การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สูตรต่างๆที่ผลิตด้วยวิธี Encapsulation

Study on Efficacy Improvement of Nucleopolyhedrovirus Formulations through Microencapsulation Techniques

สมชัย สุวงศ์ศักดิ์ศรี ภัทรพร สรรพนุเคราะห์ อิศเรส เทียนทัด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี สูตรต่างๆที่ผลิตด้วยวิธี Encapsulation โดยศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ต่อความทนทานแสงแดดของเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ทั้ง 3 ชนิด คือ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม, ไวรัส เอ็นพีวี หนอนกระทู้ผัก และ ไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย โดยใช้เชื้อไวรัสธรรมดาเปรียบเทียบกับ ไวรัสสำเร็จรูปที่ผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆแล้ว มาผสมกับน้ำกลั่นตามอัตราแนะนำ แล้วหยดสารละลายเชื้อไวรัส เอ็นพีวี ลงบน plate ปริมาณ plate ละ 5 มล. เกลี่ยเชื้อให้ทั่วด้วยแท่งแก้วสะอาด จำนวนชนิดละ 6 plate ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วแบ่ง plate ตัวอย่างละ 3 plate ไปวางกลางแจ้งให้รับแสงแดดตลอดวัน ส่วนที่เหลือไปวางในที่ร่มตลอดวัน เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ plate เหล่านี้มาละลายน้ำในอัตราส่วน 1:1 ไปทดสอบ Bioassay ด้วยวิธี Feeding Method กับหนอนทั้ง 3 ชนิดตามชนิดของเชื้อไวรัส โดยใช้หนอนวัย 3 จำนวน 30 ตัวต่อกรรมวิธี เปรียบเทียบกับ ไวรัสธรรมดา, ไวรัสสูตรสำเร็จ และน้ำกลั่น ขณะนี้อยู่ในระหว่างดำเนินการ

คำนำ

การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชมีความจำเป็นอย่างยิ่งในการรักษาปกป้องผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะต่อการเพิ่มผลผลิตเพื่อใช้บริโภคภายในประเทศและเพื่อส่งออก เนื่องจากเกษตรกรคุ้นเคยกับการใช้สารเคมีกำจัดแมลงมานานมากกว่า 30 ปี เพราะออกฤทธิ์รุนแรง และควบคุมความเสียหายจากแมลงศัตรูพืชได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ โดยไม่คำนึงถึงปัญหาที่ตามมา ซึ่งปัจจุบันพบว่าแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด สามารถสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง เป็นผลทำให้เกษตรกรต้องพ่นสารฆ่าแมลงบ่อยครั้งขึ้น ใช้ชนิดของสารฆ่าแมลงที่มีฤทธิ์รุนแรงมากขึ้นและใช้สารฆ่าแมลงหลายชนิดพ่นพร้อมๆ กันในคราวเดียว ก่อให้เกิดอันตรายต่อเกษตรกรผู้ใช้สารฆ่าแมลง และสารฆ่าแมลงเหล่านี้ยังเป็นพิษตกค้างบนผลิตผล เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค ส่งผลกระทบต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตร ปัจจุบันทุกฝ่ายได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารฆ่าแมลงที่มีต่อสุขภาพของประชากร ผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมและผลเสียต่อการส่งออกผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ ทั้งนี้งานค้นคว้าวิจัยจุลินทรีย์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช ได้ค้นคว้าวิจัยเพื่อนำจุลินทรีย์จาก

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-01-04-54

ธรรมชาติมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง โดยการค้นคว้าวิจัยเพื่อนำไวรัสชนิด Nucleopolyhedrovirus (NPV) ที่พบในประเทศไทยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดแมลงต่อไป จุลินทรีย์ชนิดดังกล่าวมีประสิทธิภาพสูง มีความเฉพาะเจาะจงสูงต่อแมลงเป้าหมาย จึงปลอดภัยต่อแมลงศัตรูธรรมชาติและแมลงที่มีประโยชน์ มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์และสิ่งแวดล้อมสูง โดยได้ผ่านการทดสอบจาก US Environmental Protection Agency ประเทศสหรัฐอเมริกา และเป็นที่ยอมรับในประเทศที่พัฒนาแล้วว่าไวรัส NPV เป็นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นหลักร่วมกับวิธีการป้องกันกำจัดอื่นๆ ที่เหมาะสมในระบบการจัดการศัตรูพืช (Integrated Pest Management) กรมวิชาการเกษตรได้มีนโยบายที่จะลดความเสี่ยงของประชาชน และลดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมจากสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยหาสิ่งทดแทนเพื่อลดการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยที่คุณภาพและผลผลิตไม่ลดลงและต้นทุนการผลิตไม่สูงขึ้น (กรมวิชาการเกษตร, 2542; Matthews,1984) แต่การใช้ไวรัสก็มีข้อจำกัดอยู่บางประการ โดยเฉพาะสภาพอากาศที่ร้อน มีแสงแดดโดยเฉพาะรังสียูวีที่เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการลดประสิทธิภาพของเชื้อ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามที่จะเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อให้คงทนต่อสภาพอากาศร้อนในบ้านเรา ด้วยการผสมสารเพิ่มฤทธิ์ชนิดต่างๆ รวมถึงเทคนิคการเคลือบอนุภาคด้วยสารเคมีป้องกันแสงยูวี เพื่อให้อนุภาคไวรัสอยู่ได้นานขึ้นในสภาพไร่ (อุทัย, 2537; Herbert,1999)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

