บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของอาหารเทียม และวัสดุเพาะ ชนิดต่างๆ ต่อการเจริญการสร้างสปอร์ และ ระดับความสามารถ ในการก่อโรคของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 กับเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Mizus persicae*) (Hemiptera: Aphididae)

4.1.1 ผลของอาหารเทียมต่อความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย

เชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 เป็นชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่พบในท้องถิ่นอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งได้รับการคัดเลือกจากการวิจัยเรื่องการประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมและความรุนแรงในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* (Entomophthorales: Entomo phthoraceae) ซึ่งใช้ประโยชน์ใน การควบคุมเพลี้ยอ่อนศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำอย่างยั่งยืน ซึ่งได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2555 – 2556 เนื่องจากเป็นไอโซเลทที่ก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนผักและเพลี้ยอ่อนยาสูบ ได้สูงสุดคือ 99.13 $\pm$ 0.87 และ 99.12 $\pm$ 1.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษาดังกล่าว ได้ใช้อาหาร SDAY เป็นอาหารเทียมสำหรับการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเนื่องจากสามารถผลิตสปอร์ของเชื้อนาได้ในปริมาณสูงสุด (22.25 $\pm$ 1.10 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) (รุ่งเกียรติ และศมาพร, 2557, 65 หน้า) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาต่อยอด โดยทดสอบผลของอาหารเทียมซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA) และ Nutrient Agar (NA) โดยวัดระดับความสามารถในการก่อโรคเป็นเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Percent Cumulative Mortality –PCM) ของเพลี้ยอ่อนซึ่งมีความสำคัญต่อการปลูกพืชผักวงศ์กะหล่ำและพืชปลูกอีกหลายชนิดได้แก่ เพลี้ยอ่อนผัก และเพลี้ยอ่อนยาสูบ ในสภาพห้องปฏิบัติการที่ปรับให้เหมาะสมต่อการก่อโรคของเชื้อเพิ่มขึ้นคือ สภาพอุณหภูมิ 20 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืดความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ ผลปรากฏว่าค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนแต่ละชนิดที่ได้รับเชื้อซึ่งเพาะเลี้ยงบนอาหารเทียมที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนผักโดยรวมอยู่ระหว่าง 37 – 100 และ เฉลี่ยรวม 59.60 – 75.19 เปอร์เซ็นต์ โดยค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนผักที่ได้รับเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เลี้ยงบนอาหาร SDAY มีค่าสูงสุดคือ 97.00 $\pm$ 4.53 เปอร์เซ็นต์ และค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนผัก ที่ได้รับเชื้อที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MAE มีค่าต่ำสุดคือ 44.80 $\pm$ 6.05 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้สามารถแบ่งระดับความสามารถในการก่อโรคออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ ระดับต่ำได้แก่ *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA และ NA ระดับปานกลางได้แก่เชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA และที่ก่อโรคได้ในระดับสูงได้แก่เชื้อ

ราที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDAY ส่วนการทดสอบกับเพลี้ยอ่อนยาสูบ พบว่าเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนชนิดนี้ในสภาพห้องปฏิบัติการอยู่ที่ 39 – 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยรวมคือ 60.06 – 75.13 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการวิเคราะห์สถิติ (p= 0.01) ชี้ว่าอาหารแต่ละชนิดมีผลต่อระดับความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกัน ทั้งนี้เชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDAY ก่อโรคต่อเพลี้ยอ่อนชนิดนี้ได้สูงสุดคือ 95.00 $\pm$ 5.52 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อ *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MEA ก่อโรคได้ต่ำที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเป็น 49.00 $\pm$ 5.52 และ 43.40 $\pm$ 3.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.1)

4.1.2 ผลของวัสดุเพาะต่อการเจริญของเส้นใย การสร้างสปอร์ และความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมาย

จากการศึกษาในสภาพอุณหภูมิ 20 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด ความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์ การเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนวัสดุเพาะที่หาได้ในท้องถิ่น และเตรียมได้อย่างง่าย ได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก และข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ พบว่าการเจริญของเส้นใยและการสร้างสปอร์ของเชื้อรานี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดย *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 สามารถเจริญได้บนข้าวสวย และ ข้าวเปลือก ไม่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการเจริญของเส้นใยเป็น 0.40 $\pm$ 0.03 และ 0.38 $\pm$ 0.07 มิลลิเมตรต่อวันตามลำดับ และพบว่าเชื้อราสามารถเจริญได้ดีที่สุดบนเมล็ดข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ ในอัตรา 0.65 $\pm$ 0.08 มิลลิเมตรต่อวัน ส่วนปริมาณการสร้างสปอร์บนวัสดุเพชนิดต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 6 – 25 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ค่าเฉลี่ยรวมเป็น 16.20 $\pm$ 5.34 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีสามารถแบ่งกลุ่มตามความแตกต่างทางสถิติได้ในแบบเดียวกันกับการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใย และ มีค่าเป็น 14.40 $\pm$ 1.67 12.20 $\pm$ 5.11 และ 22.02 $\pm$ 2.09 สปอร์ต่อมิลลิเมตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

การศึกษาผลของวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนในเป้าหมายซึ่งมีตัวชี้วัดคือค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนในเป้าหมายที่ได้รับเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยวัสดุเพาะแต่ละชนิด พบว่าค่า PCM ของเพลี้ยอ่อนผักที่ได้รับเชื้อราซึ่งเพิ่มปริมาณในวัสดุเพาะชนิดต่างกันมีความแตกต่างกัน ที่ความเข้มข้น 18 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่า PCM รวมอยู่ระหว่าง 45 – 100 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแบ่งออกได้เป็นสองกลุ่มได้แก่เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวยและข้าวเปลือก (68.20 $\pm$ 5.35 และ 56.60 $\pm$ 10.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) และ เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยเมล็ด ข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ กล่าวคือเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยข้าวฟ่างสามารถก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผักได้สูงสุดคือ 96.60 $\pm$ 4.97 เปอร์เซ็นต์ *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยวัสดุเพาะที่แตกต่างกันสามารถก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนยาสูบ ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.01) โดยมีค่า PCM ระหว่าง 53 – 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าเฉลี่ยรวมเป็น 78.00 $\pm$ 16.02 เปอร์เซ็นต์ แนวโน้ม

เช่นเดียวกับกรณีของการทดสอบกับเพลี้ยอ่อนผัก กล่าวคือสามารถแบ่งระดับความสามารถของการก่อโรคกับแมลงเป้าหมายออกเป็นสองกลุ่ม ได้แก่ *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพิ่มปริมาณด้วยข้าวสวยและข้าวเปลือก และกลุ่มที่สองคือที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ โดยกลุ่มที่หนึ่งมีค่า PCM เท่ากับ 76.80 $\pm$ 7.39 และ 64.40 $\pm$ 11.71 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ซึ่งเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยเมล็ดข้าวฟ่างเลี้ยงสัตว์ให้ค่า PCM สูงสุดคือ 94.80 $\pm$ 6.90 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Cumulative Percent Mortality-PCM) 5 วัน ของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Mizus persicae*) (Hemiptera: Aphididae) ที่สารแขวนลอยสปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 18 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ

ชนิดของอาหารเทียม	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 5 วัน	
	เพลี้ยอ่อนผัก	เพลี้ยอ่อนยาสูบ
Potato Dextrose Agar	67.00$\pm$9.21a	69.60$\pm$3.28a
Sabouraud Dextrose Agar	76.00$\pm$3.39a	76.60$\pm$2.07b
Supplemented with Yeast Extract	97.00$\pm$4.53b	95.00$\pm$5.52c
Malt Extract Agar	44.80$\pm$6.05c	43.40$\pm$3.50d
Nutrient Agar	54.20$\pm$8.58c	54.40$\pm$3.97e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยการเจริญของเส้นใย และปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนวัสดุเพาะชนิดต่างๆ ในสภาพห้องปฏิบัติการ ที่อุณหภูมิ 20 ± 2 องศาเซลเซียส ในสภาพมืด และความชื้นสัมพัทธ์ 80 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของอาหารเทียม	ค่าเฉลี่ยการเจริญและการสร้างสปอร์	
	การเจริญของเส้นใย (มม. ต่อ วัน)	ปริมาณการสร้างสปอร์ (สปอร์ ต่อ มล^2)
ข้าวสวย	0.40 ± 0.03a	14.04 ± 1.67a
ข้าวเปลือกนึ่งสุก	0.38 ± 0.07a	12.20 ± 5.11a
ข้าวฟ่างอาหารสัตว์	0.65 ± 0.08b	16.20 ± 5.34b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Cumulative Percent Mortality-PCM) 5 วัน ของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) และเพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Mizus persicae*) (Hemiptera: Aphididae) ที่สารแขวนลอยสปอร์ที่ระดับความเข้มข้น 18 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของเชื้อรา *Pandora neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ซึ่งเพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะชนิดต่างๆ

