บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงด้วยวิธีศึกษาอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับแมลงเป็นสิ่งที่ยุ่งยาก ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียที่เกิดโรคกับแมลงส่วนใหญ่สามารถดำรงชีวิตได้อย่างอิสระในสภาพธรรมชาติ และมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีศักยภาพสูงสามารถทำลายแมลงได้ อัจฉรา (2544 ก) ได้ทำการตรวจสอบแบคทีเรียที่เกิดโรคกับแมลง 46 ชนิด (species) จำนวน 3,000 ตัวอย่าง พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นพวก facultative และแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของแมลงเท่านั้นที่เป็นตัวการสำคัญที่สามารถหยุดยั้งการเจริญเติบโตและกิจกรรมต่าง ๆ ของแมลง ซึ่งแบคทีเรียต้องเข้าสู่ภายในลำตัวของแมลงเท่านั้นจึงจะแสดงผลได้ โดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงส่วนใหญ่อยู่ในวงศ์ Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Terobacteriaceae, Streptococcaceae และ Micrococcaceae นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียในวงศ์ Mycoplasmataceae และ Spiroplasmataceae ที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากพบว่านอกจากจะสามารถเกิดโรคกับแมลง พืช และสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด แต่ทั้งนี้แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลง และได้รับความสนใจมากที่สุดคือแบคทีเรียวงศ์ Bacillaceae โดยเฉพาะสกุล *Bacillus*

ในปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยแบคทีเรียสกุล *Bacillus* พบว่า สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีที่สุด และพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของจุลินทรีย์ที่ควบคุมแมลงศัตรูพืช (microbial insecticide) ได้ เช่น เชื้อ *Bacillus sphaericus* สร้างสารพิษที่ผนังเซลล์ซึ่งเป็นพิษกับลูกน้ำยุงวงศ์ Culicidae เชื้อ *Bacillus popiliae* ทำให้เกิดโรคกับ Japanese beetle grub โดยเชื้อทำให้ตัวอ่อนของด้วงเป็นโรค มีลำตัวสีขาวขุ่นและตายในลักษณะที่เรียกว่า milky disease เชื้อ *Bacillu moritai* ทำให้เกิดโรคกับแมลงในอันดับ Diptera เช่น แมลงวันบ้าน เชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น หนอนใยผัก หนอนกระทู้หอม เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* จัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์โรคแมลงที่มีการค้นคว้ามากที่สุด และมีการผลิตนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดทั่วโลก คือ *Bacillus thuringiensis* เนื่องจากเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการค้นพบและได้แสดงศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมานานแล้วมีคุณลักษณะครบถ้วนทุกประการเหมาะกับการเป็น microbial insecticide

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.1 ลักษณะเฉพาะของ *Bacillus thuringiensis*

เชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* หรือเชื้อ Bt เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ในกลุ่ม endospore forming rods and cocci อยู่ในสกุล *Bacillus* วงศ์ Bacillaceae (ดวงพร, 2537) เซลล์มีรูปร่างแบบแท่ง ยาว 3-5 ไมครอน (Bajwa and Kogan, 2005) ถ้านำมาเลี้ยงบนจานเพาะเชื้อ ลักษณะโคโลนี (colony) มีสีขาวขุ่น ขนาดของโคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5-10 มิลลิเมตร) ผิวหน้าไม่เรียบและไม่เป็นมัน (อัจฉรา, 2544ข) เชื้อ Bt พบได้ทั่วไปในสภาพธรรมชาติ เช่น ในดิน ซึ่งตามปกติอยู่ในรูปของสปอร์ ถ้ามีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะเจริญเติบโตต่อไปอยู่ในระยะ vegetative นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้บนพืช ในน้ำ ในมูลสัตว์ (Porcar and Caballero, 2000) รวมทั้งในแมลงที่ตายแล้วหรือใกล้ตายอีกด้วย (Travers *et al*., 1987) แต่จากการศึกษาของ Theunis *et al*. (1998) พบว่า จะพบเชื้อ Bt พบอยู่ในดินมากที่สุด โดยเฉพาะในเนื้อดินที่มีอินทรีย์วัตถุสูง นอกจากดินที่เก็บรวบรวมจากแหล่งต่าง ๆ มักมีจำนวน Bt isolates แตกต่างกันอาศัยร่วมกันอย่างหลากหลาย ซึ่งดินในทวีปเอเชียจะมีจำนวน Bt isolates มากกว่าดินในทวีปอื่น ๆ (Martin and Travers, 1989)

Bt จัดเป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูง สามารถใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ (ตาราง 1) และแมลงสาธารณสุขบางชนิด ในอันดับ Lepidoptera เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกินใบปาล์ม เป็นต้น อันดับ Coleoptera เช่น ด้วงหมัดผัก และ อันดับ Diptera เช่น ยุง เป็นต้น (อัจฉรา, 2544ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 แมลงศัตรูพืชที่สำคัญที่สามารถใช้ Bt ในการป้องกันกำจัด (อัจฉรา, 2544ข)