วิธีการ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 การทดสอบความทนทานต่อรังสียูวี ของสูตรสำเร็จรูปของเชื้อไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย ทั้งชนิดสารละลายแขวนลอยและสูตรผงผสมน้ำ โดยทดสอบจากเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย

1. วางแผนการทดลองแบบ CRD 15 กรรมวิธี มี 3 ซ้ำ ดังนี้
   1. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Leucophur
   2. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Indian ink
   3. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Lignin sulphate
   4. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Methyl green
   5. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Molass
   6. สูตรสำเร็จรูปชนิดน้ำผสมสาร Yeast brewer
   7. สูตรสำเร็จรูปชนิดผงผสมสาร Leucophur

8. สูตรสำเร็จรูปชนิดผงผสมสาร Indian ink
9. สูตรสำเร็จรูปชนิดผงผสมสาร Lignin sulphate
10. สูตรสารละลายเชื้อไวรัสผสมสาร Methyl green
11. สูตรสารละลายเชื้อไวรัสผสมสาร Molass
12. สูตรสารละลายเชื้อไวรัสผสมสาร Yeast brewer
13. สูตรสารละลายเชื้อไวรัสไม่ผสมสารป้องกันรังสียูวี
14. เชื้อไวรัสมาตรฐาน (เชื้อสด)
15. Control

2. เตรียมอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนในภาชนะมีฝาปิดขนาดกลางจำนวน 180 ถ้วย ทำการเคลือบผิวหน้าอาหารเทียมด้วยเชื้อไวรัสตามกรรมวิธีทั้งหมด กรรมวิธีละ 12 ถ้วย โดยใช้อัตราความเข้มข้นเช่นเดียวกับอัตราที่แนะนำ (20 มล.ผสมน้ำ 20 ลิตร) ส่วน Control .ใช้น้ำกลั่นเคลือบอาหารเทียม

3. นำถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วไปเข้าตู้ทึบที่ติดหลอดรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 250-300 นาโนเมตร ให้ถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดผ่านรังสียูวีเป็นเวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชม. ตามลำดับ

4. นำถ้วยอาหารเทียมที่ผ่านรังสียูวีตามเวลาดังกล่าวไปทดสอบเลี้ยงหนอนกระทู้หอมวัยที่ 3 ถ้วยละ 10 ตัว ดูการตายของหนอนที่ 3, 5 ,7 และ 10 วัน ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 2 การผลิตสูตรสำเร็จรูปไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย

1. นำไวรัส เอ็น พี วี ของหนอนกระทู้หอม หนอนกระทู้ผัก และหนอนเจาะสมอฝ้าย ที่ผลิตได้จากโรงงานต้นแบบการผลิตไวรัส เอ็นพีวี ควบคุมแมลงศัตรูพืช กรมวิชาการเกษตร จำนวนชนิดละ 1.4 ลิตร ความเข้มข้น $1x10^9$ ผลึก/มล.แบ่งเป็น 7 ส่วน ส่วนละ 100 มล. นำไปผสมกับสารป้องกันรังสียูวีชนิดต่างๆในอัตราส่วน ดังนี้

1. ผสมสาร Leucophur ในอัตรา 5 %
2. ผสมสาร Indian ink ในอัตรา 5 %
3. ผสมสาร Lignin sulphate ในอัตรา 8.5 %
4. ผสมสาร Methyl green ในอัตรา 10 %
5. ผสมสาร Molass ในอัตรา 10 %
6. ผสมสาร Yeast brewer ในอัตรา 4%
7. ไม่ผสมสารป้องกันรังสียูวี

2. นำสารผสมที่ได้จากข้อ 1 นำไปผสมด้วยสารละลาย ethyl cellulose ในอัตรา 10 % เท่ากันทั้งหมด กวนให้เข้ากัน เพื่อให้อนุภาคไวรัสถูกห่อหุ้มคล้ายแคปซูล หลังจากนั้นจึงนำสารผสมนี้ไปผ่านเครื่องกรองที่จะคัดเฉพาะแคปซูลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-100 ไมโครเมตร

