

โครงการวิจัยย่อยที่ 3

การตรวจวิเคราะห์ไมโครสปอริเดียม (โปรโตซัวโรคแมลง) ด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

Detection of Microsporidia (Entomopathogenic Protozoa) by Biomolecular Techniques

สุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต¹ ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์² ประภัสสร เชยคำแหง¹ สาทิพย์ มาลี¹ พชรวิวรรณ มณีสาคร¹

Suchonwat Wongwilikhit¹ Khanitha Wongwathanarat² Prapassorn Choeikamhange¹

Satip Maree¹ Patchareewan Maneesakhon¹

¹ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

² สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

โปรโตซัวโรคของแมลงศัตรูผักคัดเลือกต้นแบบมาจาก หนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* Hübner หนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* Hübner หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* Fabricius และหนอนใยผัก *Plutella xylostella* Linnaeus ลักษณะภายนอกกลมยาวรี (ovocylindrical) มีลักษณะรูปร่างโปรโตซัวเหมือนกัน ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วย Morphological marker จำเป็นที่จะใช้เทคนิคชีวโมเลกุล Biomolecule marker ในการตรวจจำแนกชนิดที่แน่นอน

คำสำคัญ : โปรโตซัวโรคแมลง ไมโครสปอริเดียม ชีวโมเลกุล ชีวินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช

Abstract

The Microsporidia (entomopathogenic protozoa) of vegetable insect pests, *Helicoverpa armigera* Hubner, *Spodoptera exigua* Hubner, *Spodoptera litura* Fabricius and *Plutella xylostella* Linnaeus, from various areas were isolated. The results revealed that morphology of spores from all insects were ovocylindrical shape. The morphological markers could not be used as only one method for identification. This paper pointed that the biomolecule marker method was suitable for identification.

Keyword: entomopathogenic protozoa, Microsporidia, biomolecular, Biopesticide

บทนำ

ไมโครสปอริเดียม (Microsporidia) เป็นโปรโตซัวที่ต้องเจริญเพิ่มจำนวนในเซลล์สิ่งมีชีวิตเท่านั้น จัดอยู่ใน Kingdom Protista, Phylum Microsporidia มีประมาณ 143 สกุล 1,200 ชนิด (Wittner and Weiss, 1999) ซึ่งพบได้ทั่วไปทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Didier *et al.*, 2000) ปัจจุบัน Microsporidia เกือบครึ่งหนึ่งพบในแมลง (Becnel and Andreadis, 1999). โดยเข้าทำลายบริเวณ gut, fat bodies, reproductive tissues, muscles, nervous tissues, silk gland tissues และ Malpighian tubules หรือมีผลทำลายทั่วร่างกาย (Becnel and Andreadis, 1999; Solter and Becnel, 2000, Karacetin *et al.*, 2005) Microsporidia จัดจำแนกตามลักษณะของแมลงอาศัยได้เป็น 4 สกุล ได้แก่ Genus Vavraia (mosquitoes, midge, black fly species), Genus Nosema, (Grasshopper, corn borer, honey bee, silkworm, mosquitoes, grass grub) Genus Vairimorpha (Lepidoptera >20 Noctuids, meal moth) and Genus Amblyospora (mosquitoes) มีการศึกษาโครงสร้างภายในและลักษณะทางชีวโมเลกุลเพื่อจำแนกชนิด Microsporidia สกุล Vairimorpha และ Nosema กับหนอนใยผัก (Canning *et al.*, 1999) การตรวจหา Microsporidia ชนิด *Nosema* sp. และ *Vairimorpha* sp. ที่ส่งผ่านการติดต่อโรคไปทางไข่ (transovum transmission) ของไข่หนอนไหม Silkworm pebrine, *Bombyx mori*, ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Hatakeyama and Hayasaka, 2002) และมีการจำแนกโปรโตซัวสกุล *Nosema* sp. และ *Vairimorpha* sp. ด้วย SSUrDNA sequences (small subunit ribosomal DNA) หรือ SSUrRNA sequences (small subunit ribosomal RNA) หลายชนิด เช่น โปรโตซัว *Vairimorpha ocinarae* ของแมลงชนิด *Ocinara lida* Moor (Lepidoptera: Bombycidae) (Wang *et al.*, 2009) *Nosema chrysoorrhoeae* ของแมลงชนิด browntail moth, *Euproctis chrysoorrhoea* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) (Hylis *et al.*, 2006) *Nosema* sp. ของแมลงชนิด cabbage white butterfly, *Pieris rapae* L.