แมลงศัตรูพืช	**พืชที่ถูกเข้าทำลาย**
หนอนใยผัก (diamondback moth, *Plutella xylostella*)	ผักวงศ์กะหล่ำ (กะหล่ำปลี คะน้า กะหล่ำดอก ผักกาดขาวปลี ผักกาดต่าง ๆ)
หนอนคืบกะหล่ำ (cabbage looper, *Trichoplusia ni*)	ผักวงศ์กะหล่ำ ผักกาดหอม ถั่วลันเตา
หนอนคืบละหุ่ง (castro semi-looper, *Achaea janata*)	ละหุ่ง พุทรา กุหลาบ ทับทิม
หนอนร่านกินใบปาล์ม (slug caterpillar, *Darna furva*, *D. diducta*)	ปาล์มน้ำมัน มะพร้าว
หนอนปลอก (bagworm, *Mahasena corbetti, Metisa plana*)	กล้วย มะพร้าว ปาล์มน้ำมัน
หนอนผีเสื้อขาว (cabbage white butterfly, *Pieris brassicae*)	ผักวงศ์กะหล่ำ
หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด (corn borer, *Ostrinia furnacalis*)	ข้าวโพด ทานตะวัน
หนอนกระทู้หอม (beet armyworm, *Spodoptera exigua*)	หน่อไม้ฝรั่ง องุ่น ข้าวโพดฝักอ่อน ถั่วลันเตา มะเขือเทศ กระเจี๊ยบเขียว ผักตระกูลกะหล่ำ กุหลาบ ดาวเรือง
หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*)	หน่อไม้ฝรั่ง องุ่น กระเจี๊ยบเขียว ถั่วลันเตา กุหลาบ ดาวเรือง ส้ม มะเขือเทศ
หนอนบุ้งกินใบ (leaf eating caterpillar, *Orgyia turbata*)	ปาล์ม ละหุ่ง ถั่วลิสง พุทรา หน่อไม้ฝรั่ง
หนอนกินใบบัว (leaf eating caterpillar, *Nymphula crisonalis*)	บัวต่าง ๆ
หนอนกินใบเผือก (leaf eating caterpillar, *Maduca quincuemaculata*)	เผือก ยาสูบ บอน ถั่ว
หนอนกินใบชมพู่ (leaf eating caterpillar, *Trabala vishnou*)	ชมพู่ ชมพู่สาแหรก ลำพู หูกวาง สะแก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

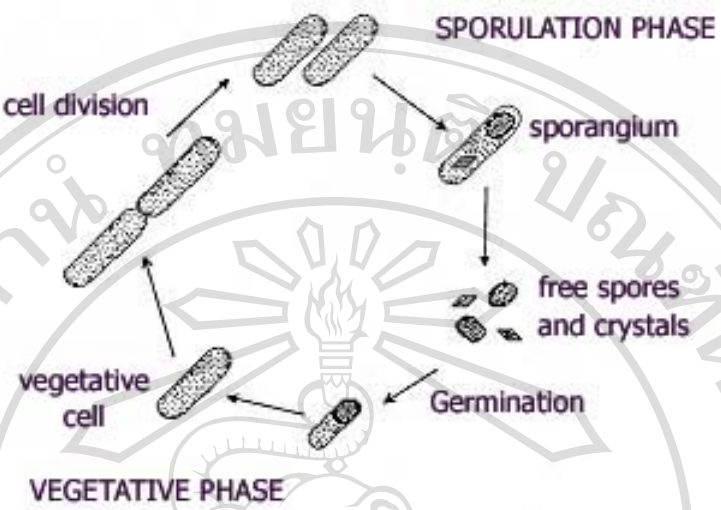
ตาราง 1 (ต่อ)

แมลงศัตรูพืช	พืชที่ถูกเข้าทำลาย
หนอนห่อใบหรือแปะใบส้ม (leaf roller, *Archips* sp.)	ส้มเขียวหวาน
หนอนกินใบสน (leaf eating aterpillar,*Metanastria latipennis*)	สนสามใบ สนจีน สนสองใบ กุหลาบ ท้อ

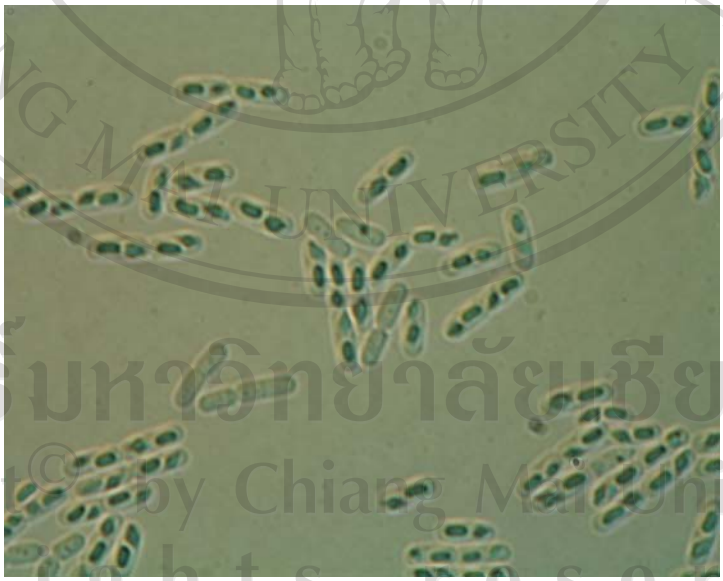
2.2 วงจรชีวิตของ *Bacillus thuringiensis*