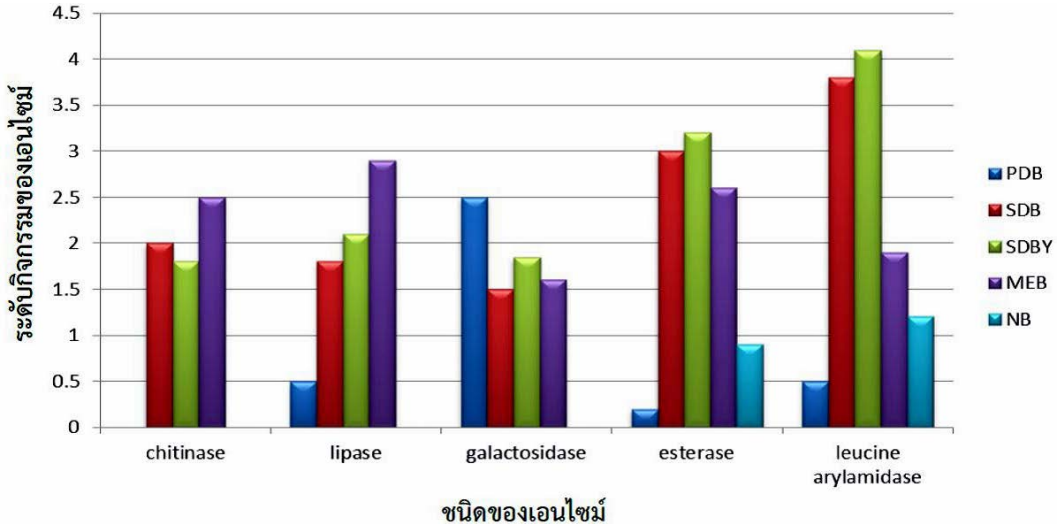
ชนิดของอาหารเทียม	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 5 วัน	
	เพลี้ยอ่อนผัก	เพลี้ยอ่อนยาสูบ
ข้าวสวย	68.20 ± 5.35a	76.80 ± 7.39a
ข้าวเปลือกนึ่งสุก	56.60 ± 10.73b	62.40 ± 11.71b
ข้าวฟ่างอาหารสัตว์	96.60 ± 4.97c	94.80 ± 6.90c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยตัวอักษรต่างกันหมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4.2 ผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105