การทดลองศึกษาวินิจฉัยนี้เพื่อหาวิธีการการตรวจวิเคราะห์ชีวิตวัยโปรโตซัวโรคแมลงต้นแบบ โดยเทคนิคชีวโมเลกุล เพื่อเป็นการกำหนดลักษณะมาตรฐานชีวิตวัยโปรโตซัวโรคแมลง ที่จะนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมตัวอย่างโปรโตซัว

นำโปรโตซัวต้นแบบ ที่ได้มาจากแปลงเกษตรกรในท้องที่ จังหวัดนครปฐม กาญจนบุรี ลพบุรี ปทุมธานี และ นครราชสีมา และนำมาขยายเพิ่มจำนวนจากตัวหนอนแมลงที่มาจากแหล่งเดียวกัน ในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย โดยใช้หนอนแต่ละชนิดวัย 3 (อายุ 7 วัน) จำนวน 50 ตัวต่อรอบการขยายเชื้อ โดยการ infection แบบ Diet plug method ใช้ระดับความเข้มข้นของสปอร์แต่ละชนิดเท่ากับ 3×10^6 ฝัก/มล. ปริมาตร 10 μ l/ชิ้นอาหารเทียมที่มีขนาดหนา 2

มม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม. สำหรับให้หนอน 1 ตัว กินให้หมดภายใน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหนอนที่กินโปรโตซัวเข้าไปพร้อมอาหารย้ายไปกินอาหารปกติที่ไม่ใส่โปรโตซัวตรวจเช็คอาการเป็นโรคของหนอนแต่ละตัวเมื่อมีอาการของโรคสูงสุดทำการเก็บตัวอย่างหนอนใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มล. เก็บรักษาสภาพไว้ที่ 4°C พร้อมบันทึกผลทุกวัน เมื่อครบจำนวนบดตัวอย่างหนอนในน้ำกลั่น กรองด้วยผ้าก๊อซ 4 ชั้น กรองซากหนอนทิ้งไปและปั่นล้างแยกโปรโตซัวให้ตกตะกอนตรวจดูความบริสุทธิ์และ นับจำนวนโปรโตซัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยให้มีความเข้มข้นที่ 10^7 - 10^8 สปอร์/ชนิด ส่วนหนอนโยฝากใช้หนอนวัย 2 โดยใช้วิธีการทาสปอร์บนใบคะน้าสด ใช้เวลาในการกิน 24 ชั่วโมงจึงนำหนอนออกไปกินใบผักปลอดสารเคมีและเชื้ออื่นๆตามปกติ แล้วจึงเก็บหนอนที่มีอาการของโรคสูงสุดทำการเก็บตัวอย่างหนอนใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มล. เก็บรักษาสภาพไว้ที่ 4°C พร้อมบันทึกผลทุกวัน

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากไมโครสปอริเดียสกุล *Vairimorpha* spp. จำนวน 20 ตัวอย่าง และเปรียบกับหนอนปกติ 4 ชนิด ตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Canning *et al.* (1999) และ Willians *et al.* (2008) โดยใช้โปรโตซัว 10^8 สปอร์ 250 μ l ผสมกับ บัฟเฟอร์ (1 M Na_2CO_3 85 μ l , 0.5 M EDTA 150 μ l , 1 M NaCl 15 μ l) 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 30 นาที เมื่อสารละลายใสนำมาปั่นแยกที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที นำสารละลายใส 500 มล. ใส่หลอดทดลองใหม่ และเติม 2% SDS 500 μ l, 20 mg/ml Proteinase K 10 μ l, 10 mg/ml Rnase A 8 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนบน 500 μ l ใส่ในหลอดใหม่ผสมกับ Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol (อัตรา 25 : 24 : 1) 30 วินาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง แล้วปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที นำสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่แล้วเติม 3 M NaAc pH 5.2 อัตรา 1: 10 เท่า ผสมเบาๆกับ absolute ethyl alcohol บ่มไว้ที่ -20 °C นาน 30 นาที ปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ปั่นล้างดีเอ็นเอที่ได้ ด้วย 70% ethyl alcohol และปั่นแยกด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที จากนั้นผึ่งตะกอน 1-2 นาที ละลายดีเอ็นเอ 20 μ l ด้วย TE buffer pH 8.0 เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C และตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตัวอย่าง และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 0.8 % ใน 0.5 M TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 V สม่่าเสมอ 30-40 นาที หลังจากนั้นนำเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide (0.5 μ g /ml) นาน 5-10 นาที ล้าง ethidium bromide ในน้ำกลั่น นาน 5-10 นาที ตรวจดูขนาดดีเอ็นเอ โดยนำเจลไปวางบน UV transilluminator เพื่อถ่ายรูป บันทึกผล