ทิพย์วดี (2542) กล่าวว่า เมื่อเลี้ยง Bt บนจานเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อจะมีโคโลนีสีขาวขุ่น ผิวไม่มัน โคโลนีค่อนข้างใหญ่ ประมาณ 5-10 มิลลิเมตร Bt มีการเจริญเติบโตอยู่ 2 ระยะ คือ vegetative phase หรือ germination phase และ sporulation phase (ภาพ 1) โดยในระยะ vegetative สปอร์จะงอก (germination) เป็นเซลล์รูปแท่งเรียกว่า vegetative cell และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างทวีคูณ ได้เซลล์ที่ต่อกันเป็นสายยาวคล้ายโซ่ หลังจากนั้นอีกประมาณ 24-48 ชั่วโมง เชื้อ Bt จะเข้าสู่ระยะ sporulation ซึ่งระยะนี้จะปรากฏเมื่ออาหารหมดหรือสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เชื้อ Bt จะสร้างสปอร์ที่ปลายข้างหนึ่งของเซลล์ และสร้างผลึกโปรตีนที่ปลายอีกข้างหนึ่งของเซลล์ไปพร้อม ๆ กัน (ภาพ 2) และเมื่อเวลาผ่านไปอีกประมาณ 6-12 ชั่วโมง ผนังเซลล์ของเชื้อ Bt จะแตกปล่อยสปอร์และผลึกโปรตีนออกมาอยู่อย่างอิสระ โดยรูปร่างของผลึกโปรตีนมีหลายรูปแบบ เช่น รูปปิรามิด 2 อันที่มีด้านฐานชนกัน (bipyramid) (ภาพ 3) รูปทรงกลม (spherical) รูปสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (flat rhomboid) และรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส (cuboid) เป็นต้น และอาจสร้างผลึกจำนวนหนึ่งหรือสองอันต่อเซลล์ ทั้งนี้แล้วแต่สายพันธุ์ ผลึกโปรตีนนี้มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 27-140 กิโลดาลตัน (Hofte and Whiteley, 1989) และสปอร์นี้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ต่าง ๆ ได้ เช่น อุณหภูมิสูงหรือความแห้งแล้ง สปอร์จะงอกและเริ่มเข้าสู่ระยะ vegetative cell อีกครั้งเมื่ออยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมหรือเงื่อนไขที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 วงจรชีวิตของเชื้อ Bt (Wuhan, 2002)



ภาพ 2 ลักษณะเซลล์ของ Bt

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ก. ข.

ภาพ 3 สปอร์และผลึกโปรตีน (delta-endotoxin) ของเชื้อ Bt (อัจฉรา, 2544ข)

ก. สปอร์และผลึกโปรตีน ที่แตกจากเซลล์

ข. ภาพขยายผลึกโปรตีนรูปร่าง bipyramid 4,000x

2.3 สารพิษของ *Bacillus thuringiensis*

Bt จะมีการสร้างสารพิษได้หลายชนิดที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ subspecies (ตาราง 2) แต่ส่วนใหญ่แล้ว Bt สายพันธุ์ต่าง ๆ จะสร้างสารพิษหลัก ซึ่ง Wuhan (2002) ได้แบ่งสารพิษของ Bt ไว้ดังนี้

1) Alpha-exotoxin (α-exotoxin : อัลฟา-เอ็กโซท็อกซิน)

เป็นสารพิษที่ Bt สร้างขึ้นภายนอกเซลล์ เป็นสารเอ็นไซม์พวก lecithinase C ละลายน้ำได้ ไม่ทนต่อความร้อน ถ้าแมลงได้รับสารพิษชนิดนี้จะเจริญเติบโตช้าและไม่เข้าดักแด้ หรือถ้าเข้าดักแด้ก็จะไม่ออกเป็นตัวเต็มวัย ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1953 โดย Toumanoff (Wuhan, 2002)

2) Beta-exotoxin (β-exotoxin : เบต้า-เอ็กโซท็อกซิน)

สารพิษชนิดนี้มีด้วยกันหลายชื่อ เช่น thuringiensin, fly-toxin heat-stable, exotoxin, thermostable toxin เป็นต้น เป็นสารพิษที่สร้างขึ้นภายนอกเซลล์เช่นเดียวกัน แต่ทนต่อความร้อนได้สูงถึง 120 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ เป็นสารประกอบพวก nucleotide สร้างขึ้นระหว่างระยะ vegetative growth มีความเป็นพิษค่อนข้างสูงต่อแมลงในอันดับ Lepidoptera, Diptera และ Coleoptera เมื่อแมลงกินสารพิษชนิดนี้เข้าไปจะทำให้รูปร่างเปลี่ยนแปลง โดยพบการเปลี่ยนแปลงได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต เช่น ตัวอ่อนอาจไม่เข้าดักแด้ ถ้าเป็นดักแด้จะมีรูปร่างบิดเบี้ยว และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ถ้าเป็นตัวเต็มวัยก็จะไม่สมบูรณ์ ปีกแมลงจะคุด หรือแขน ขา หนวดแมลงจะหายไป วงจรชีวิตจะสั้นลงและไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ซึ่ง EPA ของสหรัฐอเมริกาไม่อนุญาตให้มีสารพิษชนิดนี้ในผลิตภัณฑ์ Bt ที่มีวางจำหน่ายเพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

