถานที่เกิด	จังหวัดตรัง
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิตเกษตรศาสตร์ สาขากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นิเทศศาสตรบัณฑิต(สื่อสิ่งพิมพ์) มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักกีฏวิทยาชำนาญการพิเศษ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์