การตรวจวิเคราะห์ชนิดจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ

ออกแบบและคัดเลือกไพรเมอร์โดยการสืบค้นข้อมูลขึ้น จาก National Center for Biotechnology Information ([http : www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) เพื่อนำมาใช้เป็นไพรเมอร์เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค

ทางชีวโมเลกุล ตามวิธีการของ Wang *et al.* (2009), Williams *et al.* (2008) และ Choi *et al.* (2002) ตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ DNA เพื่อจำแนกชนิดโปรโตซัว 20 ตัวอย่าง และเปรียบกับหอนอนปกติ 4 ชนิด บันทึกข้อมูล และ สรุปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย 2 ปี (ตุลาคม 2553 - กันยายน 2554) ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร และ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รังสิต จังหวัดปทุมธานี

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการเตรียมตัวอย่างโปรโตซัว

เตรียมโปรโตซัวต้นแบบ ที่คัดแยกมาจากหอนอนกระทู้หอม หอนอนกระทู้ผัก หอนอนเจาะสมอฝ้าย และหอนอนใยผัก ที่ได้มาจากแปลงเกษตรกรในท้องที่ จังหวัดกาญจนบุรี นครปฐม ลพบุรี นครราชสีมา และ ปทุมธานี โดยจัดเตรียมไว้แล้ว 11 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1) จากที่วางแผนเตรียมโปรโตซัวให้ได้ รวม 20 ตัวอย่าง เพื่อให้เกิดความหลากหลายเมื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ สำหรับโปรโตซัวหอนอนใยผักเป็นโปรโตซัวที่เพิ่มเติมจากที่เก็บตัวอย่างได้ ซึ่งต้องใช้วิธีการการเพิ่มขยายปริมาณโปรโตซัวเป็นวิธีการที่ไม่ได้ใช้อาหารเทียม ทำให้ต้องใช้เวลาและความละเอียดมากกว่าหอนอนชนิดอื่น

ตารางที่ 3.1 สรุปแหล่งที่ได้โปรโตซัวจากหอนอนแมลงแต่ละชนิด

แหล่งสายพันธุ์	ผลการดำเนินงานการเตรียมโปรโตซัวของหอนอนแต่ละชนิดและแหล่งเก็บตัวอย่าง							
	หอนอนกระทู้หอม		หอนอนกระทู้ผัก		หอนอนเจาะสมอฝ้าย		หอนอนใยผัก	
	ชื่อย่อ	ผล	ชื่อย่อ	ผล	ชื่อย่อ	ผล	ชื่อย่อ	ผล
กาญจนบุรี	P-SE-1	✓	P-SL-1	✓	P-HA-1	✓	P-PX-1	✗
นครปฐม	P-SE-2	✓	P-SL-2	✓	P-HA-2	✓	P-PX-2	✗
ลพบุรี	P-SE-3	✓	P-SL-3	✓	P-HA-3	✓	P-PX-3	✗
นครราชสีมา	P-SE-4	✓	P-SL-4	✗	P-HA-4	✗	P-PX-4	✗
ปทุมธานี	P-SE-5	✗	P-SL-5	✗	P-HA-5	✗	P-PX-5	✓

หมายเหตุ ผลการเตรียมโปรโตซัวเพื่อใช้สกัดดีเอ็นเอ ✓ ดำเนินการเสร็จแล้ว ✗ ดำเนินการยังไม่เสร็จ

ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการทดสอบวิธีการสกัดดีเอ็นเอเบื้องต้น โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบ ขั้นตอนที่ดัดแปลง จากวิธีการของ Canning *et al.* (1999) และ Williams *et al.* (2008) และ วิธีการสกัดดีเอ็นเอไวรัสชนิดเอ็นพี