3) Delta-endotoxin (δ-endotoxin : เดลต้า-เอ็นโดท็อกซิน)

เป็นสารพิษชนิดที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช มีด้วยกันหลายชื่อ เช่น crystal toxin, parasporal inclusion body และ insecticidal crystal protein (ICP) เป็นต้น ซึ่งสารพิษชนิดนี้เป็น proteinaceous crystal คือผลึกที่ประกอบไปด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีน ไม่ทนต่อความร้อน มีทั้งสารพิษและเอ็นไซม์ (enzyme) เกาะกันเป็นรูป dumbbell สารพิษของ Bt ถูกกำกับโดย plasmid ซึ่งทำให้ Bt แต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพแตกต่างกันออกไป (อัจฉรา, 2529)

4) Spores (สปอร์)

นักวิทยาศาสตร์บางท่านได้จัดสปอร์ให้อยู่ในกลุ่มของสารพิษด้วย เนื่องจากเมื่อสปอร์เข้าไปอยู่ในตัวหนอนแล้ว จะไปเจริญเติบโตแพร่ขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เพราะอวัยวะต่าง ๆ ในตัวหนอนเป็นอาหารอันอุดมสมบูรณ์ ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโลหิตเป็นพิษ (septicemia) และทำให้แมลงตายในที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อพบว่า delta-endotoxin เป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้แมลงตาย ความสำคัญของสปอร์ก็ลดน้อยลง (อัจฉรา, 2544 ข)

5) Vegetative insecticidal proteins (Vips)

โปรตีนสารพิษชนิดนี้จะถูกขับออกมาจากเซลล์ Bt ที่อยู่ในระยะ vegetative เป็นของเหลว ไม่มีการจับตัวกันในรูปของ parasporal crystal protein มีความเป็นพิษสูงต่อแมลงศัตรูข้าวโพด เช่น corn rootworm (*Diabrotica* spp.) และ black cutworm (*Agrotis ipsilon*) ปัจจุบันได้จำแนก Vips ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Vip1A, Vip2A และ Vip3A

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ตัวอย่าง Bt แต่ละ subspecies ที่ผลิตชนิดของ toxin (Wuhan, 2002)

Serotype	Subspecies	alpha exotoxin	beta exotoxin	delta endotoxin
1	*thuringiensis*	+	+	+
2	*finitimus*	+	-	+
3a	*alesti*	+	-	+
3a, 3b	*kurstaki*	+	-	+
4a, 4b	*sotto*	+	-	+
4a, 4b	*dendrolimus*	+	-	+
4a, 4c	*kenyae*	+	-	+
5a, 5b	*galleriae*	-	+	+
5a, 5c	*canadensis*	-	+	+
6	*subtoxicus*	-	-	+
6	*entomocidus*	-	-	+
7	*aizawai*	+	+	+
8a, 8b	*morrisoni*	-	+	+
8a, 8c	*ostriniae*	+	-	+
9	*tolworthi*	+	+	+
10	*darmstadiensis*	-	+	+
11a, 11b	*toumanoffi*	+	+	+
11a, 11c	*kyushuensis*	+	-	+
12	*thompsoni*	+	-	+
13	*pakistani*	+	-	+
14	*israelensis*	+	-	
15	*dakota*	+		
16	*indiana*	+		
-	*wuhanesis*	-	-	
17	*tohokuensis*	-		
18	*kumamotoensis*	+	+	
19	*tochigiensis*	+	-	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การจำแนกชนิด *Bacillus thuringiensis*

จากการค้นพบว่าผลึกโปรตีนถูกสร้างโดยยีนที่อยู่บน plasmids ของเชื้อ Bt ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมา (Deacon, 2005) ทำให้มีการรวบรวมเชื้อ Bt ที่อาศัยอยู่ตามแหล่งต่าง ๆ ทั่วโลกไว้ในห้องปฏิบัติการของหลายประเทศเพื่อทำการศึกษาวิจัยชนิด ขนาด และความเป็นพิษของผลึกโปรตีนที่เชื้อ Bt เหล่านี้สร้างขึ้นมา ทำให้ทราบว่าประสิทธิภาพของเชื้อ Bt ในการกำจัดแมลงเกิดจากผลึกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่เชื้อสร้างขึ้น ซึ่งเป็นพิษกับแมลงในอันดับ Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Homoptera และ Mallophaga (Beron *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อแมลงในอันดับ Hymenoptera อีกด้วย (Pinto *et al*., 2003) เนื่องจากมีการเก็บรวบรวมเชื้อ Bt ไว้เป็นจำนวนมาก จึงได้มีความพยายามที่จะจำแนกชนิดของเชื้อที่เก็บได้ ในระดับ subspecies โดยใช้คุณลักษณะของโปรตีน มี 2 รูปแบบ คือ