3. สารผสมที่ผ่านการกรองในข้อ 2 และสารละลายไวรัสที่ไม่ผสมสารป้องกันรังสียูวีในข้อ 1 นำแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน ส่วนที่ 1 บรรจุไว้ในขวดสีชา เก็บรักษาไว้ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 2 นำไปอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งภายใต้ความดันสูญญากาศ (Freeze dry) แล้วบรรจุเก็บไว้ในขวดสีชา เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน

4. ทำการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ กับหนอนทั้ง 3 ชนิด ดังนี้

4.1 โดยเตรียมอาหารเทียมสำหรับเลี้ยงหนอนในภาชนะมีฝาปิดขนาดปริมาตร 2 ออนซ์ แล้วเคลือบผิวหน้าอาหารเทียมด้วยผลิตภัณฑ์ที่เตรียมเสร็จแล้วในข้อ 3 ถ้วยละ 30 ไมโครมิลลิลิตร กรรมวิธีละ 30 ถ้วย โดยใช้อัตราความเข้มข้นเช่นเดียวกับอัตราที่แนะนำ ส่วน Control .ใช้น้ำกลั่นเคลือบผิวหน้าอาหารเทียม

4.2. นำถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดที่เตรียมเสร็จแล้วไปเข้าตู้ทึบที่ติดหลอดรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 250-300 นาโนเมตร ให้ถ้วยอาหารเทียมทั้งหมดผ่านรังสียูวีเป็นเวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชม. ตามลำดับ

4.3. นำถ้วยอาหารเทียมที่ผ่านรังสียูวีตามเวลาดังกล่าวไปทดสอบเลี้ยงหนอนทั้งสามชนิด วัยที่ 3 ถ้วยละ 1 ตัว กรรมวิธีละ 30 ถ้วย ดูการตายของหนอนที่ 3, 5 , 7 และ 10 วัน ตามลำดับ

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบสูตรสำเร็จรูปในสภาพไร่

นำเชื้อไวรัสที่ผลิตในขั้นตอนที่ 3 ไปทดสอบในสภาพไร่ในแปลงดาวเรือง และแปลงคะน้า เปรียบเทียบกับสูตรสำเร็จรูปที่ผลิตจำหน่ายแล้วในท้องตลาด วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 5 กรรมวิธี จำนวน 4 ซ้ำ โดยมีกรรมวิธีดังนี้

(1) ผสมสาร Titanium dioxide ในอัตรา 5 %

(2) ผสมสาร Lignin sulphate ในอัตรา 8.5 %

(3) ผสมสาร Methyl green ในอัตรา 10 %

(4) เชื้อไวรัส เอ็นพีวี สำเร็จรูป (BIO DOA v1, BIO DOA v2, BIO DOA v3)

(5) ไม่พ่นสารฆ่าแมลง

เตรียมแปลงดาวเรืองขนาด 3x5 ม. จำนวน 20 แปลงย่อย สำหรับทดสอบไวรัส เอ็นพีวี หนอนเจาะสมอฝ้าย เริ่มพ่นสารตามกรรมวิธีที่กำหนดเมื่อพืชออกดอกสม่ำเสมอ และพบหนอนเฉลี่ย 1 ตัวต่อต้น ฉีดพ่นพ่นในเวลาเย็นทุกสัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง โดยผสมสารจับใบทุกครั้ง สุ่มนับ 20 ดอกต่อแปลงย่อยก่อนพ่นสาร 1 วัน และหลังพ่นสารทุกสัปดาห์

และเตรียมแปลงคะน้า ขนาด 2x5 ม. จำนวน 20 แปลงย่อย สำหรับทดสอบไวรัสเอ็นพีวี หนอนกระทู้หอม และหนอนกระทู้ผัก เริ่มพ่นสารตามกรรมวิธีที่กำหนดหลังหว่านเมล็ดไปแล้ว 20 วัน หรือ เมื่อพบการระบาด ฉีดพ่นในเวลาเย็นทุกสัปดาห์ จำนวน 3 ครั้ง โดยผสมสารจับใบทุกครั้ง สุ่มนับแมลง 20 ต้นต่อแปลงย่อย ก่อนพ่นสาร 1 วัน และหลังพ่นสารทุกสัปดาห์

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนการตายของหนอนชนิดต่างๆ จากการทดสอบในแต่ละขั้นตอน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา : ตุลาคม 2553 – กันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการอาคารวิจัยและพัฒนาศัตรูธรรมชาติ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2542. นโยบายการอารักขาพืชของกรมวิชาการเกษตร. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

อุทัย เกตุนุติ. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอมด้วยเชื้อไวรัส. กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 16 หน้า.

Herbert B. Scher. 1999. Controlled-Release Delivery Systems for Pesticides. Marcel Dekker, Inc. new York. 329 pp.

Matthews, G.A. 1984. Pest management. Longman Inc. New York. 231 pp.