4.2.1 ผลของอาหารเทียมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105

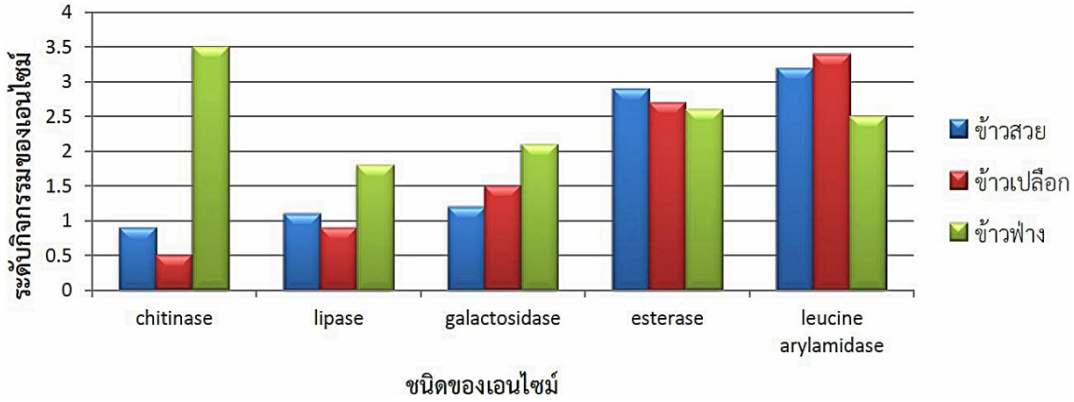
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 บนอาหารเทียม (ชนิดเหลว) แบบต่างๆ ได้แก่ Potato Dextrose Broth (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB), Nutrient Broth (NB) และตรวจหาการสร้างเอ็นไซม์ protease ของเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ตามวิธีซึ่งดัดแปลงจาก Kucera (1971, pp. 211-215) พบว่าในการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบผลในการสกัดเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการปรับปรุงวิธีการศึกษาในขั้นตอนนี้โดย การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในภาพรวมของเชื้อรานี้โดยใช้ชุดทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities และพบว่า เชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดที่ต่างกันมีการสร้างเอนไซม์หลายชนิด ได้แก่ Chitinase, lipase, galactosidase, esterase และ leucine arylamidase ในระดับกิจกรรมที่แตกต่างกัน กล่าวคือสามารถพบกิจกรรมของเอนไซม์ chitinase และ lipase ได้ดีที่สุดในอาหาร MEB ส่วนอาหารเทียมที่เชื้อสามารถผลิต eaterase และ leucine arylamidase คือ SDAY ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเลี้ยงด้วย SDA อนึ่งแม้ว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDB จะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ที่กล่าวมาข้างต้น แต่ก็พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ galactosidase นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วย NB สามารถผลิตเอนไซม์ได้เพียงสองชนิดคือ esterase และ leucine arylamidase ในระดับกิจกรรมที่ไม่สูงมากนัก (ภาพที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดที่ต่างๆ ได้แก่ Potato Dextrose Broth (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB) และ Nutrient Broth (NB)

4.2.2 ผลของวัสดุเพาะต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105

เชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์หลายชนิดในวัสดุเพาะเลี้ยงต่างๆ ซึ่งได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือกของข้าวหอมมะลินึ่ง และ ข้าวฟ่าง ที่เติมอาหาร Sabouraud Dextrose Broth (SDB) และจากการวัดกิจกรรมของเอ็นไซม์ด้วยชุดทดสอบ API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities พบว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้ในประมาณที่แตกต่างกัน กล่าวคือเอนไซม์ที่สามารถตรวจพบได้โดยชุดทดสอบได้แก่ Chitinase, lipase, galactosidase, esterase และ leucine arylamidase โดยเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase lipase และ galactosidase ได้สูงสุดเมื่อเพาะด้วยข้าวฟ่าง ผลิต eaterase ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวย และ ผลิต leucine arylamidase ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยข้าวเปลือก ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะชนิดที่ต่างๆ ได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก และข้าวฟ่าง

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์

จากการกำหนดวิธีการศึกษาความสัมพันธ์ระกว่างระดับความสามารถในการก่อโรคต่อแมลงในเป้าหมายของเชื้อรา *P. neoaphidis* ไอโซเลท Pd105 กับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ทั้งในกรณีที่ทดสอบกับเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียม และวัสดุเพาะ ที่แตกต่างกัน ซึ่งกำหนดไว้ตามวัตถุประสงค์ของการวิจัย แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบผลในการแยกเอนไซม์ดังกล่าวได้เพียงพอสำหรับการศึกษาและได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีการโดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM® – Semiquantitation of enzymatic activities ซึ่งสามารถตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ในภาพรวมของเอนไซม์หลากหลายชนิด ดังนั้นข้อมูลดังกล่าวจึงไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ระดับความสำพันธ์กับระดับความสามารถในการก่อโรคได้เนื่องจากผลดังกล่าวมิได้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่มีผลโดยตรงต่อระดับความสามาระในการก่อโรค ดังนั้นการศึกษาส่วนนี้ควรมีการปรับปรุงวิธีการสกัดเอนไซม์เฉพาะชนิด เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ต่อไป