1. การใช้ H-serotype หรือ Flagella serotype

เป็นวิธีการจำแนก subspecies ที่ใช้แยกสารพิษของโปรตีนบน flagella เริ่มใช้ใน ปี ค.ศ. 1962 โดย de Barjac and Bennefoi ได้เสนอแนวทาง serotype โดยใช้ลักษณะของ H-antigen หรือ flaglla antigen (Lecadet, 1998) ซึ่งแต่ละ subspecies ของ Bt นั้น flagella จะประกอบด้วย โปรตีนที่เรียกว่า flagellin ที่มีลักษณะเฉพาะตัว มีความคงทน และมีความเสถียร ซึ่งแต่ละ subspecies จะมีลักษณะของ H-antigen แตกต่างกัน โดยอาศัยปฏิกิริยาของ antibody ต่อ H-antigen บน flagella ของเซลล์ในการจำแนกชนิดของเชื้อ ด้วยวิธีนี้ทำให้ในปัจจุบันสามารถจำแนกเชื้อ Bt ออกได้เป็น 67 สายพันธุ์ (Bajwa and Kogan, 2005) (ตาราง 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 การจำแนกชนิด *Bacillus thuringiensis* โดยใช้ลักษณะของ H-antigen (Bajwa and Kogan, 2005)

H-antigen	Subspecies	H-antigen	Subspecies
1	*thuringiensis*	16	*indiana*
2	*finitimus*	17	*tohokuensis*
3a, 3c	*alesti*	18a, 18b	*kumamotoensis*
3a, 3b, 3c	*kurstaki*	18a, 18c	*yosoo*
3a, 3d	*sumiyoshiensis*	19	*tochigiensis*
3a, 3d, 3e	*fukuokaensis*	20a, 20b	*yunnanensis*
4a, 4b	*sotto*	20a, 20c	*pondicheriensis*
4a, 4c	*kenyae*	21	*colmeri*
5a, 5b	*galleriae*	22	*shandongiensis*
5a, 5c	*canadensis*	23	*japonensis*
6	*entomocidus*	24a, 24b	*neoleonensis*
7	*aizawai*	24a, 24c	*novosibirsk*
8a, 8b	*morrisoni*	25	*coreanensis*
8a, 8c	*ostriniae*	26	*silo*
8b, 8d	*nigeriensis*	27	*mexicanensis*
9	*tolworthi*	28a, 28b	*monterrey*
10a, 10b	*darmstadiensis*	28a, 28c	*jegathesan*
10a, 10c	*londrina*	29	*amagiensis*
11a, 11b	*toumanoffi*	30	*medellin*
11a, 11c	*kyushuensis*	31	*toguchini*
12	*thompsoni*	32	*cameroun*
13	*pakistani*	33	*leesis*
14	*israelensis*	34	*konkukian*
15	*dakota*	35	*seoulensis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 (ต่อ)

H-antigen	Subspecies	H-antigen	Subspecies
36	*malaysiensis*	52	*kim*
37	*anadalousiensis*	53	*asturiensis*
38	*oswaldocruzi*	54	*poloniensis*
39	*brasiliensis*	55	*palmanyolensis*
40	*huazhongensis*	56	*rongseni*
41	*sooncheon*	57	*pirenaica*
42	*jinghongiensis*	58	*argentinensis*
43	*guiyangiensis*	59	*iberica*
44	*higo*	60	*pingluorisis*
45	*roskildiensis*	61	*sylvestriensis*
46	*chanpaisis*	62	*zhaodongensis*
47	*wratislaviensis*	63	*bolivia*
48	*balearica*	64	*azorensis*
49	*muju*	65	*pulsiensis*
50	*navarrensis*	66	*graclosensis*
51	*xiaguangiensis*	67	*vazensis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. Crystal serotype

โดยการใช้ crystal protein เป็นแนวการจำแนก subspecies ของ Bt (Hofte and Whiteley, 1989) ซึ่งใช้ลักษณะของความเป็นพิษอย่างเฉพาะเจาะจงต่ออันดับของแมลงและคุณสมบัติของโมเลกุลผลึกโปรตีนเป็นแนวทางในการจำแนก ซึ่งในระยะแรกที่ได้มีการค้นพบผลึกโปรตีนจากเชื้อ Bt จำนวนไม่มาก จึงได้มีการจำแนกชนิดของผลึกโปรตีนที่มีพิษต่อแมลงออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

CryI	มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนในอันดับ Lepidoptera ได้แก่ CryIA(a), CryIA(b), CryIA(c), CryIB, CryIC, CryID, CryIE และ CryIF
CryII	มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนในอันดับ Lepidoptera และ Diptera ได้แก่ CryIIA, CryIIB และ CryIIC
CryIII	มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนในอันดับ Coleoptera ได้แก่ CryIIIA
CryIV	มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนในอันดับ Diptera ได้แก่ CryIVA, CryIVB, CryIVC และ CryIVD
CryV	มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหนอนในอันดับ Lepidoptera และ Coleoptera
cytolytic protein	ได้แก่ CytA และ CytB

ความแตกต่างของ crystal protein แต่ละชนิดต้องศึกษาคุณสมบัติหลายประการ ดังเช่น crystal protein ของ CryI และ CryII แสดงในตาราง 4 และโปรตีนของ crystal หรือการผลิตสารพิษที่สร้างโดย Bt สายพันธุ์ต่าง ๆ (อัจฉรา, 2544 ก; WHO, 1997) แบ่งเป็น 5 รูปร่าง คือ