วี ตามวิธีการดัดแปลงของ Hunter-Fujita *et al.* (1998) และ Christian *et al.* (2001) กับหนอนปกติ 3 ชนิด หนอนกระทู้หอม (วัยที่ 1 อายุ 2 วัน) หนอนกระทู้ผัก (วัยที่ 2 อายุ 4 วัน) และ หนอนเจาะสมอฝ้าย (วัยที่ 3 อายุ 7 วัน) และ ตัวอย่างโปรโตซัว ชื่อย่อ P-SE-1, P-SL-1 และ P-HA-1 พบว่า การสกัดดีเอ็นเอวิธีการดัดแปลงของ Hunter-Fujita *et al.* (1998) และ Christian *et al.* (2001) นี้ไม่แสดงผลแถบดีเอ็นเอ เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ มาตรวจหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอบริสุทธิ์ตัวอย่าง และตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis จึงทำการดัดแปลงจากวิธีการของ Canning *et al.* (1999) และ Willians *et al.* (2008) สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างข้างต้น พบว่า สามารถสกัดดีเอ็นเอของหนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผักได้เท่านั้น ซึ่งจะต้องทำการดัดแปลงวิธีการในบางขั้นตอนต่อไป

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดจากลำดับเบสของดีเอ็นเอ

วางแผนดำเนินการต่อจากการสกัดดีเอ็นเอพร้อมทั้ง 20 ตัวอย่างแล้ว เนื่องจากต้องใช้ผลวิเคราะห์แต่ละชนิดเปรียบเทียบพร้อมกัน

สรุปผลการวิจัย

การดำเนินการทดลองวิจัยยังไม่เสร็จสิ้น ต้องทำการปรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอเพิ่มเติม เนื่องจากวิธีการที่ได้สกัดได้เพียง 2 ตัวอย่าง และทำการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมให้ครบจำนวนที่วางแผนไว้ เนื่องจากพบโปรโตซัวจากหนอนใยผักทำให้มีความหลากหลายเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Becnel, J. J. and T. G. Andreadis. 1999. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 447–501.
- Canning, E. U., A. Curry, S. Cheney, N. J. Lafranchi-tristem and M. A. Haque. 1999. *Vairimorpha imperfectan*, a microsporidian exhibiting an abortive octosporous sporogony in *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Parasitology** 119: 273-286.
- Choi, J.Y., J.G. Kim, Y.C. Choi, T.W. Goo, J.H. Chang, Y.H. Je and K.Y. Kim. 2002. *Nosema* sp. Isolated from Cabbage white butterfly (*Pieris rapae*) collected in Korea. **The J. of Microbiological** 40: 199-204.
- Didier, E. S., P. J. Didier, K. F. Snowden and J. A. Shadduck. 2000. **Microbes and Infection** 2: 709–720.

- Hatakeyama, Y. and S. Hayasaka. 2002. Specific Amplification of Microsporidian DNA Fragments Using Multiprimer PCR. **JARQ** 36 : 97 – 102.
- Hylis, M., Pilarska, D. K., Obornk, M., Vavra, J., Solter, L. F., Weiser, J., Linde, A., McManus, M. L. 2006. *Nosema chrysorrhoeae* n. sp. (Microsporidia), isolated from browntail moth (*Euproctis chrysorrhoea* L.) (Lepidoptera, Lymantriidae) in Bulgaria: Characterization and phylogenetic relationships. **J. Invertebr. Pathol.** 91: 105–114.
- Karacetin, E., D.J.Bruck and P.B. McEvoy. 2005. **Effect of a pathogen on host range of the Cinnabar Moth, *Tyria jacobaeae* (Arctiidae)**. International symposium on Biological control of Arthropods. September, 12-16 . Korea.
- Solter, L. F. and J. J. Becnel. 2000. **Field Manual of Techniques for the Evaluation of Entomopathogens**, pp. 231–254. Lacey, L. A. and Kaya, H. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Wang, C.Y., Solter, L.F., Huang, W. F., Tsai, Y.C., Chu-Fang Lo, C.F. and Wang, C.H. 2009. A new microsporidian species, *Vairimorpha ocinarae* n. sp., isolated from *Ocinara lida* Moore (Lepidoptera: Bombycidae) in Taiwan. **J. Invertebr. Pathol.** 100: 68–78.
- Williams, G.R., A. B.A. Shafer, R. E.L. Rogers, D. Shutler and D.T. Stewart. 2008. First detection of *Nosema ceranae*, a microsporidian parasite of European honey bees (*Apis mellifera*), in Canada and central USA. **J. Invertebr. Pathol.** 97 : 189-192.
- Wittner, M. and L. M. Weiss. 1999. **The Microsporidia and Microsporidiosis**. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.