- ผลึกแบบ bipyramid
- ผลึกแบบ amorphous
- ผลึกแบบ cuboid
- ผลึกแบบ flat-shape หรือ flat rhomboid
- ผลึกแบบ spherical

ต่อมาในปี ค.ศ. 1993 มีการตั้ง “Bt delta-endotoxin nomenclature committee” ขึ้นโดยมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงการตั้งชื่อ (nomenclature) จากแนวทางของ Hofte and Whiteley เนื่องจากได้มีการค้นพบชนิดของผลึกโปรตีนของ Bt ชนิดใหม่ ๆ เพิ่มขึ้นตลอดเวลา ทำให้แบ่งแยกชนิดของผลึกโปรตีนที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันได้ยาก วิธีใหม่นี้ใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างผลึกโปรตีนและเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นแนวทางในการจำแนก และจำแนกกลุ่มผลึกโปรตีนโดยใช้เลขอารบิคแทนเลขโรมันตามแบบ molecular

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

classification เช่น CryIAa เปลี่ยนเป็น Cry1Aa และเมื่อพบกลุ่มใหม่จะเพิ่มจำนวนเลขขึ้นไปเรื่อย ๆ ส่วนโปรตีน Cyt หรือ cytolytic protein มีกลุ่ม A, B หรือ C ซึ่งแยกออกเป็นกลุ่มย่อยตามคุณสมบัติความเป็นพิษและลำดับของนิวคลีโอไทด์เช่นกัน ทำให้สามารถจำแนกโปรตีนที่คล้ายคลึงกันมากออกจากกันหรือให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ โดยมีการจัดกลุ่มของผลึกโปรตีนออกเป็น 4 rank คือ primary rank, secondary rank, tertiary rank และ quaternary rank (Crickmore *et al*., 1998) ซึ่งผลึกโปรตีนที่อยู่ใน rank เดียวกันจะมีผลต่อแมลงในอันดับเดียวกัน ปัจจุบันมีการจำแนกเป็น 51 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ Cry1-Cry49 และ Cyt1-Cyt2 (ตาราง 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ความแตกต่างระหว่าง crystal protein (Wuhan, 2002)

Parameter	**CryI**	**CryII**
Toxicity	Lepidoptera	Lepidoptera and Diptera
Gene	CryI (several Subgroup : A(a), A(b), A(c), B, C, D, E, F, G)	CryII (subgroup A, B)
Mol. of protoxin	55,000 – 70,000 dalton	62,000 dalton
Shape of inclusion body	Bipyramid	Cuboid
Solubility	pH 10-12 (+ reducing agent)	pH 10-12
Percentage of total crystalline inclusion	70-90	10-30
Serology	Mobility toward (+)	Mobility toward (-)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 ชนิดของ Crystal protein ของ *Bacillus thuringiensis* (Crickmore *et al*., 2005)

Name	Old name	Name	Old name
1 Cry1Aa	CryIA(a)	26 Cry1Gb	CryH2
2 Cry1Ab	CryIA(b)	27 Cry1Gc	
3 Cry1Ac	CryIA(c)	28 Cry1Ha	PrtC
4 Cry1Ad	CryIA(d)	29 Cry1Hb	
5 Cry1Ae	CryIA(e)	30 Cry1Ia	CryV
6 Cry1Af		31 Cry1Ib	CryV
7 Cry1Ag		32 Cry1Ic	
8 Cry1Ah		33 Cry1Id	
9 Cry1Ai		34 Cry1Ie	
10 Cry1Ba	CryIB	35 Cry1If	
11 Cry1Bb	ET5	36 Cry1Ja	ET4
12 Cry1Bc	PEG5	37 Cry1Jb	ET1
13 Cry1Bd	CryE1	38 Cry1Jc	
14 Cry1Be		39 Cry1Jd	
15 Cry1Bf		40 Cry1Ka	
16 Cry1Bg		41 Cry1La	
17 Cry1Ca	CryIC	42 Cry2Aa	CryIIA
18 Cry1Cb	CryIC(b)	43 Cry2Ab	CryIIB
19 Cry1Da	CryID	44 Cry2Ac	CryIIC
20 Cry1Db	PrtB	45 Cry2Ad	
21 Cry1Ea	CryIE	46 Cry2Ae	
22 Cry1Eb	CryIE(b)	47 Cry3Aa	CryIIIA
23 Cry1Fa	CryIF	48 Cry3Ba	CryIIIB
24 Cry1Fb	PrtD	49 Cry3Bb	CryIIIBb
25 Cry1Ga	PrtA	50 Cry3Ca	CryIIID

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5 (ต่อ)

Name	Old name	Name	Old name
51 Cry4Aa	CryIVA	76 Cry9Ea	
52 Cry4Ba	CryIVB	77 Cry9Eb	
53 Cry5Aa	CryVA(a)	78 Cry9Ec	
54 Cry5Ab	CryVA(b)	79 Cry9Ed	
55 Cry5Ac		80 Cry10Aa	CryIVC
56 Cry5Ba		81 Cry11Aa	CryIVD
57 Cry6Aa	CryVIA	82 Cry11Ba	Jeg80
58 Cry6Ba	CryVIB	83 Cry11Bb	
59 Cry7Aa	CryIIIC	84 Cry12Aa	CryVB
60 Cry7Ab	CryIIICb	85 Cry13Aa	CryVC
61 Cry8Aa	CryIIIE	86 Cry14Aa	CryVD
62 Cry8Ba	CryIIIG	87 Cry15Aa	34kDa
63 Cry8Bb		88 Cry16Aa	cbm71
64 Cry8Bc		89 Cry17Aa	cbm72
65 Cry8Ca	CryIIIF	90 Cry18Aa	CryBP1
66 Cry8Da		91 Cry18Ba	
67 Cry8Ea		92 Cry18Ca	
68 Cry8Fa		93 Cry19Aa	Jeg65
69 Cry8Ga		94 Cry19Ba	
70 Cry9Aa	CryIG	95 Cry20Aa	
71 Cry9Ba	CryIX	96 Cry21Aa	
72 Cry9Bb		97 Cry21Ba	
73 Cry9Ca	CryIH	98 Cry22Aa	
74 Cry9Da		99 Cry22Ab	
75 Cry9Db		100 Cry22Ba	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

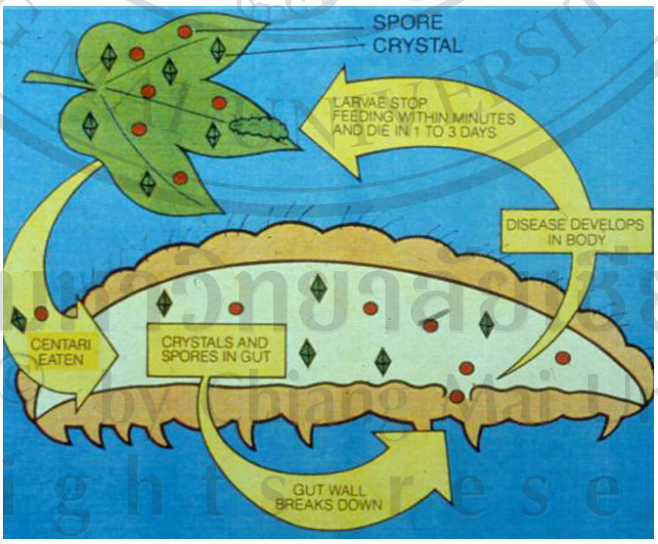
ตาราง 5 (ต่อ)

Name	Old name	Name	Old name
101 Cry23Aa		127 Cry37Aa	
102 Cry24Aa	Jeg72	128 Cry38Aa	
103 Cry24Ba		129 Cry39Aa	
104 Cry25Aa	Jeg74	130 Cry40Aa	
105 Cry26Aa		131 Cry40Ba	
106 Cry27Aa		132 Cry41Aa	
107 Cry28Aa		133 Cry41Ab	
108 Cry29Aa		134 Cry42Aa	
109 Cry30Aa		135 Cry43Aa	
110 Cry30Ba		136 Cry43Ba	
111 Cry30Ca		137 Cry44Aa	
112 Cry31Aa		138 Cry45Aa	
113 Cry32Aa		139 Cry46Aa	
114 Cry32Ba	CryE6L	140 Cry46Ab	
115 Cry32Ca	CryE6Q	141 Cry47Aa	
116 Cry32Da	CryE6S	142 Cry48Aa	p135
117 Cry33Aa		143 Cry49Aa	p49
118 Cry34Aa		144 Cyt1Aa	CytA
119 Cry34Ab		145 Cyt1Ab	CytM
120 Cry34Ac		146 Cyt1Ba	
121 Cry34Ba		147 Cyt1Ca	
122 Cry35Aa		148 Cyt2Aa	CytB
123 Cry35Ab		149 Cyt2Ba	CytB
124 Cry35Ac		150 Cyt2Bb	
125 Cry35Ba		151 Cyt2Bc	CytMed
126 Cry36Aa		152 Cyt2Ca	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 กลไกการเกิดพิษของ *Bacillus thuringiensis*

ผลึกโปรตีนของ Bt ซึ่งเป็นสารพิษที่นำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชมีด้วยกันหลายชื่อ เช่น crystal toxin, crystal protein, parasporal inclusion body, insecticidal crystal protein, Cry protein และ delta-endotoxin (Beron *et al*., 2005) ประกอบด้วยกลุ่มโมเลกุลของโปรตีนเกาะกันเป็นรูป dumbbell ซึ่งมีโครงสร้างที่จำเพาะต่อรีเซพเตอร์ของเซลล์เป้าหมายต่าง ๆ ของแมลงอาศัย (ช่อฟ้า, 2536) เมื่อผลึกโปรตีนเข้าไปอยู่ในลำไส้ส่วนกลางของแมลงที่มีสภาพเป็นด่าง คือมีค่า pH ประมาณ 8.9 หรือมากกว่านั้น จะเกิดการย่อยสลายของผลึกโปรตีนและกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลโดยน้ำย่อย proteolytic ของแมลง กลายเป็นสารพิษซึ่งเรียกว่า activated toxin (อัจฉรา, 2544ก) สารพิษนี้จะทำให้เกิดรูที่ epithelium cell ในลำไส้ส่วนกลางของเหลวที่อยู่ในลำไส้จะไหลออกตามรอยแผลไปอยู่ที่ช่องว่างภายในลำตัวของแมลง ส่งผลให้แรงดัน osmotic ของระบบเลือดเสียสมดุล แมลงเป็นอัมพาต เคลื่อนไหวไม่ได้ นอกจากนี้สารพิษทำให้เซลล์ผนังลำไส้และกระเพาะอาหารบวมและแตกออก เป็นเหตุให้แมลงหยุดกินอาหารและตายในที่สุด (Alcamo, 1994) สปอร์ที่แมลงกินเข้าไปจะขยายพันธุ์อยู่ที่กระเพาะ และบางส่วนจะเข้าไปตามรอยแผล แบ่งตัวอยู่ในระบบเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุของโลหิตเป็นพิษ (septicemia) ในที่สุดแมลงจะตาย (ภาพ 4)



ภาพ 4 กลไกการเกิดพิษของ Bt ในตัวแมลง (Wuhan, 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การสร้างผลึกโปรตีนของเชื้อ Bt ถูกควบคุมด้วยยีนต่าง ๆ กัน ดังนั้น Bt แต่ละสายพันธุ์จะสร้างผลึกโปรตีนที่เป็นสารพิษต่างชนิดกัน และมีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงต่างชนิดกันอีกด้วย (Dulmage, 1981) ซึ่งใน Bt บางสายพันธุ์มีการสร้างผลึกโปรตีนได้หลายชนิด จากการศึกษาของ Aronson *et al*. (1986) พบว่า เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีน 2 ชนิดขึ้นไปในการสร้างผลึกโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อ Bt และเชื้อ Bt สายพันธุ์เดียวกันแต่เก็บรวบรวมมาจากแหล่งต่างกันสามารถสร้างผลึกโปรตีนได้ต่างชนิดกันได้ ทำให้เชื้อ Bt จากแหล่งต่าง ๆ มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้แตกต่างกันด้วย

ปัจจุบันเชื้อแบคทีเรีย *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 เป็นสายพันธุ์ที่มีการใช้ประโยชน์มากที่สุด เพราะมีความเป็นพิษต่อหนอนผีเสื้อมากกว่า 100 ชนิด (Porcar and Caballero, 2000) แต่เชื้อ Bt สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมหนอนกระทู้หอมและหนอนผีเสื้อในสกุล *Spodoptera* หลายชนิด ซึ่งมีเชื้อ Bt บางสายพันธุ์ที่สามารถควบคุมหนอนกระทู้หอมได้ผล เช่น สายพันธุ์ *kenyae, darmstadiensis, gallieriae* และ *aizawai* เนื่องจากเชื้อ Bt สายพันธุ์เหล่านี้มียีน *cry*1C และ *cry*1E ที่สามารถผลิตผลึกโปรตีนที่มีความเป็นพิษต่อหนอนกระทู้หอมได้ (Chang *et al*., 1998) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Visser *et al*. (1990) ที่พบว่า ผลึกโปรตีน Cry1E มีความเป็นพิษเฉพาะเจาะจงต่อหนอนกระทู้หอม นอกจากนี้ Bajwa and Kogan (2005) พบว่า ประสิทธิภาพในความเป็นพิษต่อแมลงจะเพิ่มขึ้นถ้าเชื้อ Bt นั้นมีผลึกโปรตีนอยู่ด้วยกันหลายชนิด และปัจจัยอีกประการหนึ่งที่ส่งเสริมให้เกิดความเป็นพิษต่อแมลงได้มากยิ่งขึ้น นั่นคือ การที่หนอนได้รับสปอร์และผลึกโปรตีนเข้าไปพร้อมกัน (Moar, 1996) แต่อย่างไรก็ตาม หนอนกระทู้หอมยังมีความสามารถสร้างความต้านทานต่อผลึกโปรตีนสารพิษได้ ถ้าในกรณีที่ผลึกโปรตีนนั้นเป็น single Cry protein ซึ่งจากการศึกษาของ Moar (1996) พบว่า หนอนกระทู้หอมสามารถสร้างความต้านทานต่อผลึกโปรตีน Cry1Ca ได้ และเมื่อผ่านไปอย่างน้อย 12 รุ่น (generation) ความต้านทานนั้นจะอยู่ถาวรภายในประชากรไม่สูญหายไป จากความรู้และข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวทำให้นักวิจัยจากหลายประเทศทำการศึกษารวบรวมเชื้อ Bt จากแหล่งต่าง ๆ เพื่อให้ได้ Bt สายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตผลึกโปรตีนได้หลายชนิด และมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงได้หลากหลายไปพร้อมกัน ดังเช่นจากการศึกษาของ Lee *et al*. (2001) พบว่า Bt ที่แยกออกจากดินในประเทศสาธารณรัฐเกาหลีบาง isolate มีการสร้างผลึกโปรตีนขึ้นหลายชนิด มีความเป็นพิษสูง ต่อหนอนกระทู้หอมและรวมทั้งลูกน้ำยุง *Culex pipiens* ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved