ร่าง รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความรุนแรงในการก่อโรคและพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่เป็นผลมาจากอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน (ระยะที่ 2)

Virulence and genetic at molecular level of indigenous strain of *Beauveria bassiana* effected by artificial and mass production medias usage for sustainable insect control (Phase two)

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

ดร.ศมาพร แสงยศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

Created with nitroPDF professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ความรุนแรงในการก่อโรคและพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่เป็นผลมาจากอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน (ระยะที่ 2)

Virulence and genetic at molecular level of indigenous strain of *Beauveria bassiana* effected by artificial and mass production medias usage for sustainable insect control (Phase two)

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร

ดร.ศมาพร แสงยศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณแผ่นดินด้านการวิจัย ปีงบประมาณ 2556)

Created with nitroPDF professional

download the free trial online at nitropdf.com/professional

หัวข้อวิจัย	ความรุนแรงในการก่อโรคและพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่เป็นผลมาจากอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน (ระยะที่ 2)
ผู้ดำเนินการวิจัย	รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และ ดร. ศมาพร แสงยศ
ที่ปรึกษา	-
หน่วยงาน	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต กรุงเทพฯ และหลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่
ปี พ.ศ.	2557

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารเทียม ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) และวัสดุเพาะเชื้อได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข ต่อการเจริญและ ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillenim (Ascomycota: Hypocreales) ไอโซเลท 01 (Bbs01) รวมทั้งตรวจสอบปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในระดับโมเลกุล ในระดับลักษณะปรากฏ (phenotypic level) พบว่าเส้นใยของเชื้อรา Bbs01 เจริญได้ดีที่สุดบนอาหาร NA (3.04 $\pm$ 0.17 มิลลิเมตรต่อวัน) ในขณะที่สร้างสปอร์ได้ปริมาณสูงสุดบนอาหาร SDA (8.80 $\pm$ 0.55 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และเชื้อราสามารถก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi*, (Hemiptera: Aphididae) ด้วงหมัดผัก *Phyllotreta sinuate,* (Coleoptera: Chrysomelidae) และ หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) ได้ในระดับสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงบน SDAY โดยมีค่าเฉลี่ยการตายสะสม 7 วัน (Percent Cumulative Mortality - PCM) เท่ากับ 94.20 $\pm$ 4.02, 71.4 $\pm$ 3.85 และ 79.00 $\pm$ 1.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในระดับชีวโมเลกุล (Molecular biological level) การตรวจสอบพันธุกรรมด้วยวิธี RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs) และ acrylamide gel electrophoresis แสดงให้เห็นว่าชนิดของอาหารเทียม และ วัสดุเพาะไม่มีผลต่อแบบชนิดพันธุกรรม (genotypic level) ของเชื้อรานี้ ในขณะที่ผลการศึกษาด้านเอนไซม์ พบว่าเชื้อรา Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมและ/ หรือ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน มีการผลิตเอนไซม์ protease แตกต่างกัน (p=0.01) โดยการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการก่อโรคกับแมลงเป้าหมายบางชนิด แปรผันตามระดับการผลิตเอนไซม์ protease ส่วนผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ชี้ให้เห็นว่าอาหารเทียม และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา Bbs01 คือ SDAY และ อาหารสุนัขตามลำดับ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Research Title:	Virulence and genetic at molecular level of indigenous strain of *Beauveria bassiana* affected by artificial and mass production media usage for sustainable insect control (Phase two)
Researchers:	Rungkiat Kawpet and Dr. Samaporn Saengyot
Research Consultants:	-
Organization:	Faculty of Science and Technology, Suan Dusit Rajabhat University, Bangkok and Plant Protection Program, Faculty of Agricultural Production, Mae Jo University, Chiang Mai
Year:	2014

The objective of this study is to evaluate the effects of artificial media comprising of Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) and Water Agar (WA), and sterilized mass production media consisting of cooked rice, unmilled rice, sorghum seed and dog feed on growth, virulence and molecular characteristics of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillenim (Acomycota: Hypocreales) isolate 01 (Bbs01). The studies showed that NA gave highest growth rate (3.04 $\pm$ 0.17 mm. per day) while SDAY induced highest sporulation (8.80 $\pm$ 0.55 spore per ml.). The fungus cultured on SDAY was highest at 7 days Percent Cumulative Mortality (PCM) to aphids, *Lipaphis erysimi* (Hemiptera: Aphididae), flea beetle, *Phyllotreta sinuata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) averaging 94.20 $\pm$ 4.02, 71.4 $\pm$ 3.85 and 79.00 $\pm$ 1.58 percent respectively. The molecular biological studies, DNA fingerprinting and enzymatic studies based on RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs), and acrylamide gel electrophoresis were conducted. Neither the artificial nor mass production media affected Bbs01's genetic stability while the artificial or mass production media affected protease enzyme associated with the virulence of Bbs01 ($p=0.01$). Correlation study indicated that pathogenicity of the fungus increased with protease enzymatic activity. According to the correlation analysis, it could be concluded that SDAY and dog feed were suitable for respective artificial and mass production media of Bbs01.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาความรุนแรงในการก่อโรคและพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่นที่เป็นผลมาจากอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณสำหรับใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน (ระยะที่ 2) ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ประเมินผลสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา ที่ให้ความเอื้อเฟื้อในการแนะนำและอำนวยความสะดวก

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ให้ความอนุเคราะห์เวลาและสนับสนุนวัสดุอุปกรณ์ สถานที่ รวมทั้งการประสานงาน

ขอขอบพระคุณ หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ที่สนับสนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.บรรพต ณ ป้อมเพชร ผู้ก่อตั้งและที่ปรึกษาศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตรวจประเมิน แก้ไข จนรายงานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

และขอขอบพระคุณ หน่วยงาน เจ้าของสถานที่ บุคคล ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัย แต่มิได้เอ่ยนามมา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

2557

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		ข
กิตติกรรมประกาศ		ค
สารบัญ		ง
สารบัญตาราง		ฉ
สารบัญภาพ		ช
บทที่ 1 บทนำ		1
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3	กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
1.4	ขอบเขตการวิจัย	4
1.5	ข้อจำกัด	5
1.6	สมมุติฐานการวิจัย	5
1.7	คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	6
1.8	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	8
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		10
2.1	การใช้เชื้อราโรคแมลงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช	10
2.2	เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillenim (Ascomycota: Hypocreales)	12
2.3	ปัจจัยที่เกี่ยวกับความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลง	16
2.4	กรอบแนวคิดในการวิจัย	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย		23
3.1	การคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	23
3.2	การศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อระดับความรุนแรงของการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	26
3.3	การศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นต่อพันธุกรรมของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	30

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

3.4	ผลของชนิดอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อความสามารถในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 (ตัวชี้วัดเชิงคุณภาพ)	31
3.5	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ protease	33
3.6	เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ	34
บทที่ 4 ผลการวิจัย		37
4.1	การคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	37
4.2	ผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อระดับความรุนแรงในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชโดยเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	41
4.3	ผลของอาหารเทียมในระดับโมเลกุลและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	46
4.4	การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน ต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ protease	50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ		55
5.1	สรุปผลการวิจัย	55
5.2	อภิปรายผล	56
5.3	ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้	58
5.4	ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป	59
บรรณานุกรม		
	บรรณานุกรมภาษาไทย	60
	บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	60
ภาคผนวก		65
	ภาคผนวก ก สูตรอาหารเทียมที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	66
ประวัติผู้วิจัย		

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	อัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ	38
4.2	ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ	38
4.3	เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	40
4.4	ปริมาณสปอร์สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อราบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	40
4.5	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	43
4.6	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	43
4.7	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	44
4.8	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	44
4.9	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	45
4.10	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร	45
4.11	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเจริญบนอาหารเทียมชนิดต่างๆ	49
4.12	ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเจริญบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ	50

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	กลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราโรคแมลง	11
2.2	ลักษณะอาการมัสคาดีนสีขาวของแมลงที่ตายจากการติดเชื้อรา *Beauveria bassiana* (ก) ภาพขยายของกลุ่มก้านชูสปอร์ของเชื้อราที่เจริญออกจากตัวแมลง (ข) และ ลักษณะรูปร่างสปอร์ของเชื้อ	13
2.3	ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	14
2.4	ขั้นตอนซึ่งเซลล์ของผนังลำตัวของแมลงถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อราโรคแมลงอย่างช้าๆ ทำให้ผนังลำตัวส่วนที่ถูกย่อยสลายของแมลงค่อยเสียสภาพและบางลงตามลำดับจากภาพ ก – จ	19
2.5	ผลการจำแนกยีน CDEP-1 ซึ่งควบคุมการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ด้วยวิธี PCR; เลนที่ 1 ตัวชี้วัดยีน CDEP-1 เลนที่ 2-7 ตัวอย่างเอนไซม์ที่ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท	20
2.6	การพบเอนไซม์ chitinase SDS-PAGE ที่ผลิตจากเชื้อรา โดยการตรวจด้วยวิธี PCR; แถบที่ 1, anion-exchange chromatography บน DEAE-cellulose column; แถบที่ 2, gel filtration chromatography บน Ultragel AcA54 column; แถบที่ 3, ammonium sulfate precipitation; แถบที่ 4, ตัวชี้วัดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Bio-Rad), ได้แก่ rabbit phosphorylase *b* (น้ำหนักโมเลกุล 97,4000), bovine serum albumin (น้ำหนักโมเลกุล 66,200 Da), rabbit actin (น้ำหนักโมเลกุล 43,000 Da), bovine carbonic anhydrase (น้ำหนักโมเลกุล 31,000 Da) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100 Da)	20
2.7	ผลการจำแนกลำดับเบสจากยีน CDEP-1 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* จากฐานข้อมูลของ The European Nucleotide Archive (ENA)	21
3.1	Neubaure hemocytometer ที่ใช้ในการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	24
3.2	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนผักเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	26
3.3	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงด้วงหมัดเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	28
3.4	ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01	29

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ผลผลิต RAPD-PCR ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (M) และพันธุกรรมของ *B. bassiana* กลุ่มที่หนึ่งซึ่งมีพันธุกรรมไม่แตกต่าง ได้แก่ เชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้จาก Potato Dextrose Agar (PDA) (1), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (2), Potato Dextrose Agar (PDA) (3), Malt Extract Agar (MEA) (4) และ Nutrient Agar (NA) (5) ตามลำดับ โดย M หมายถึงตัวชี้วัดขนาดโมเลกุล ตั้งแต่ 500-1000 คู่เบส	46
4.2	ผลผลิต RAPD-PCR ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (M) และ พันธุกรรมของ *B. bassiana* กลุ่มที่หนึ่งซึ่งมีพันธุกรรมไม่แตกต่าง ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จาก ข้าวสวย (1) ข้าวเปลือก (2) ข้าวฟ่าง (3) และ อาหารสุนัข (4) ตามลำดับ โดย M หมายถึงตัวชี้วัดขนาดโมเลกุล ตั้งแต่ 500-1000 คู่เบส	47
4.3	ผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis โดยใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง แถบที่ 1 คือ protein marker ส่วนแถบที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 คือโปรตีนที่สกัดจากเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA) และ Nutrient Agar (NA) ตามลำดับ	48
4.4	ผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis โดยใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง แถบที่ 1 คือ protein marker ส่วนแถบที่ 2, 3, 4 และ 5 คือโปรตีนที่สกัดจากเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข ตามลำดับ	49
4.5	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*)	51

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สารบัญภาพ

4.6	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*)	52
4.7	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)	52
4.8	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*)	53
4.9	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*)	53
4.10	กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา Beauveria bassiana ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)	54

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillenim (Ascomycota: Hypocreales) เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลง ที่มีการนำมาศึกษาและใช้ประโยชน์เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืชมากที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากเชื้อดังกล่าวสามารถทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด เช่น แมลงในอันดับ Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera และ Coleoptera (Tanada and Kaya, 1993) ทั้งนี้มีรายงานว่ามีการนำเชื้อราชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในรูปแบบยาเชื้อ (microbial insecticides) ให้ผลดีในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น หนอนเจาะลำต้นข้าวโพดยุโรป European corn-borers, *Ostrinia nubilalis* (Lewis *et al*., 1996, pp. 387-393) และในปัจจุบันเชื้อราชนิดนี้หลายไอโซเลท ได้ถูกพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ (formulations) เพื่อจำหน่ายเป็นการค้า เช่น ไอโซเลท Bb147 ที่แยกได้จาก *O. nubilalis* ซึ่งได้มีการแนะนำให้ใช้ควบคุมหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดเอเชีย Asiatic corn borer (*O. furnacalis*) หนอนเจาะเมล็ดกาแฟ ด้วงเจาะเมล็ดกาแฟ (coffee berry borer) หนอนด้วงสีขาวกินราก (white grubs) หนอนเจาะสมอฝ้าย (bollworm) หนอนกระทู้ (cutworm) เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper) ในชื่อทางการค้า เช่น Bio-Power, Beauverin, Boverol, Boverosil, Naturalis-O, Naturalis-T และ Back-off (Copping, 2009, 702 pp.) แต่อย่างไรก็ตาม สูตรสำเร็จทางการค้าที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ยังไม่เป็นที่แพร่หลายและยังมีส่วนแบ่งการตลาดในตลาดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชไม่มากนัก อีกทั้งอาจยังมีราคาแพงเกินไป ไม่เหมาะต่อการนำมาใช้โดยเกษตรกรที่มีรายได้น้อย ดังนั้นในการนำเชื้อราโรคแมลงมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในหลายประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนา จึงมีการนำไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งพบในท้องถิ่นมาใช้ โดยใช้วัสดุเพาะเลี้ยงขยายปริมาณเท่าที่จะสามารถหาได้ในท้องถิ่นนั้นๆ (Lopez-Llorca *et al*., 1999, pp. 325-333; Sahayaraj and Namasivayam, 2008, pp. 1907-1910; Posada-Flores, 2008) ส่วนในประเทศไทยเอง ได้มีความพยายามศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งพบในท้องถิ่นประเทศไทย โดยใช้วัสดุเพาะเลี้ยงที่สามารถหาได้จากท้องถิ่นด้วยเช่นกัน (Saengyot and Napompeth, 2007, 7 pp.)

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อรา ที่นำมาใช้ประโยชน์ในรูปยาเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแปลงเพาะปลูก ได้แก่ ความรุนแรง (virulence) หรือความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) และ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อม (environmental tolerance) เช่น แสง อุณหภูมิ และความชื้น ของเชื้อรา ซึ่งโดยมากได้รับอิทธิพลโดยตรงจากแบบชนิดพันธุกรรม (genotypes) (Butt *et al*., 2001, 390 pp.) นอกจากนั้นยังมีรายงานอีกว่าอาหารเทียม (artificial media) มีอิทธิพลต่อความรุนแรงของ *B. bassiana* และอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อด้วย (Rodríguez-Gómez *et al*., 2009, pp. 513-518) จากข้อมูลส่วนนี้ ทำให้เกิดคำถามคือ ถึงแม้ว่าเชื้อราโรคแมลงไอโซเลทท้องถิ่นนั้นๆ จะถูกคัดเลือกนำมาใช้ประโยชน์

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

เนื่องจากสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ดีในระดับห้องปฏิบัติการ อีกทั้งสามารถสร้างสปอร์ได้ในปริมาณมากพอในวัสดุเพาะเลี้ยงบางชนิด แต่เป็นไปได้ที่ความรุนแรงของเชื้ออาจลดลงเนื่องมาจากผลของอาหารเทียมหรือวัสดุเพาะเลี้ยงที่นำมาใช้ ทั้งนี้ตัวชี้วัดทางชีววิทยาระดับโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระดับความรุนแรงของเชื้อราโรคแมลงอย่างหนึ่งได้แก่ การผลิตเอนไซม์ (Butt *et al*., 1998, pp. 149-169; Wang *et al*., 2002, pp. 251-255; Gillespie *et al*., 1998, pp. 128 - 137) ซึ่งเชื่อมโยงกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ ดังนั้นหากชนิดของวัสดุเพาะเลี้ยง มีผลต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์ และ/ หรือ ลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราแล้ว นอกจากจะมีผลกระทบต่อการนำไปใช้ประโยชน์โดยทั่วไปเท่านั้น แต่ยังอาจมีผลต่อเนื่อง ไปถึงเรื่องของการคุ้มค่าต่อการลงทุน ในแง่เศรษฐศาสตร์อีกด้วย หากมีการนำเชื้อที่ผลิตในอาหารเทียมที่ไม่เหมาะสมอย่างแท้จริงไปพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อเป็นการค้า

โครงการวิจัยนี้ เป็นการต่อยอดการศึกษาของคณะผู้วิจัยซึ่งมีการคัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* ที่พบในท้องถิ่น เพื่อการใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2552 โดยพบว่า *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนผัก หนอนใยผัก และหนอนกระทู้ผัก (รุ่งเกียรติ และ ศมาพร, 2549, หน้า 375) และในปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 ได้รับการจัดสรรทุนวิจัยเพื่อศึกษาความรุนแรงในการก่อโรค และพันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่น ที่เป็นผลมาจากอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ สำหรับใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างยั่งยืน ซึ่งในปีงบประมาณ 2555 ได้มีการคัดเลือกชนิดของวัสดุเพาะเลี้ยง ที่เหมาะสมต่อการนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยพิจารณาจากตัวชี้วัด ทั้งในเชิงปริมาณของลักษณะภายนอกของเชื้อรา คือความสามารถในการเจริญ การผลิตสปอร์ รวมทั้งศึกษาระดับความสัมพันธ์ระหว่างตัวชี้วัดเชิงปริมาณดังกล่าวกับวัสดุเพาะเลี้ยง ซึ่งเชื่อมโยงกับตัวชี้วัดเชิงคุณภาพ คือระดับความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อด้วย และเพื่อการนำไปสู่ แนวทางการนำทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่แล้ว มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและคุ้มต่อการลงทุน ดังนั้นการหาข้อสรุปที่ชัดเจน เกี่ยวกับความสัมพันธ์ และผลกระทบของวัสดุเพาะ ต่อความสามารถในการผลิต (productivity) และความรุนแรงของเชื้อ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อยอดในปีงบประมาณ 2556 นี้ ซึ่งคือ การศึกษาปัจจัยในระดับชีวโมเลกุลที่มีผลต่อการก่อโรคของเชื้อ ซึ่งได้แก่ปริมาณการผลิตเอนไซม์ และลักษณะพันธุกรรมของเชื้อรานี้ ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้ในปีที่ดำเนินการนี้ ได้มีการนำไปเชื่อมโยงกับผลที่ได้รับจากการศึกษาในปี 2555 เพื่อนำมาซึ่งข้อสรุปรวมทั้งเป็นข้อมูลยืนยันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ทั้งระดับการเจริญที่แสดงออก (phenotype) และระดับชีวโมเลกุล มีผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพ และความสำเร็จในการควบคุมประชากรของแมลงศัตรูพืชของเชื้อราชนิดนี้ และทำให้สามารถระบุชนิดของอาหารเทียม และวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการนำเชื้อราสายพันธุ์ท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ ซึ่งล้วนแต่จะมีผลต่อความสำเร็จของการนำไปใช้ประโยชน์ทั้งในรูปแบบของการเพิ่มปริมาณโดยใช้วัสดุเพาะเลี้ยง และ การพัฒนาสูตรสำเร็จที่มีคุณภาพอีกด้วย นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อรา ซึ่งได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือรหัสพันธุกรรม อาจจะได้รับการเก็บรวบรวม ไว้ในฐานข้อมูลของลำดับเบสของยีนใน Gene Bank, National Center for Biotechnology

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Information (NCBI) European Molecular Biology Laboratories (EMBL), Nucleotide Sequence Database และ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และอาจร่วมเป็นส่วนหนึ่งของการจัดทำ DNA Barcode ซึ่งเป็นเครื่องมือใหม่ทางอนุกรมวิธานระดับชีวโมเลกุล ภายใต้โครงการ *"การริเริ่มรหัสแถบของสิ่งมีชีวิต"* (Barcode of Life Initiative – BOLI) ภายใต้อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity - CBD) ในอนาคตด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษานี้ทั้งหมดเป็นโครงการวิจัย 2 ปีคือปี พ.ศ. 2555 และ 2556 และ วัตถุประสงค์ที่สอดคล้องกับระยะเวลาและงบประมาณที่ได้รับการจัดสรรคือ

1. เพื่อคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมปริมาณประชากรของแมลงศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ โดยพิจารณาจากตัวชี้วัดเชิงปริมาณ โดยใช้ตัวชี้วัดเป็นการเจริญเติบโต
2. เพื่อคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมปริมาณประชากรของแมลงศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ โดยพิจารณาจากตัวชี้วัดเชิงปริมาณ โดยใช้ตัวชี้วัดเป็นความสามารถในการก่อโรคแก่แมลงเป้าหมาย 3 ชนิดได้แก่ เพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) และหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)
3. เพื่อศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นที่มีต่อปัจจัยควบคุมความรุนแรงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับโมเลกุล เช่นปริมาณการผลิตเอนไซม์ และลักษณะพันธุกรรม
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยง ที่มีต่อตัวชี้วัดเชิงปริมาณและระดับชีวโมเลกุลคือการผลิตเอนไซม์ เพื่อแสดงถึงรายละเอียดปัจจัยความรุนแรง และที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่ได้รับจากชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงนั้น
5. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยง ที่มีต่อตัวชี้วัดเชิงปริมาณและคุณภาพในระดับการแสดงออก (phenotypic levels) และระดับพันธุกรรม (genotypic level) เพื่อแสดงถึงรายละเอียดปัจจัยความรุนแรง และที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่ได้รับจากชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงนั้น

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

1.3 กรอบแนวคิดในการวิจัย

การเกษตรในปัจจุบัน นอกจากที่จะเน้นการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ และสิ่งแวดล้อม ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชแล้ว ยังให้ความสำคัญกับการนำทรัพยากรในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์เพื่อลดการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งนำสู่ความพอเพียงในระบบการเกษตร ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 6 ที่เกี่ยวกับการทำการเกษตรเพื่อความยั่งยืน มุ่งเน้นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร และเพิ่มผลิตภาพการผลิตเพื่อพัฒนาศักยภาพสินค้าเกษตรที่สร้างรายได้หลักจากการส่งออกและสร้างรายได้ให้กับชุมชน รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่และการพัฒนาคุณภาพสินค้า มาตรฐานสินค้า ตลอดจนความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety) ของนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) (คณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2554, 90 หน้า)

การนำเชื้อราโรคแมลงมาใช้ในรูปแบบของยาเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเป็นเชื้อราโรคแมลงที่มีประวัติอันยาวนานควบคู่ไปกับการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ (Microbial control) (Tanada and Kaya, 1993, 666 pp.) ซึ่งปัจจุบันได้มีความพยายามนำมาใช้ในรูปยาเชื้อ (microbial insecticides) แบบต่างๆ ไปจนถึงการพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ (formulations) เพื่อใช้เป็นการค้า (Copping, 2009, 702 pp.) ทว่าในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย เกษตรกรส่วนใหญ่ยังมีรายได้ต่ำ บางรายอาจไม่สามารถใช้ยาเชื้อสูตรสำเร็จซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก เนื่องจากยาเชื้อสูตรสำเร็จเหล่านั้นยังมีส่วนแบ่งการตลาดที่ยังน้อยอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะนำเชื้อราที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นภายในประเทศ มาใช้ประโยชน์โดยการนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยวิธีที่เหมาะสมอีกทั้งสามารถใช้วัสดุเพาะที่ราคาไม่แพงและสามารถหาได้ในท้องถิ่น ที่เอื้อประโยชน์สูงสุดต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและการก่อโรคต่อแมลงเป้าหมาย (Lopez-Llorca *et al*., 1999, pp. 325-333; Saengyot and Napompeth, 2009, 7 pp.) และในการที่จะคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมอย่างแท้จริงเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการนำมาใช้นั้น นอกจากวิธีวัดแบบชนิดพันธุกรรมหรือจีโนไทป์ที่แสดงออกโดยตรง เช่น อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณการสร้างสปอร์แล้ว การวัดทางอ้อมในระดับชีวโมเลกุล เช่นปริมาณการผลิตเอนไซม์ และหรือความเปลี่ยนแปลงของลักษณะพันธุกรรมของเชื้อ นับเป็นวิธีการที่สามารถช่วยอธิบายสาเหตุ หรือปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลงซึ่งอาจสามารถนำมาพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบยั่งยืนต่อไปได้

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ในปีแรก (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2555) ของโครงการวิจัยนี้มีขอบเขตตั้งแต่คัดเลือกชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเป็นไอโซเลทท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชบางชนิด โดยพิจารณาจากตัวชี้วัดในทางตรง ด้านปริมาณซึ่งได้แก่อัตราการเจริญและ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ปริมาณการผลิตสปอร์ ความสามารถในการก่อโรค ซึ่งพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การตายสะสม และค่าเฉลี่ยเวลาถึงการตายของแมลงที่ทดสอบ เช่นเพลี้ยอ่อนผัก เป็นต้น หลังการเพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน และด้านคุณภาพซึ่งได้แก่ความสามารถในการก่อโรค แบบชนิดพันธุกรรม และความคงที่ของลักษณะพันธุกรรมในระดับโมเลกุลก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ส่วนในปีที่สอง (ปีงบประมาณ พ.ศ. 2556) หากพบว่าอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงใดมีผลกระทบต่อความรุนแรงหรือพันธุกรรมของเชื้อราดังกล่าว ทางคณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษารายละเอียดของปัจจัยความรุนแรงของ เชื้อราที่ได้รับผลกระทบจากอาหารดังกล่าว เช่น ปริมาณและอัตรากิจกรรมการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีผลต่อความสามารถในการก่อโรค และความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างแบบชนิดพันธุกรรมซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงไปหลังการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมหรือวัสดุเพาะเลี้ยงบางชนิด และการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราดังกล่าว

1.5 ข้อจำกัด

ในการวิจัยครั้งนี้ในปีแรกของโครงการฯ ซึ่งมีระยะเวลาตามกำหนดซึ่งถ้าจะสามารถนำผลการศึกษามาสังเคราะห์เพื่อใช้ประโยชน์ หรือต่อยอดการศึกษา จำเป็นต้องดำเนินการต่อเนื่องอย่างน้อย 2 ปีงบประมาณ ดังนั้นผลในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งมีระยะเวลาและงบประมาณสำหรับหนึ่งปีงบประมาณ จึงได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์ซึ่งได้แก่ การคัดเลือกชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยพิจารณาจากตัวชี้วัดในทางตรง ด้านปริมาณซึ่งได้แก่อัตราการเจริญและปริมาณการผลิตสปอร์ ความสามารถในการก่อโรค และด้านคุณภาพ ซึ่งได้แก่ความสามารถในการก่อโรคและความคงที่ของแบบชนิดพันธุกรรมในระดับโมเลกุลก่อนและหลังการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ รวมทั้งในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง รวมทั้งข้อมูลที่จำเป็นเพื่อนำไปศึกษาในระดับชีวโมเลกุล เช่นปริมาณการผลิตเอนไซม์ และความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะที่แสดงออกทั้งในระดับทั่วไป ระดับชีวโมเลกุล และ แบบชนิดพันธุกรรม ในปีที่สองของการวิจัย

1.6 สมมติฐานการวิจัย

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพ ความสำเร็จ และความคุ้มค่าต่อการนำเชื้อราโรคแมลงมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีและหรือทดแทนการใช้สารเคมี ได้แก่ ความสามารถในการเจริญเติบโต ความแข็งแรงและทนทนต่อสภาพแวดล้อม ปริมาณการผลิตหน่วยสืบพันธุ์ รวมทั้งความรุนแรง หรือความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราที่นำมาใช้ประโยชน์ ทั้งนี้จากรายงานที่เกี่ยวข้องชี้ให้เห็นว่าวัสดุเพาะเลี้ยงอาจมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อ รวมทั้งอาจมีผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราได้ และ ความรุนแรงดังกล่าวอาจเชื่อมโยงกับลักษณะและความคงที่ทางพันธุกรรม ซึ่งเกิดขึ้นกับเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ด้วยเช่นกัน (Butt *et al*., 2001, 390 pp.) เหล่านี้นับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการนำเชื้อราไปใช้ในสภาพแปลงเพาะปลูก ดังนั้นการศึกษาผลของ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ชนิดของวัสดุเพาะเลี้ยงที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อราโรคแมลง *B. bassiana* ในครั้งนี้ นอกจากทำให้ทราบผลกระทบของชนิดของวัสดุเพาะเลี้ยงต่อความรุนแรง เช่นการเกิด ไฮเปอร์วิรูเรนซ์ (Hyper virulence) ไฮโปวิรูเรนซ์ (Hypo virulence) และความคงที่ของลักษณะพันธุกรรมซึ่งเชื่อมโยงกับความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคแล้ว ผลการศึกษานี้จะนับได้ว่าเป็นองค์ความรู้ในการที่จะนำไปประกอบการตัดสินใจเลือกวัสดุที่เหมาะสมในการนำเชื้อรา *B. bassiana* ไปขยายปริมาณเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ และ/ หรือ ปรับปรุงสูตรสำเร็จได้อย่างคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ อีกทั้งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้จะเป็นการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ท้องถิ่น ซึ่งอาจมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการศึกษาต่อยอดด้านอื่นๆ ในอนาคต เช่น การสามารถนำไปเป็นฐานข้อมูลเก็บรวบรวมไว้ในฐานข้อมูลของลำดับเบสของยีนใน GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) European Molecular Biology Laboratories (EMBL), Nucleotide Sequence Database และ DNA Data Bank of Japan (DDBJ) และอาจร่วมเป็นส่วนหนึ่งของการจัดทำ DNA Barcode ซึ่งเป็นเครื่องมือใหม่ทางอนุกรมวิธานระดับชีวโมเลกุล ภายใต้โครงการ *"การริเริ่มรหัสแถบของสิ่งมีชีวิต"* (Barcode of Life Initiative – BOLI) ภายใต้อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity - CBD) ในอนาคตด้วย

1.7 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

การควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological control) หมายถึง การควบคุมจำนวนพืชหรือสัตว์ โดยปัจจัยที่ทำให้ตายเป็นสิ่งมีชีวิต ได้แก่ศัตรูธรรมชาติ เช่น ตัวห้ำ ตัวเบียน และเชื้อโรค รวมไปถึงการที่มนุษย์นำศัตรูธรรมชาติมาใช้ในการควบคุมจำนวนของศัตรูพืช หรือ วัชพืช ด้วยการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ (microbial control)

การเกษตรแบบยั่งยืน (Sustainable agriculture) หมายถึง การทำการเกษตรโดยไม่ทำลายทรัพยากรธรรมชาติ และสภาพแวดล้อม เช่น การเลือกปลูกพืชผักโดยวิธีธรรมชาติ โดยการใช้ปุ๋ยอินทรีย์ ไม่ใช้ปุ๋ยเคมี หรือสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมศัตรูพืช

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) หมายถึง วิธีการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่นการใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอนเอเช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้วิเคราะห์หรือศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วย

ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (Percent cumulative mortality - PCM) หมายถึง เปอร์เซ็นต์หรือ ร้อยละของการตายสะสม ของแมลงเป้าหมาย ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งที่กำหนด จากสาเหตุที่กำหนด เช่น จากการได้รับสารพิษ

คิวติเคิล (Cuticle) หมายถึง ผนังสำตัวของแมลงที่ประกอบจากสารโพลี่แซกคาไรด์ เป็นส่วนที่ปกป้องร่างกายของแมลงจากสิ่งแวดล้อมภายนอกซึ่งอาจมีอันตรายต่อแมลง

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ความเข้มข้นที่ทำให้แมลงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Lethal concentration 50 - LC $_{50}$) หมายถึง ความเข้มข้นของสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงหรือยาเชื้อที่มีผลให้แมลงที่ได้รับสารนั้นๆ ตาย 50 เปอร์เซ็นต์

ความรุนแรง (Virulence) หมายถึง ระดับของความสามารถของจุลินทรีย์ในการเป็นสาเหตุของโรค หรือความสามารถของเชื้อในการเอาชนะความต้านทานของเมแทบอลิซึมของตัวอาศัยของเชื้อนั้นๆ (Zaid, *et al.*, 2001, p. 297)

ความทนทานต่อสภาพแวดล้อม (environmental tolerance) หมายถึง ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต เช่นความแห้งแล้ง รังสีอุลตร้าไวโอเลต และอุณหภูมิซึ่งสูงตัวต่ำจนเกินไป โดยมีขีดจำกัดของความสามารถในความทนทานดังกล่าว ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรม และฟีโนไทป์ เฉพาะของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ

ความสามารถในการก่อโรค (pathogenicity) หมายถึง ระดับซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถก่อโรคแก่ตัวอาศัยของเชื้อนั้น ๆ

ความสามารถในการคงอยู่ของเชื้อโรค (persistence) หมายถึง ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ในการ คงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่อาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และขยายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด ที่อาจเกิดขึ้นโดยการสร้างโครงสร้างเพื่อการปกป้อง และหรือ หน่วยสืบพันธุ์ชนิดพิเศษที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

ความหลากรูป (Polymorphism หรือ genetic polymorphism) หมายถึง ความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งคือ การมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน 2 ลักษณะ หรือมากกว่าในประชากร ซึ่งเกิดจากแอลลีลที่ต่างกัน จะถือว่ายีนที่ตำแหน่งหนึ่งมีความหลากหลาย เมื่อความถี่ของแอลลีลที่มีน้อยไม่ต่ำกว่า 0.01 หรือ 1 เปอร์เซ็นต์

ความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) หมายถึง ความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตจากทุกๆ แหล่งครอบคลุมทั้งบนพื้นดิน (terrestrial) มหาสมุทร (marine) และระบบนิเวศแหล่งน้ำอื่นๆ รวมทั้งระบบนิเวศที่หลากหลายซับซ้อนที่ มนุษย์เป็นส่วนหนึ่งของระบบ โดยความหลากหลายทางชีวภาพดังกล่าวครอบคลุมทั้งความหลากหลายของชนิด (species diversity) และความหลากหลายทางระบบนิเวศ (ecological diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity)

จีโนไทป์ (genotype) หมายถึง แบบชนิดพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ประกอบด้วยคู่แอลลีลของยีนรูปแบบต่างๆ ที่เป็นข้อมูลที่บ่งบอกถึงลักษณะพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

เชื้อราโรคของแมลง (Entomopathogenic fungi) หมายถึง เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงชนิดต่างๆ เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง ที่พบได้โดยทั่วไปตามธรรมชาติ ก่อโรคโดยการทำให้แมลงติดเชื้อเข้าทำลายอวัยวะต่างๆ ของแมลง และทำให้แมลงตาย ในที่สุด

ฟีโนไทป์หรือลักษณะปรากฏ (phenotype) หมายถึง คุณสมบัติหรือลักษณะปรากฏของสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเกตหรือตรวจสอบได้ อันเป็นผลเนื่องจากพันธุกรรม และสภาพแวดล้อม เช่น สีของใบพืช ความสูง และความสามารถในด้านต่างๆ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

แถบรหัส DNA (DNA barcode) หมายถึง แถบรหัสซึ่งเกิดจากการใช้ลำดับเบสสั้นๆ ของยีน (short gene sequence) ซึ่งได้มาจากตำแหน่งหนึ่งที่ถูกใช้เป็นมาตรฐานบนจีโนม (standardized position in the genome) โดยวิธีนี้เป็นการเลียนแบบการใช้แถบสีดำของรหัส Universal Product Code (UPC) ที่นำมาใช้แยกสินค้าต่างๆ ออกจากกันโดยกำหนดให้ใช้บริเวณที่เรียกว่า “Folmer Region” หรือ 648-bp ของ mitochondrial gene ซึ่งรู้จักกันในชื่อ *ไซโตโครม ซี อ๊อกซิเดส วัน* (*Cytochrome C Oxidase I – COI*) ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่มีการเสนอมาแต่แรกให้ใช้เป็น “barcode” หรือ “รหัสแถบ” มาตรฐาน ที่จะใช้เป็นลักษณะทางอนุกรมวิธาน แทนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

ไมซีเลียม (mycelium) หมายถึง กลุ่มของเส้นใยของเชื้อรา (hyphare) ซึ่งอัดตัวรวมกันเป็นกลุ่ม เป็นเอกพจน์ ซึ่งมีพหูพจน์คือ mycelia (สิริพงศ์, 2508, 225 หน้า)

ยาเชื้อ (Microbial pesticide) หมายถึง สารกำจัดศัตรูพืช ที่ผลิตขึ้นมาด้วยการใช้เชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติ หรือ สารพิษที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา สำหรับใช้ในการควบคุมศัตรูพืช

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) หมายถึง รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ (DNA band pattern) ซึ่งแสดงความแตกต่างของขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอ ในสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวหรือบุคคล ที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละตัวหรือบุคคล

เวลาเฉลี่ยเวลาถึงการตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (Mean time to death – MTD_{50}) หมายถึง เวลาเฉลี่ยที่เชื้อราโรคแมลง หรือ สารเคมีที่ทดสอบ ทำให้แมลงตาย 50 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์ (enzyme) สารประกอบจำพวกโปรตีนที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเคมีที่จำเพาะต่อสารและปฏิกิริยานั้น แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลและคุณสมบัติของเอนไซม์

ไฮเปอร์วิรูเรนซ์ (Hyper virulence) หมายถึง การที่เชื้อโรคบางสายพันธุ์มีความรุนแรงสูงกว่าประชากรปรกติของเชื้อโรคนั้น

ไฮโปวิรูเรนซ์ (Hypo virulence) หมายถึง การที่เชื้อโรคบางสายพันธุ์มีความรุนแรงต่ำกว่าประชากรปรกติของเชื้อโรคนั้น

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดอาหารเทียมวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เพื่อใช้ประโยชน์ในการควบคุมปริมาณประชากรของแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในเชิงคุณภาพและปริมาณ
2. ทราบถึงผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อความรุนแรงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับฟีโนไทป์ทั่วไป ซึ่งจะมีผลอย่างมากต่อการนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในระดับงานวิจัย ระดับเกษตรกรในท้องถิ่น รวมถึงการพัฒนาสูตรสำเร็จเพื่อการค้าในอนาคต

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

3. ทราบถึงผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณต่อความรุนแรงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับฟีโนไทป์ในระดับโมเลกุล ได้แก่ปริมาณการผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อระดับการก่อโรคของเชื้อ เช่น เอนไซม์ protease และ chitinase เป็นต้น ซึ่งสามารถทำให้ทราบรายละเอียดปัจจัยความรุนแรงและปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่ได้รับจากชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยง
4. ทราบพันธุกรรมซึ่งอาจเชื่อมโยงกับลักษณะภายนอก ด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการก่อโรค และระดับโมเลกุล ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเป็นเชื้อราโรคแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำ

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่ หน่วยงานต่างๆ ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการควบคุมแมลงศัตรูพืช และการบริหารจัดการศัตรูพืช เช่น กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการเกษตร หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาด้านพันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้งสถาบันการศึกษา ที่มีการเรียนการสอนและฝึกอบรมเกี่ยวกับการควบคุมและการบริหารจัดการศัตรูพืช การผลิตอาหารปลอดจากสารพิษ เทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งการทำการเกษตรโดยอาศัยหลักธรรมชาติ รวมทั้งหน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่กำลังพยายามในการนำเชื้อรา *B. bassiana* มาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และพัฒนาสูตรสำเร็จ

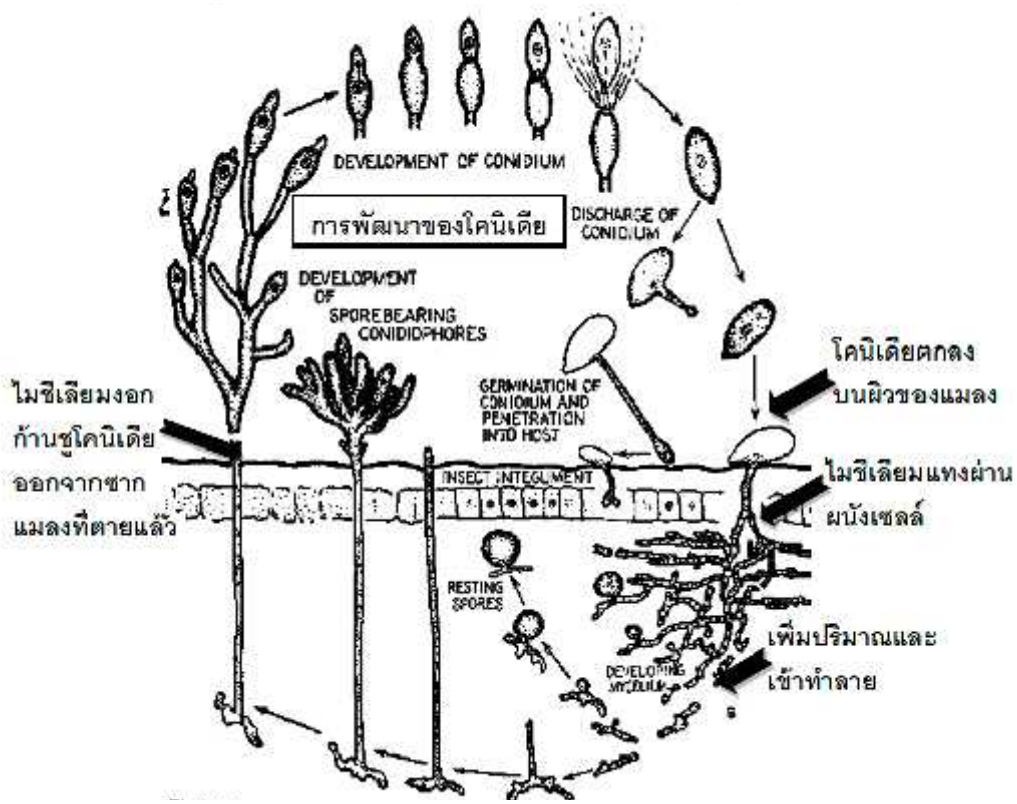
Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การใช้เชื้อราโรคแมลงในการควบคุมแมลงศัตรูพืช

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลงเป็นเชื้อรากลุ่มหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ หรือแม้กระทั่งในพื้นที่การเกษตร เช่น สวนผลไม้และไร่นา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ ความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราทำลายแมลงจะเพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกัน ถ้าสภาพป่าที่มีการบุกรุกทำลายหรือถูกรบกวนมาก จะพบว่าความหลากหลายของเชื้อราทำลายแมลงลดน้อยลงไป เนื่องจากสภาพแวดล้อม ณ แหล่งนั้นได้สูญเสียความสมดุลไป (มาลี, 2543, 5 หน้า) เชื้อราโรคแมลงสามารถอยู่ได้ทั้งในสภาพแซบโพรไฟต์ (saprophyte) หรือพืชกินซาก หรือตัวเบียนและเป็นปรสิต (parasite) ของแมลงและหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด โดยมากเชื้อราสามารถก่อโรคแก่แมลงชนิดต่างๆ โดยเชื้อราโรคแมลงเกือบทุกชนิดเข้าสู่แมลงอาศัย (host insect) โดยตรงผ่านทางผิวหนังของแมลง (cuticle) เมื่อแมลงซึ่งอ่อนแอต่อเชื้อได้รับเชื้อจากการที่สปอร์ของเชื้อตกลงบนผนังลำตัวของแมลง สปอร์ของเชื้อจะยึดติดและย่อยสลายส่วนของผนังเซล เพื่อการแทงผ่านของเส้นใยที่งอกหรือไมซีเลียม (mycelium) โดยมีการปล่อยเอนไซม์หลายชนิดที่ถูกผลิตขึ้นในขณะที่สปอร์ของเชื้อรางอก ทั้งนี้สปอร์มักมีการปรับเปลี่ยนแปลงสภาพโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี เพื่อให้สามารถยึดติดแน่นอยู่กับผิวหนังของแมลงหรือคิวติเคิล (cuticle) และเมื่อเส้นใยของเชื้อสามารถเข้าไปในช่องว่าง (haemocoel) ในตัวแมลงอาศัยแล้ว จะเข้าไปใช้สารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณ และส่วนขยายพันธุ์หรือสปอร์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ ทำลายอวัยวะต่างๆ ของแมลง และทำให้แมลงตาย เนื่องจากขาดอากาศ อดตาย หรือ เนื่องจากสารพิษที่เชื้อราผลิตขึ้น จากนั้นไมซีเลียมจะสร้างเส้นใยบนซากแมลง ในอีกทางหนึ่งในขณะที่เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโตจะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย ทำให้ซากแมลงแห้ง เชื้อราโรคแมลงส่วนใหญ่ เส้นใยจะแทงออกมาจากตัวแมลงอาศัย หลังจากแมลงตายแล้ว ยึดซากแมลงให้ติดกับต้นพืชหรือถูกทำให้ยึดติดโดยขบวนการเกิดโรค จากนั้นไมซีเลียมที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และสปอร์จะค่อยๆ ถูกปล่อยฟุ้งกระจายอย่างรวดเร็วเข้าสู่วงจรการเข้าทำลายต่อไป (ภาพที่ 2.1) เชื้อราโรคแมลงส่วนใหญ่อยู่ใน subdivision Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina และ Deuteromycotina โดยทั่วไปเชื้อราเหล่านี้มีตัวอาศัยหลากหลายชนิดทั้งแมลงและสัตว์ที่มีรยางค์ชนิดอื่นๆ แต่บางชนิดจะมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของความเฉพาะเจาะจงตัวอาศัย (host specificity) ดังนั้น เชื้อราหลายสายพันธุ์จึงสามารถทำลายตัวอาศัยได้เพียงไม่กี่ชนิดที่ใกล้เคียงกัน เท่านั้น (Steinhaus, 1967, 757 pp.)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



ภาพที่ 2.1 กลไกการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราโรคแมลง (ที่มา Steinhaus, 1967, p. 318)

เชื้อราที่เป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง มีบทบาทอย่างมากต่อประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช อีกทั้งมีประวัติควบคู่ไปกับศาสตร์ของโรควิทยาของแมลง (insect pathology) รวมทั้งการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีมาเป็นเวลายาวนาน (Tanada and Kaya, 1993, 666 pp.) และได้รับความสนใจนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเพื่อลดปัญหาจากการใช้สารเคมีซึ่งเป็นพิษ เนื่องจากการใช้เชื้อราโรคแมลง มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมเพียงพอ จึงเกิดโปรแกรมการนำมาปรับใช้ประโยชน์ขึ้นหลายโครงการ และมีระดับความสำเร็จในระดับต่างๆ กันในแต่ละโครงการ (Burges and Hussey, 1971) ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อราโรคแมลงได้แก่ การใช้ในรูปแบบยาเชื้อ (microbial insecticides) ทั้งในระดับท้องถิ่นซึ่งผลิตใช้เองด้วยวิธีอย่างง่ายในบางท้องถิ่น โดยอาจใช้เชื้อที่เก็บได้จากพื้นที่นั้นๆ การได้รับการสนับสนุนจากหน่วยงานราชการในท้องถิ่น หรืออาจใช้สูตรสำเร็จที่มีการจำหน่ายเป็นการค้าซึ่งสามารถศึกษารายละเอียดของยาเชื้อสูตรสำเร็จดังกล่าวได้ใน Copping (2001, 702 pp.) รวมทั้งปัจจุบันได้มีความพยายามพัฒนาสายพันธุ์ โดยการดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชบางชนิด (Viaud *et al.*, 1996, pp. 175-183) ทั้งนี้ในประเทศไทยได้มีบริษัทเอกชนบางรายได้นำยาเชื้อสูตรสำเร็จนี้ เข้ามาจำหน่ายให้แก่เกษตรกร เช่น ในจังหวัดสุพรรณบุรี ราชบุรี นครปฐม รวมทั้งจังหวัดเชียงใหม่ เช่น การใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพืชผักวงศ์กะหล่ำ (รุ่งเกียรติ และ ศมาพร, 2553, 71 หน้า) มีรายงานเกี่ยวกับการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ร่วมกับเชื้อราเขียว*Metarhizium anisopliae* ควบคุมด้วงดีด *Ctenicera destructor* และ *Hypolithus bicolor* โดยหลังจากศึกษาระดับอุณหภูมิ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ที่เหมาะสมต่อการใช้ในการควบคุมแมลงเป้าหมาย ผลการศึกษาปรากฏว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำกว่า 28 องศาเซลเซียส พบการตายในตัวอ่อนของด้วงดีดสูงสุด (Zacharuk and Tinline, 1968, pp. 3044-3049) นอกจากนี้ได้มีรายงานถึงการนำเชื้อรา *Metarhizium* sp. ควบคุมด้วงแรด และ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และประสบผลสำเร็จในการควบคุมแมลงเหล่านี้ทั้งในและต่างประเทศ (มลิวัลย์, 2539, หน้า 183-197; Samuels *et al.,* 1986; Zimmermann, 1992, pp. 113-128) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เชื้อนี้ควบคุมด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) ในประเทศไทยในช่วงปี พ.ศ. 2525-2526 (มลิวัลย์ และ สุรพล, 2537, หน้า 6-15) ทั้งนี้ข้อดีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช คือ มีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่นนอกเป้าหมาย ไม่เป็นอันตราย การไม่มีพิษตกค้าง มีความจำเพาะเจาะจงค่อนข้างสูง ทำให้ปลอดภัยต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่นๆ อีกทั้งเชื้อราโรคของแมลงในรูปยาเชื้อสามารถนำไปใช้รวมกับยาฆ่าแมลงได้ หลายชนิดสามารถผลิตได้ง่าย และมีราคาถูก ศัตรูพืชสร้างความต้านทานช้า ความเข้มข้นในการใช้ต่ำ ซึ่งโดยทั่วไปการใช้ยาเชื้อในการควบคุมแมลงศัตรูพืชสามารถใช้ได้มากกว่าหนึ่งวิธีการ ได้แก่ การนำเชื้อให้เข้าไปตั้งหลักแหล่งอยู่ในกลุ่มของแมลงศัตรูพืช การฉีดพ่นหรือทำเป็นเหยื่อล่อ ใช้ร่วมกับสารกำจัดศัตรูพืชที่สามารถใช้ร่วมกันได้ ดังเช่นในรายงานการใช้ร่วมกับสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroids) เพื่อการควบคุมหนอนวัยสามของหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) และพบการตายของหนอนมากกว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้แมลงตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) ของการใช้ยาเชื้อ *B. bassiana* อย่างเดียวโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 2.67-16.99 และ 7.17-26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หรือ เมื่อใช้แล้วจะทำให้เกิดผลดีเพิ่มขึ้น อีกทั้งยังสามารถใช้ร่วมกับตัวห้ำ ตัวเบียน และจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้อีกด้วย (Duraimurugan and Regupathy, 2005, pp. 65-67)

2.2 เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillenim (Ascomycota: Hypocreales)

เชื้อรา *Beauveria* spp. รวมทั้ง *B. bassiana* มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่ารามัสคาร์ดีนขาว (white muscardine) อันเนื่องมาจากการที่แมลงซึ่งตายโดยมีสาเหตุจากเชื้อนี้จะมีลักษณะแห้งแข็งและ ปกคลุมด้วยเส้นใยและโคนิเดียสีขาวของเชื้อ (ภาพที่ 2.2 ก) เป็นเชื้อโรคของแมลงที่มีการกล่าวถึงในยุคต้นๆ ของประวัติการศึกษาเกี่ยวกับโรคของแมลง และเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญทางบรรพชีวินวิทยา (paleontology) โดยมีการพบในก้อนอำพัน (amber) ซึ่งติดอยู่กับซากมด มีอายุถึง 25 ล้านปี ที่ต่อมามีการยืนยันว่า เชื้อราในอำพันดังกล่าวมีลักษณะคล้ายกับเชื้อรา *B. bassiana* โคนิเดีย (conidia) ของ *B. bassiana* มีลักษณะใส รูปร่างกลมถึงรูปไข่ เกิดบนก้านชูสปอร์ (zoospore) ที่มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน เกิดแบบเดี่ยวๆ หรืออาจเกิดเป็นกลุ่มสีขาว (ภาพที่ 2.2 ข) โดยฐานของก้านชูโอสปอร์จะมีลักษณะแบนราบ และมีสปอร์ หรือโคนีเดีย เกิดเรียงกันในแนวซิกแซกที่ขยายออก (rachis) (ภาพที่ 2.2 ค) เชื้อรา *Beauveria* spp. ที่รวบรวมตัวอย่างมาจากธรรมชาติ เช่นจากดิน หรือแมลงที่เป็นโรค สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียม เช่น SMY agar, oatmeal agar และ PDA (ภาพที่ 1.3) และสามารถเก็บรักษาได้ในสภาพเย็นจัดถึง -70 องศาเซลเซียส ได้เป็นเวลานาน แต่อย่างไรก็ตามในการแยกเชื้อราชนิดนี้จากธรรมชาติ อาจต้องใช้อาหารคัดเลือก (selective media)ที่ผสมสารปฏิชีวนะ เช่นสาร streptomycin, tetracyclin, gentamycin และ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

cycloheximide เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้ในทางสัณฐานวิทยา เชื้อรา *B. bassiana* สามารถแยกออกจาก *Beauveria* ชนิดอื่นโดย *B. bassiana* จะมีโคนิเดียเป็นรูปกลม ส่วนชนิดอื่น เช่น *B. brongniartii* จะมีโคนิเดียเป็นรูปไข่ นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Beauveria* เช่น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ จากการสกัดโปรตีน การศึกษาทางวิทยาอิมมูน หรือ วิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology) การศึกษาขนาดโครโมโซม และในปัจจุบัน มีการใช้เทคนิค RAPD (random amplified polymorphic DNA) และ RFLP (restriction fragment length polymorphism) ในการแยกความแตกต่างของชนิดของ *Beauveria* spp. (Brad and Lewis, 2002, pp. 125-132) นอกจากนี้มีรายงานว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ ในวัสดุเพาะเลี้ยงที่สามารถหาได้ในท้องถิ่น เช่น เมล็ดข้าวฟ่างและข้าวโพด (Saengyot and Napompeth, 2008, 7 pp.; มลิวัลย์ และ สุรพล, 2537, หน้า 6-15)

ก ข ค

ภาพที่ 2.2 ลักษณะอาการมัสคาดีนสีขาวของแมลงที่ตายจากการติดเชื้อรา *Beauveria bassiana* (ก) ภาพขยายของกลุ่มก้านชูสปอร์ของเชื้อราที่เจริญออกจากตัวแมลง (ข) และ ลักษณะรูปร่างสปอร์ของเชื้อ (ค) (ที่มา: www.uoguelph.ca)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ภาพที่ 2.3 ลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ที่มา:www.uoguelph.ca)

ความพยายามในการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ควบคุมผีเสื้อยิปซี (*Lymantria monacha* L.) โดย Franz Tangl ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1893 นับเป็นจุดเริ่มต้นของการนำเชื้อรานี้มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (Steihaus, 1967, 756 pp.) *B. bassiana* จึงนับเป็นเชื้อราโรคแมลงที่ถูกนำมาศึกษาและนำมาใช้ประโยชน์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชมากที่สุดชนิดหนึ่ง โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลากหลายชนิด ได้แก่แมลงในอันดับ Hemiptera, Lepidoptera, Diptera, Hymenoptera และ Coleoptera (Tanada and Kaya, 1993, 666 pp.) ในขณะที่ Lewis *et al*. (1996, pp. 387-393) รายงานว่าเชื้อรา *B. bassiana* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงซึ่งเป็นที่ยอมรับแล้วว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ส่วนกระทรวงเกษตรสหรัฐ (USDA) ได้แนะนำให้เกษตรกรใช้เชื้อรา *B. bassiana* ในรูปของ ยาเชื้อ (microbial insecticides) ที่มีชื่อการค้าว่า Microtrol ในการปลูกผักอินทรีย์ โดยระบุว่าสามารถใช้ในการควบคุม เพลี้ยไฟ แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อนผัก ด้วงมันฝรั่ง เพลี้ยแป้ง และหนอนใยผัก (Appropriate Technology Transfer for Rural Areas, 2007; Vandenberg *et al*. ,1998, pp. 624-630) นอกจากนี้ ในเอกสารเผยแพร่เกี่ยวกับการปลูกผักอินทรีย์ของมหาวิทยาลัยคอร์เนลล์ (Cornell University) ได้แนะนำให้เกษตรกรที่ปลูกพืชอินทรีย์ ใช้เชื้อ *Bt*., NPV และ *B. bassiana* ร่วมกันในการบริหารจัดการศัตรูพืช ในระบบเกษตรอินทรีย์หรือระบบการปลูกที่ปลอดสารเคมี แต่ถึงแม้ว่าเชื้อราชนิดนี้ จะพบอยู่ทั่วๆ ไปในธรรมชาติ แต่จากรายงานต่างๆ มักพบว่าการแพร่ระบาดและทำลายแมลงศัตรูพืชตามธรรมชาติยัง ไม่เพียงพอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงที่แมลงศัตรูพืชเป้าหมายมีการระบาดมาก การเพิ่มปริมาณประชากรของเชื้อรานี้ และการพัฒนาวิธีการที่จะประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะผลักดันให้มีการใช้สิ่งมีชีวิตที่ปลอดภัย มาทดแทนการใช้สารเคมี (Copping, 2009, p. 43)

การศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเป้าหมายของเชื้อรา *Beauveria* spp. ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการดำเนินการในต่างประเทศ เช่น การทดสอบใช้เชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 7 สายพันธุ์ ซึ่งมีสูตรสำเร็จต่างๆ กัน ได้แก่ สูตรผสมน้ำมัน สูตรสารแขวนลอยในน้ำ และแบบผงแป้ง ในการควบคุมหนอนผีเสื้อ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Populus xeuramericana (Lepidoptera: Noctuidae) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูป่าไม้ และพบว่าสูตรผสมน้ำมันให้ผลในการควบคุมได้ดีที่สุด กล่าวคือ จากการพ่นด้วยแบบปริมาตรต่ำ หรือ ULV (ultralow volume) ที่ความเข้มข้น $1.5x10^{13}$ และ $2.0x10^{13}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ต่อเฮกแตร์ เชื้อราที่ทดสอบสามารถก่อการตายให้แมลงดังกล่าวสูงถึง 95.4 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Jinshui *et al*., 2007, pp. 218-223) การใช้ *B. bassiana* สูตรสำเร็จในรูปผงที่ละลายน้ำได้ (wet able powder) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการป้องกันกำจัดไร broad mite, *Poluphagosonemus latus* (Bank) (Acari: Tarsonemidae) ซึ่งทำลายยอดพริก ผลปรากฏว่าเชื้อดังกล่าวสามารถลดความเสียหายของยอดพริกได้ถึง 93.33 เปอร์เซ็นต์ (Nugroho and Ibrahim, 2007, pp. 1-11) ส่วน Tinzaara *et al*. (2007, pp. 111-124) ได้พบว่าการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ร่วมกับฟีโรโมนการรวมกลุ่ม (aggregating pheromone) เพื่อล่อให้แมลงมารวมกลุ่มและติดเชื้อ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงงวงเจาะเหง้ากล้วย banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) โดยเชื้อรานี้มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อราแต่เพียงอย่างเดียว และ Ugine *et al*. (2007, pp. 193-219) ได้ศึกษาวิธีการใช้เชื้อรา *B. bassiana* ที่เหมาะสมสำหรับการควบคุมเพลี้ยไฟดอกไม้ *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) ในเรือนทดลอง โดยมีการพิจารณาจากความถี่ของการพ่นเชื้อรานี้ อัตราที่ใช้พ่น ปริมาณที่ใช้พ่น และโปรแกรมการพ่นที่ถูกต้อง ซึ่งผลจากการทดสอบพบว่าการพ่นในอัตรา $1\text{-}2 \times 10^{14}$ ที่ปริมาตร 3,740 ลิตรต่อเฮกแตร์ จำนวน 3-4 ครั้ง โดยการพ่นแต่ละครั้ง มีระยะเวลาห่างกัน ไม่เกิน 7 วัน มีผลช่วยลดปริมาณประชากรของเพลี้ยไฟ ให้อยู่ระดับต่ำจนอยู่ในระดับที่ควบคุมได้ อีกทั้งมีรายงานถึงความสำเร็จในการการนำเชื้อนี้มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมหนอนเจาะ ลำต้นข้าวโพดยุโรป European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Lepidiptera: Noctuidae) อีกทั้งมีการนำเชื้อนี้ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมด้วงมันฝรั่ง (Colorado potato beetle) ทั้งในรูปแบบการใช้เดี่ยวๆ และการใช้ร่วมกับสารเคมีบางชนิด เช่น DDT หรือการใช้ร่วมกับเชื้อโรคแมลงชนิดอื่น เช่น *Bacillus thuringiensis* (*Bt*.) ซึ่งพบว่าได้ผลดี (Butt *et al*., 2001, 390 pp.) ในที่นี้ รุ่งเกียรติ และ ศมาพร (2553, 71 หน้า) ได้ศึกษาชนิด และประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำ และพบว่า เชื้อรา *B. bassiana* สายพันธุ์ที่แยกได้จากจังหวัดเชียงใหม่ และ สุพรรณบุรี ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายด้วงหมัดผัก และ เพลี้ยอ่อนผักในห้องปฏิบัติการ เรือนทดลอง และภาคสนาม และพบว่าให้ผลดีในการควบคุมแมลงศัตรูสำคัญของพืชผักวงศ์กะหล่ำบางชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพลี้ยอ่อนผัก ทั้งนี้ เชื้อรา *Beauveria* spp. สายพันธุ์ต่างๆ หลายชนิดได้รับการการขึ้นทะเบียนใช้เป็นยาเชื้อเป็นการค้า (commercial microbial insecticides) เช่น *B. bassiana* สายพันธุ์ Bb-147-NPP ซึ่งแยกได้จากหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดยุโรป ในแคว้น Beauce ประเทศฝรั่งเศส และ สายพันธุ์ ATCC-74040 ซึ่งแยกได้จากด้วงงวงเจาะสมอฝ้าย boll weevil, *Anthonomus grandis* (Boheman) ซึ่งเป็นของกระทรวงเกษตรสหรัฐ (USDA) และ สายพันธุ์ GHA จากประเทศอินเดีย ซึ่งมีการแนะนำให้ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชสวนไม้ประดับ พืชผัก และไม้ผลบางชนิด (Copping, 2009, p.43) นอกจากนี้มีรายงานอีกว่า การทดสอบใช้สูตรสำเร็จของ *B. bassiana* ในชื่อ Microtrol® ในการปลูกผักอินทรีย์ ทำให้เพลี้ยไฟหอมที่ลงทำลายผักตายถึง 69 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การไม่ใช้เชื้อราชนิดนี้ (control) ไม่พบการตายของแมลง

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ดังกล่าวเลย การรายงานถึงการใช้ Mycotrol ซึ่งเป็นสูตรสำเร็จในรูปผงแป้งที่ละลายน้ำได้ฉีดพ่นเพื่อควบคุมแมลงหวี่ขาว silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii* ซึ่งทำลายพืชวงศ์แตง และพบว่าสามารถควบคุมแมลงดังกล่าวได้ถึง 65-75 เปอร์เซ็นต์ (Wright *et al*., 2000, pp. 203-217) นอกจากนี้ยังมียาเชื้ออื่นๆ ที่ผลิตจาก *B. bassiana* เช่น ยาเชื้อในชื่อการค้า Bio-Power จากไอโซเลท Bb147 ซึ่งถูกนำมาใช้ควบคุมหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดยุโรป (*O. nubilalis*) และหนอนเจาะลำต้นข้าวโพดเอเชีย Asiatic corn borer, (*O. furnacalis*) แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน เพลี้ยแป้ง และ เพลี้ยไฟ ตลอดจนใช้ควบคุมหนอนเจาะเมล็ดกาแฟ หนอนผีเสื้อชนิดต่างๆ และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และยาเชื้อในชื่อการค้า Beauverin, Boverol และ Boverosil ได้ถูกแนะนำให้ใช้ควบคุมด้วงมันฝรั่งโคโลราโด Colorado potato beetle และให้ใช้ในพืชสวนและพืชอาหารสัตว์ โดยมีการใช้ในชื่อการค้า Naturalis-O และ Naturalis-T และในชื่อ Back-off ต่างเป็น *B. bassiana* ในรูปยาเชื้อซึ่งถูกนำมาใช้ใน สวนชา กาแฟ ฝ้าย มะเขือเทศ มะเขือ ข้าว และกระเจี๊ยบ (Copping, 2009, p. 43) ส่วนในประเทศไทยเริ่มมีการนำยาเชื้อสูตรสำเร็จเข้ามาจำหน่ายให้แก่เกษตรกร เช่น ในจังหวัดสุพรรณบุรี ราชบุรี นครปฐม และ จังหวัดใกล้เคียง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกษตรกรที่ปลูกผักวงศ์กะหล่ำ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ยาเชื้อดังกล่าว ยังไม่เป็นที่รู้จักแพร่หลายนัก แต่อย่างไรก็ตามส่วนแบ่งการตลาดในตลาดสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชนั้นยังไม่มาก รวมทั้งสำหรับในประเทศที่กำลังพัฒนาซึ่งเกษตรกรส่วนใหญ่ยังมีฐานะยากจน ยาเชื้อซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศอาจมีราคาแพงเกินไปและอาจไม่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างไปจากประเทศที่พบเชื้อในประเทศที่พัฒนาแล้ว ดังนั้นในการนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ในหลายประเทศมักมีการนำไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพที่พบในท้องถิ่นโดยใช้วัสดุเพาะเลี้ยงที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นนั้นๆ มาใช้ประโยชน์ รวมทั้งในประเทศไทยด้วย (Saengyot and Napompeth, 2007, 7 pp. ; Sahayaraj Posada-Flores, 2008)

2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวกับความรุนแรงและความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลง

ความสำเร็จในการนำเชื้อราโรคแมลงไปใช้ประโยชน์ในรูปยาเชื้อนั้น มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ปัจจัยภายนอก อันได้แก่สิ่งแวดล้อมซึ่งต้องเหมาะสมต่อการนำเชื้อไปใช้ เช่น แสง ความชื้น และอุณหภูมิ ที่เหมาะสม ในอีกทางหนึ่ง ลักษณะเฉพาะตัวของเชื้อราโรคแมลง อันได้แก่ ความสามารถในการปรับตัว และความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ของเชื้อรา ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการใช้เชื้อราที่เพิ่มปริมาณได้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชด้วย (Butt *et al*., 2001, pp. 109-112) ทั้งนี้มีรายงานอ้างว่าความสามารถในการคงอยู่ (persistence) และความทนทานต่อสภาพแวดล้อมก็ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางพันธุกรรม (Bidochka *et al*., 2002, pp. 531–537) นอกจากนี้ ความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะอีกอย่างหนึ่งของเชื้อราโรคแมลงแต่ละชนิด นับเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมาก ต่อความสำเร็จ และความคุ้มทุนของการนำยาเชื้อไปใช้ประโยชน์ ทั้งนี้องค์ประกอบสำคัญที่มีผล ต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลงอย่างหนึ่ง ได้แก่ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ (Butt *et al*., 1998, pp. 149-169) รวมทั้งการยึดติดของสปอร์ของเชื้อรากับตัวอาศัย ทั้งนี้มีรายงานชี้ว่าเอนไซม์กลุ่มที่ย่อย

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สลายโปรตีน (proteinases) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีความสำคัญต่อความสามารถในการยึดเกาะกับผนังลำตัวแมลงของเชื้อราโรคของแมลง ซึ่งทำให้ระดับความรุนแรงของเชื้อราโรคแมลงแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน (St. Leger *et al*., 1996, pp. 221-232) ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลงในส่วนของสภาพของอาหารหรือ วัสดุเพาะเลี้ยง ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการใช้เชื้อราที่เพิ่มปริมาณได้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (Butt*et al*., 2001, 390 pp.)

ทั้งนี้ความสามารถในการคงอยู่ (persistence) และความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ถูกควบคุมด้วยลักษณะทางพันธุกรรม (Bidochka *et al*., 2002, pp. 531–537) และปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งได้รับผลโดยตรงจากแบบชนิดพันธุกรรม (genotypes) มีรายงานระบุว่าเอนไซม์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง protease มีความจำเป็นต่อการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลงอย่างมีนัยสำคัญ (Shah *et al*., 2005, pp. 259–266; Wang *et al*., 2002, pp. 251-255) โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการย่อยสลายผนังลำตัว (cuticle) ของแมลง (Butt *et al*., 1998, pp. 149-169; Gillespie *et al*., 1998, pp. 128-137) โดยเชื้อราโรคของแมลงแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยผนังเซลล์โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่ม protease ของผนังสำตัวของแมลงเพื่อช่วยให้เชื้อสามารถงอกและแทงเส้นใยไปทำลายแมลงได้ (ภาพที่ 2.4) รวมทั้งเชื้อที่เข้าไปข้างในตัวแมลงยังสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ เพื่อย่อยสลายส่วนต่างๆ ภายในตัวของแมลงเพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ (Steinhaus, 1967, pp.17-68) ทั้งนี้ระดับความรุนแรงของการก่อโรคของเชื้อมักขึ้นอยู่กับปริมาณ และความสามารถของเชื้อแต่ละชนิดหรือสายพันธุ์ ซึ่งอาจได้รับผลโดยตรงจากแบบชนิดพันธุกรรม (genotypes) (Maurer *et al*., 1997, pp. 159–164) อีกทั้งมีรายงานยืนยันว่าการผลิตเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับความรุนแรงในการ่อโรคกับแมลงอาศัย (Dias *et al*., 2008, pp. 301-306)

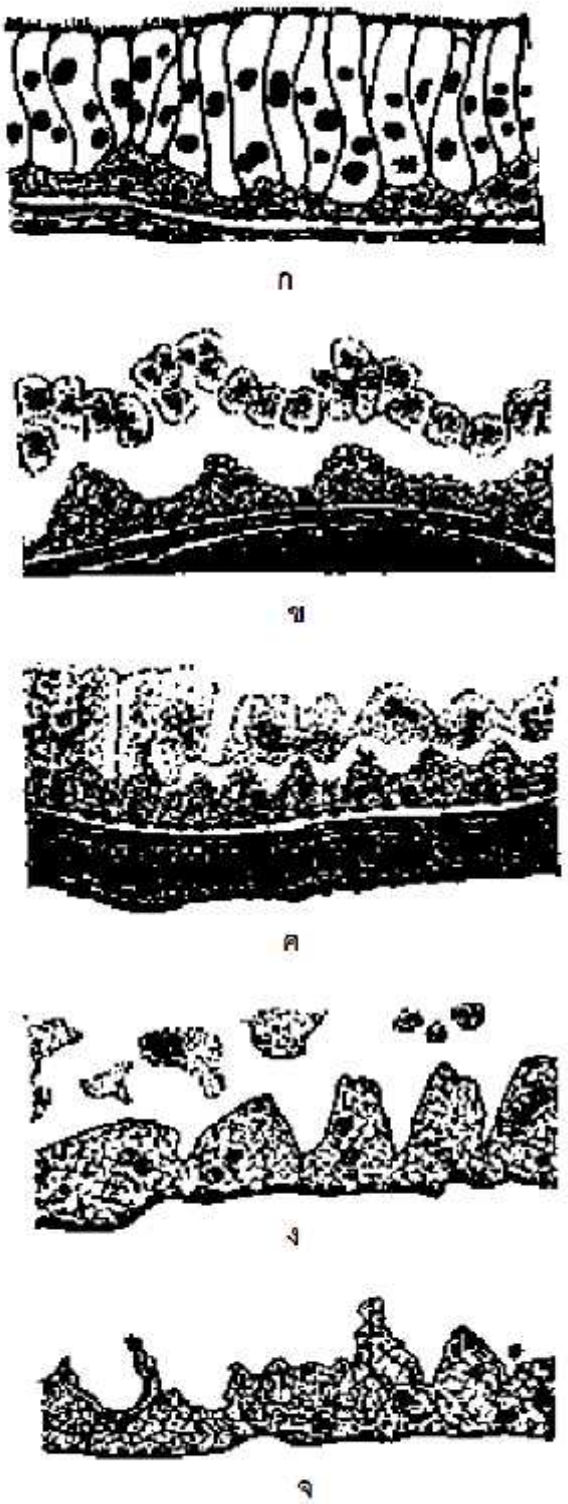
นอกจากนี้มีรายงานชี้ว่าอาหารเทียมมีอิทธิพลต่อความรุนแรงของ *B. bassiana* อีกด้วย (Rodríguez-Gómez *et al*., 2009, pp. 513-518) และ จากรายงานของ Namasivayam *et al*. (2010) ซึ่งศึกษาผลของอาหารเทียม casein media ซึ่งเติม bovine serum albumin วุ้น antiserum ไข่ขาว ไข่แดง ไข่ทั้งฟองบด ปลาป่น ข้าวสาลี horse gram extract, green gram extract, blackgram extract และ Bengal gram extract อย่างใดอย่างหนึ่ง ต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่า เชื้อราที่เจริญบนอาหาร casein media ที่เติม horse gram extract สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุด โดยใช้การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ โดยใช้ตัวชี้วัดขนาด 66 KD ในเจลแบบ SDS-PAGE ของเอนไซม์ อีกทั้งโดยทั่วไป การเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาพอาหารเทียมรวมทั้งวัสดุเพาะเลี้ยง มักพบปรากฏการณ์การลดลงของความสามารถในการก่อโรค และความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้เป็นประจำ ซึ่งแม้ว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวจะมีความสำคัญอย่างมากต่อความสำเร็จในการนำเชื้อราชนิดนี้มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชและการลงทุนพัฒนาสูตรสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานยืนยันชัดเจนถึงสาเหตุและปัจจัยที่มีความสัมพันธ์กับปรากฏการณ์ดังกล่าว

นอกจากนี้มีรายงานชี้ว่าความรุนแรงของเชื้อ *B. bassiana* มีความสัมพันธ์ร่วมและมีวิวัฒนาการร่วมกับชนิดของแมลงตัวอาศัย (insect hosts) ซึ่งหมายความว่าพันธุกรรมของเชื้อราสามารถปรับเปลี่ยนตามตัวอาศัยหรืออาหารของเชื้อได้ (Fan *et al*., 2007, pp. 295–302) เช่น ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ protease ซึ่งมีความสำคัญต่อการแทงผ่านผิวของแมลงตัวอาศัย

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

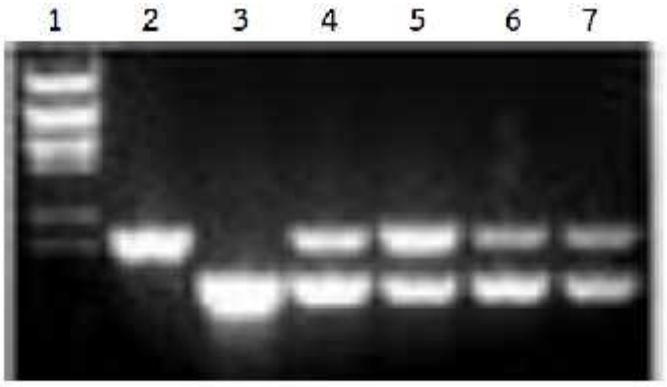
ที่ถูกควบคุมโดยลักษณะพันธุกรรม (Zhang *et al*., 2009, pp. 787-795) อีกทั้งมีรายงานชี้ว่าการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื้อนี้ใช้ในการย่อยสลายผนังลำตัวของแมลงถูกควบคุมด้วยยีน CDEP-1 ซึ่งสามารถตรวจสอบและจำแนกชนิดของ เอนไซม์นี้ ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (ภาพที่ 2.5) (Zhang, *et al*., 2008, pp. 543-555) นอกจากนี้ยังมีรายงานอีกว่าเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการก่อโรคกับเชื้อรา *B. bassiana* คือ chitinase ซึ่งสามารถตรวจหาโดยวิธีโครมาโตกราฟฟีเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 2.6) (Fan *et al*., 2007, pp. 363-370) รวมทั้งสามารถจำแนกยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *B. bassiana* โดยการวิเคราะห์การหาลำดับเบส ซึ่งสามารถอ้างอิงผลการจำแนกโดยอาศัยฐานข้อมูลของ The European Nucleotide Archive (ENA) (ภาพที่ 2.7) (The European Nucleotide Archive, 2011) เป็นต้น

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

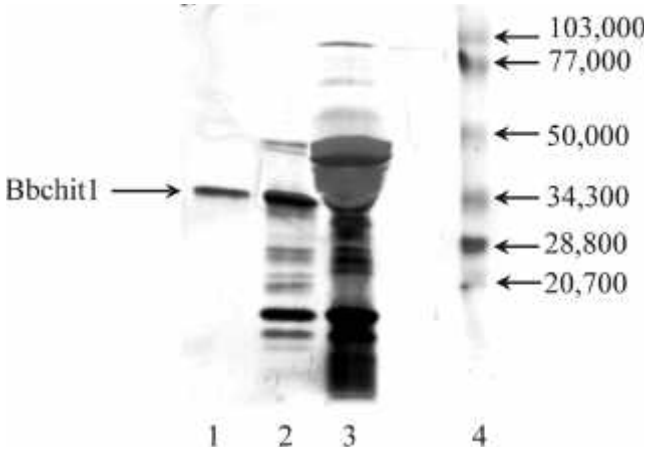


ภาพที่ 2.4 ขั้นตอนซึ่งเซลล์ของผนังลำตัวของแมลงถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อราโรคแมลงอย่างช้าๆ ทำให้ผนังลำตัวส่วนที่ถูกย่อยสลายของแมลงค่อยเสียสภาพและบางลงตามลำดับจากภาพ ก – จ (ที่มา: Steinhaus, 1967, p. 18)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



ภาพที่ 2.5 ผลการจำแนกยีน CDEP-1 ซึ่งควบคุมการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ด้วยวิธี PCR; เลนที่ 1 ตัวชี้วัดยีน CDEP-1 เลนที่ 2 - 7 ตัวอย่างเอนไซม์ที่ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท (ที่มา: Zhang *et al*., 2008, pp. 543-555)



ภาพที่ 2.6 การพบเอนไซม์ chitinase SDS-PAGE ที่ผลิตจากเชื้อรา โดยการตรวจด้วยวิธี แถบที่ 1, anion-exchange chromatography บน DEAE-cellulose column; แถบที่ 2, gel filtration chromatography บน Ultragel AcA54 column; แถบที่ 3, ammonium sulfate precipitation; แถบที่ 4, ตัวชี้วัดน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน (Bio-Rad), ได้แก่ rabbit phosphorylase *b* (น้ำหนักโมเลกุล 97,4000 Da), bovine serum albumin (น้ำหนักโมเลกุล 66,200 Da), rabbit actin (น้ำหนักโมเลกุล 43,000 Da), bovine carbonic anhydrase (น้ำหนักโมเลกุล 31,000 Da) และ trypsin inhibitor (น้ำหนักโมเลกุล 20,100 Da) (ที่มา: Fang *et al*., 2005)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ATGCGTCTATCAATCATTGCTGCCGCTCTTCCCCTGGCCATTGCGGCTCCGGTCGTTGAG
CCTGCTCCTCTCATCGAGGCCCGCGGGCAGACCATTGCCGGCAAGTACATTGTCAAGCAC
AAGGACACTGCGACCATTGGTATCATGGATGCTGCGTCCAAGGTGCCCAACACCGAACTC
GTCTATGAAAATGTCCTCAAGGGATTCTCGGCCACTCTTAACCAGGAACAACTTGACCGT
CTCCGCCACGATCCTGATACCATCGAGCAGGATGCCATTGTTAGCATCAACGCCGTTGTC
CGGCAAGCCGGAGCTCCCTGGGGTCTAGGTCGCATCTCGCACAGGGCACGAGGCGCGACC
ACGTATGACTACGACTCGAGCGCCGGCGCGGGTACATGCGTATATGTCATTGACACTGGC
GTCTATGACTCTCACCCTGATTTCGAAGGACGTGCCAAGCAAATCAAATCCTTTGTCTCT
GGCACTTCAGATGGTCACGGCCACGGCACACACTGCGCCGGAACTATTGGCTCCAAGACT
TACGGCGTAGCCAAGAAGGCGTCCATTTTTGGCGTCAAGGTGCTCGAAGACAGTGGCTCG
GGTTCGCTCAGCGGCGTCATTGCCGGAATGGACTTTGTCGCTACGGACCGGAAATCCCGT
CCATGCAGCAAAGGCACCGTCGCCAGCATGTCCCTTGGCGGTGGCTACTCGGCCACCGTG
AACCAGGCCGCCGCGCGTCTGCAGGCTTCGGGCGTTTTTGTCGCCGTCGCCGCCGGCAAC
GACAATAGGGATGCCGCCCAGACCTCGCCCGCCTCGGAGCCGTCCGTCTGCACCGTCGGA
GCTACCGACTCGTCTGACCGCCGCTCCAGCTTCTCCAACTTTGGAAAAGCTGTCGACATT
TTCGCACCTGGCACTGGCATTCTGTCGACCTGGAATAACGGCGGCACTAATACCATCTCG
GGCACTTCGATGGCCACTCCTCACATTGCCGGTCTCGGTG

ภาพที่ 2.7 ผลการจำแนกลำดับเบสจากยีน CDEP-1 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* จากฐานข้อมูลของ The European Nucleotide Archive (ENA) (ที่มา: The European Nucleotide Archive, 2011)

2.4 กรอบแนวคิดในการวิจัย

การเกษตรในปัจจุบันนอกจากที่จะเน้นการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ซึ่งมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ สิ่งมีชีวิตที่เป็นประโยชน์ และสิ่งแวดล้อม ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชแล้ว ยังให้ความสำคัญกับการนำทรัพยากรในท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์เพื่อลดการใช้ปัจจัยจากภายนอกซึ่งนำสู่ความพอเพียงในระบบการเกษตร ซึ่งสอดคล้องกับยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 6 ที่เกี่ยวกับการทำการเกษตรเพื่อความยั่งยืน มุ่งเน้นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตร และเพิ่มผลิตภาพการผลิตเพื่อพัฒนาศักยภาพสินค้าเกษตรที่สร้างรายได้หลักจากการส่งออกและสร้างรายได้ให้กับชุมชน รวมทั้งการพัฒนาเทคโนโลยีใหม่และการพัฒนาคุณภาพสินค้า มาตรฐานสินค้า ตลอดจนความปลอดภัยของอาหาร (Food Safety) ของนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559) (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2554)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

การนำเชื้อราโรคแมลงมาใช้ในรูปแบบของยาเชื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีประวัติอันยาวนานควบคู่ไปกับการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยจุลินทรีย์ (Microbial control) (Tanada and Kaya, 1993, 666 pp.) เช่นปัจจุบันได้มีความพยายามนำมาใช้ในรูปยาเชื้อ (microbial insecticides) แบบต่างๆ ไปจนถึงการพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จ (formulations) เพื่อใช้เป็นการค้า (Copping, 2009, 702 pp.) ทว่าในประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย เกษตรกรส่วนใหญ่ยังมีรายได้ต่ำ บางรายอาจไม่สามารถใช้ยาเชื้อสูตรสำเร็จซึ่งนำเข้าจากต่างประเทศที่มีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก เนื่องจากยาเชื้อสูตรสำเร็จเหล่านั้นยังมีส่วนแบ่งการตลาดที่ยังน้อยอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับสารเคมีสังเคราะห์

ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะนำเชื้อราที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่นภายในประเทศ มาใช้ประโยชน์โดยการนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยวิธีที่เหมาะสมอีกทั้งสามารถใช้วัสดุเพาะที่ราคาไม่แพงและสามารถหาได้ในท้องถิ่น ที่เอื้อประโยชน์สูงสุดต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณและการก่อโรคต่อแมลงเป้าหมาย (Lopez-Llorca *et al*., 1999, pp. 325-333; Saengyot and Napompeth, 2009, pp. 1-7) และในการที่จะคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมอย่างแท้จริงเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการนำมาใช้นั้น นอกจากวิธีวัดแบบชนิดพันธุกรรม (genotype) ที่แสดงออกโดยตรง เช่น อัตราการเจริญเติบโต และปริมาณการสร้างสปอร์แล้ว และการวัดทางอ้อมในระดับชีวโมเลกุล เช่น ปริมาณการผลิตเอนไซม์ ยังสามารถวัดความเปลี่ยนแปลงของแบบชนิดพันธุกรรม (genotype) ของเชื้อราเหล่านี้ นับได้เป็นวิธีการที่สามารถช่วยอธิบายสาเหตุหรือปัจจัยที่มีผลต่อความรุนแรง และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลง ซึ่งอาจสามารถนำมาพัฒนาเพื่อการใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบยั่งยืนต่อไปได้

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

3.1.1 การคัดเลือกชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

การคัดเลือกชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อ คัดเลือกชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อรา *B. bassiana* โดยพิจารณาจากความสามารถในการเจริญและการผลิตสปอร์บนอาหารเทียม ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA)

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

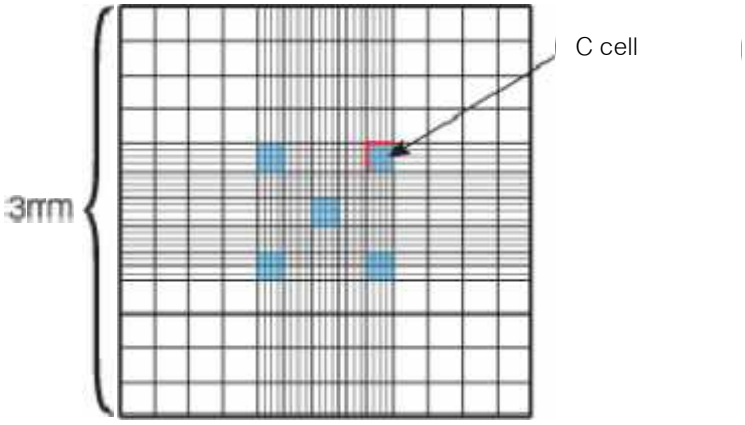
หาอัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* มาเลี้ยงบนอาหาร PDA นาน 3 – 5 วัน หรือจนพบว่าไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและหรือเชื้อราชนิดอื่น ต่อจากนั้นย้ายเชื้อมาวางบนอาหาร PDA จนเชื้อมีอายุ 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้ออยู่มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเทียมซึ่งต้องการทดสอบ ทั้ง 6 ชนิด นำจานอาหารดังกล่าวมาวางบนชั้น ที่มีการให้ช่วงแสง:มืด ในอัตราเวลา 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส จากนั้นวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของเชื้อทุก 24 ชั่วโมงจนกว่าจะพบจานอาหารที่มีเชื้อ *B. bassiana* เจริญเต็มจานอาหาร (เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 9 เซนติเมตร) วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ

หาอัตราการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* โดยย้ายเชื้อบริสุทธิ์มาวางบนอาหาร PDA จนเชื้อมีอายุ 5 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้อราอยู่มาวางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเทียมซึ่งต้องการทดสอบ นำจานอาหารดังกล่าวมาวางบนชั้น ที่มีการให้แสง:มืด ในอัตราเวลา 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส นาน 10 วันจากนั้น ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรสุ่มเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยและสปอร์ของเชื้ออยู่จากแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อจานละ 3 ชิ้น นำมาวางลงในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปตรวจนับบนเครื่องนับจำนวนสปอร์ (hemacytometer) และหาจำนวนสปอร์เป็นหน่วยสปอร์ต่อมิลลิลิตร (n=5) โดยในแต่ละซ้ำหาจากจำนวนสปอร์ที่นับจาก C cell (ภาพที่ 3.1) ซึ่งเท่ากับ 0.02 x 0.02 x 0.01 เซนติเมตร = 4.0×10^{6} ลูกบาศก์เซนติเมตร หารด้วย (2.5×10^{5})

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

(Goettel and Inglis, 1997, pp. 213–249) วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ

นำค่าเฉลี่ย อัตราการเจริญต่อ 24 ชั่วโมงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT จากนั้นนำค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่สร้างบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ เปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT



ภาพที่ 3.1 Neubaure hemocytometer ที่ใช้ในการนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

3.1.2 การคัดเลือกวัสดุเพาะเลี้ยง ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อ

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง (การเตรียมตัวอย่างศึกษา)

เตรียมวัสดุเพาะที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข เตรียมข้าวเปลือกโดยนำข้าวหอมมะลิมาหุงโดยการนึ่งให้สุกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเกลี่ยให้เย็นในถาดซึ่งสานด้วยไม้ไผ่เพื่อลดความชื้นส่วนเกิน เตรียมข้าวเปลือกโดยนำข้าวเปลือกไปล้างน้ำให้สะอาด นำแช่น้ำนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มนาน 15 นาที และนำมาผึ่งลมให้หมาดในถาดไม้ไผ่นาน 30 นาที เตรียมข้าวฟ่างด้วยวิธีเช่นเดียวกับการเตรียมข้าวเปลือก ส่วนอาหารสุนัขเตรียมโดยการนำอาหารสุนัข (ยี่ห้อพลีโม่ สำหรับสุนัขโตทุกชนิดรสตับ) นำมาแช่น้ำสะอาดนาน 1.5 นาที และนำออกมาผึ่งให้สะเด็ดน้ำในถาดที่สานด้วยไม้ไผ่ นำวัสดุเพาะแต่ละชนิดไปบรรจุถุงพลาสติกทนร้อน ถุงละ 150 กรัม สวมด้วยคอขวดพลาสติก และอุดคอขวดด้วยสำลี จากนั้นครอบด้วยกระดาษทิชชูอย่างหนาและรัดยางวง และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำออกมาผึ่งให้เย็นในสภาพอุณหภูมิห้อง ย้ายเชื้อบริสุทธิ์อายุ 7 วัน มาวางบนอาหาร PDA หลังจากเชื้อ โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตรเจาะชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของเชื้ออยู่มาวางในถุงวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ วางบนชั้น ที่มีการให้แสง:มืด ในอัตราเวลา 12:12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25 $\pm$ 3 องศาเซลเซียส จนกว่าจะพบว่าเชื้อราเจริญจนเต็มอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง

เตรียมและปลูกเชื้อราบนวัสดุเพาะ และบ่มเชื้อราตามวิธีการที่กล่าวมาข้างต้น นำเชื้อราที่บ่มนาน 240 ชั่วโมง มาตรวจหาปริมาณการผลิตสปอร์ของเชื้อราที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะเลี้ยงแต่ละชนิด

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

การวัดการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ดำเนินการโดยบันทึกจำนวนชั่วโมงที่เส้นใยของเชื้อราใช้ในการเจริญ และอาศัยข้อมูลส่วนนี้ในการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของเชื้อรา} = \frac{\text{จำนวนวันที่เชื้อใช้เจริญ} \times 100}{\text{จำนวนวันที่เชื้อมีการเจริญเต็มถุงเพาะถุงแรก}}$$

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเจริญเติบโตของของเชื้อรา *B. bassiana* บนวัสดุเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

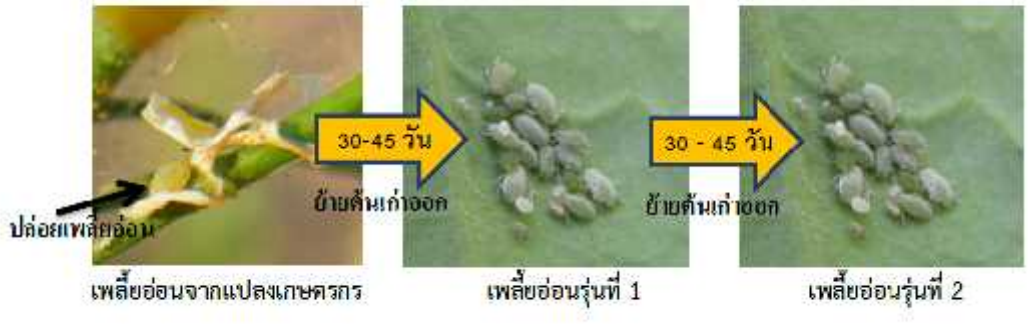
Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

การตรวจหาปริมาณการผลิตสปอร์ของเชื้อราที่เลี้ยงบนวัสดุเพาะแต่ละชนิดนำอาหารที่มีเชื้อราเจริญอยู่ทั้งหมดมาละลายน้ำ ในปริมาตร 500 มิลลิลิตร และนำมา 0.05 มิลลิลิตรไปตรวจนับบนเครื่องนับจำนวนสปอร์ (hemacytometer) และหาจำนวนสปอร์เป็นหน่วยสปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีในข้อ 3.1.1 โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ จากนั้นนำค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่สร้างบนวัสดุเพาะเลี้ยงแต่ละชนิดมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.2 การศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อระดับความรุนแรงของการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

3.2.1 การประเมินความรุนแรงของเชื้อราในการก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi* Hemiptera: Aphididae)

เพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) ให้ปลอดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยอ่อนผักดังกล่าวจากแปลงเกษตรโดยเก็บใบผักคะน้า และกะหล่ำ ที่มีวัยต่างๆ ของเพลี้ยอ่อนผักทำลายอยู่มาวางบนต้นคะน้า (อายุ 30 วัน) ที่เตรียมไว้ในกระถางปลูกในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 50 x 50 เซนติเมตร ในเรือนทดลองกรงละ 1 ต้น และปล่อยให้เพลี้ยอ่อนผักดังกล่าวขยายพันธุ์ 1-2 รุ่น (60-90 วัน) โดยสังเกตจากการพบกลุ่มตัวอ่อนระยะที่ 1-2 ของเพลี้ยอ่อนผักบนต้นผักต้นใหม่ (รุ่นที่ 1) จากนั้นย้ายต้นผักที่เริ่มปล่อยเพลี้ยอ่อนผักครั้งแรกออกจากโรงเรือน จากนั้นนำต้นผักต้นใหม่มาวางในกรงเลี้ยงเพื่อให้มีเพลี้ยอ่อนผักรุ่นที่สองต่อไป (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเพลี้ยอ่อนผักเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียมแต่ละชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียมนาน 15 วัน โดยขูดสปอร์จากผิวอาหารเลี้ยงเชื้อรามาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสารจับใบ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ นับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องนับจำนวนสปอร์ Neybauer Hemocytometer และปรับความเข้มข้นของสปอร์ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Poinar and Thomas (1984, 392 pp.) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วซึ่งมีสารจับใบ Tween 80 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย

เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อราจากวัสดุเพาะชนิดต่างๆ ได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข ตามวิธีในข้อ 3.3.3 จากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่มีสารจับใบ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อนำกากของวัสดุเพาะที่เหลือออก นับจำนวนสปอร์โดยใช้เครื่องนับจำนวนสปอร์และปรับความเข้มข้นของสปอร์ 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ตามวิธีของ Lacey (1997) โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อราที่มีสารจับใบ Tween 80 เข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย

ปลูกเชื้อราเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผัก โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุดได้แก่ สารละลายสปอร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบนอาหารเทียมชนิดต่างๆ และที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะชนิดต่างๆ แก่เพลี้ยอ่อนผักที่เตรียมไว้ โดยนำต้นคะน้าที่มีเพลี้ยอ่อนผักรุ่นที่2 ที่เพาะเลี้ยงไว้มาตัดใบมีกลุ่มของเพลี้ยอ่อนผักอยู่เพียงหนึ่งใบ ใช้พู่กันเบอร์ 2 เขี่ยเพลี้ยอ่อนผักออกจนเหลือ 50 ตัวต่อใบ จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับแมลงเป้าหมาย (pathogenicity test) ดัดแปลงจากวิธีของ Lacey (1997) โดยวางใบพืชที่มีเพลี้ยอ่อนผักในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่ปูด้วยกระดาษกรอง (Wattman No 1) ชุ่มน้ำพ่นสปอร์ของของเชื้อราที่เตรียมไว้ ตามวิธีของ Tanada and Kaya (1993) เปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control, น้ำกลั่น ผสม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) หลังจากการปลูกเชื้อและวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 20-23 องศาเซลเซียส ช่วงการให้แสง:มืด ในอัตราเวลา 12:12 ชั่วโมง และบันทึกจำนวนเพลี้ยอ่อนผักที่มีชีวิตอยู่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการรวบรวมข้อมูลและคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ทดสอบโดยนำข้อมูลการตายมาปรับเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) ตามขบวนการทางพิษวิทยา โดยใช้ Abbott's Correction Formula (Abbott, 1925, pp. 265-267) ดังนี้

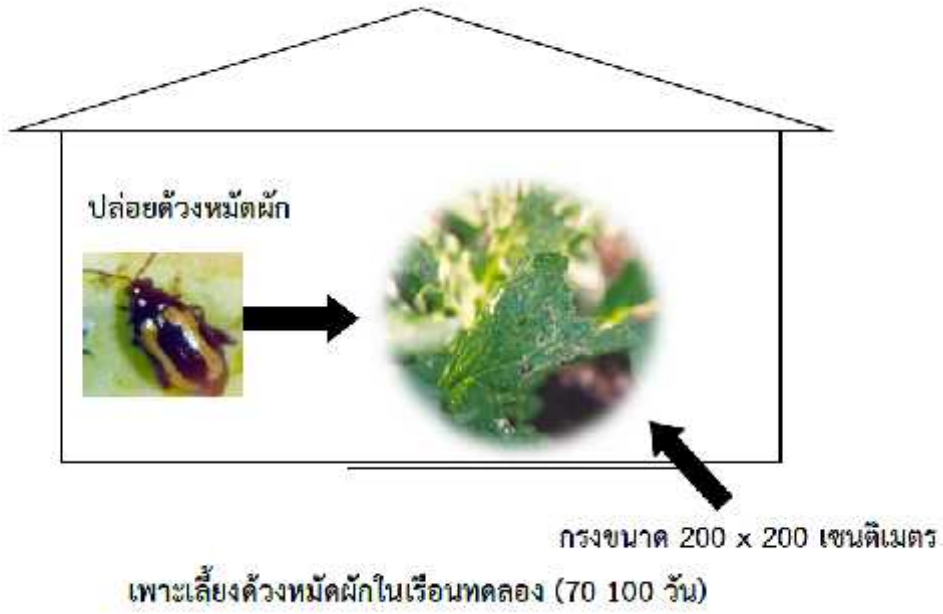
$$\text{เปอร์เซ็นต์ตายของแมลงที่ทดสอบ} = \frac{\text{\% การตายของแมลงที่ได้รับเชื้อรา - \%ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อรา X100}}{\text{\% ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ X 100}}$$

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยทำซ้ำวิธีการทดลองละ 5 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของเพลี้ยอ่อนผักในเวลาที่กำหนดที่วัดได้จากทั้งสองการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.2.2 การประเมินความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคแก่ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*, Coleoptera: Chrysomelidae)

เพาะเลี้ยงด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) ให้ปลอดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างด้วงหมัดผักดังกล่าวจากแปลงเกษตรโดยใช้เครื่องดูดแมลง (aspirator) จากใบผักกาดกวางตุ้งตามแปลงเกษตรมาปล่อยในกรงขนาด 200 x 200 เซนติเมตร (ในเรือนทดลอง) ซึ่งมีต้นผักกาดกวางตุ้ง (อายุ 20-30 วัน) ที่เตรียมไว้ในกระถางปลูก 25 กระถางต่อกรง ปล่อยให้ด้วงหมัดผัก ขยายพันธุ์ 1-2 รุ่น (ประมาณ 70-100 วัน) โดยมีการดูแลต้นพืชโดยการรดน้ำทุก 24 ชั่วโมง และมีการเพิ่มจำนวน และหรือ เปลี่ยนกระถางต้นพืชตามความจำเป็น (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงด้วงหมัดเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียม ตามวิธีในข้อ 3.4.1 และเตรียมด้วงหมัดผักโดยใช้เครื่องดูดแมลงดูดด้วงหมัดที่เพาะเลี้ยงได้ มาปล่อยในกล่องเลี้ยงแมลง (ขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 10 x 15 x 8 เซนติเมตร) ปูด้วยผ้าฝ้ายชุบน้ำพอหมาด ที่มีใบผักกาดกวางตุ้ง (ปลูกในสภาพเรือนทดลองเดียวกับกรงเพาะเลี้ยง) บนลำต้นที่มี 4-5 ใบต่อต้น พันด้วยสำลีชุบน้ำพอหมาดและห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอล์ย จำนวน

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

50 ตัวต่อกล่อง จากนั้นปลูกเชื้อรา จากสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ ตามวิธีของ Tanada and Kaya (1993) เปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อรา (control น้ำกลั่น ผสม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) หลังจากการปลูกเชื้อรา และวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อราใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 20-23 องศาเซลเซียส ช่วงการให้แสง:มืด ในอัตราเวลา 12:12 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นสองการทดลองเป็น 2 ชุด เช่นเดียวกับข้อ 3.4.1 บันทึกจำนวนด้วงหมัดผัก ที่มีชีวิตอยู่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง

รวบรวมข้อมูล และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ทดสอบโดยนำข้อมูลการตายมาปรับเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) และวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติตามวิธีในข้อ 3.4.1

3.2.3 การประเมินความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคแก่หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*, Lepidoptera: Noctuidae)

เพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) ให้ปลอดเชื้อโดยเก็บตัวอย่างหนอนวัยที่ 3-4 จากแปลงเกษตรโดยเก็บใบผักคะน้า และกะหล่ำ มาเพาะเลี้ยงด้วยใบคะน้าซึ่งปราศจากสารพิษ (ปลูกในเรือนทดลอง) ในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 20x 30 x 15 เซนติเมตร) โดยทำความสะอาดกล่องและเปลี่ยนอาหารตามความจำเป็น จนแมลงเจริญเป็นระยะดักแด้ จากนั้นย้ายดักแด้มาวางในกรงเลี้ยงแมลงขนาด 100 x 100 เซนติเมตร ซึ่งมีต้นกะหล่ำซึ่งปลูกในกระถาง 3 กระถางต่อกรง จำนวน 10 ดักแด้ต่อกรง ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1:1 ตัว ในเรือนทดลอง (ประมาณ 45-50 วัน) จนพบกลุ่มไข่ของหนอนกระทู้ผัก เริ่มทำการสังเกตทุก 24 ชั่วโมงเมื่อพบการฟักของหนอนวัยที่หนึ่ง จึงนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรค (ภาพที่ 3.4)

ภาพที่ 3.4 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผักเพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *B. Bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียม ตามวิธีในข้อ 3.4.1 เตรียมหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 โดยตัดใบกะหล่ำที่มีหนอนวัยหนึ่งอยู่ ใช้พู่กันเขี่ยหนอนออกจนเหลือใบละ 20 ตัว นำไปวางในกล่องเลี้ยงแมลง (ขนาด กว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 10 x 15 x 8 เซนติเมตร) ปูด้วยผ้าฝ้ายชุบน้ำพอหมาด ที่มีใบกะหล่ำ (ปลูกในสภาพเรือนทดลองเดียวกับกรงเพาะเลี้ยง) บนลำต้นที่มี 4-5 ใบ พันก้านใบด้วยสำลีชุบน้ำพอหมาดและห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียมฟอยล์ จากนั้นปลูกเชื้อรา จากสารละลายสปอร์ที่เตรียมไว้ ตามวิธีของ Tanada and Kaya (1993) เปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control น้ำกลั่น ผสม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์) หลังจากการปลูกเชื้อรา และวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา ใน growth chamber ที่อุณหภูมิ 20-23 องศาเซลเซียส ช่วงแสง:ความมืด (12:12) โดยแบ่งเป็น 2 การทดลอง

การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

บันทึกจำนวนด้วงหมัดผัก ที่มีชีวิตอยู่ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จากนั้นทำการรวบรวมข้อมูล และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ทดสอบโดยนำข้อมูลการตายมาปรับเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) และวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติตามวิธีในข้อ 3.2.1

3.3 การศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นต่อพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01

การตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยนำตัวอย่างเชื้อราไปวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม โดยด้วยวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยวิธี RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs) ซึ่งเริ่มจากเพาะเลี้ยงเชื้อ Bbs01 บนอาหารเทียมในรูปของเหลวโดยดัดแปลงจากวิธีของ Alves, *et al.* (2002, pp. 70-77) ได้แก่ Potato Dextrose Broth (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB), Nutrient Broth (NB) และ Water Broth (WB) และเตรียมสารสกัดจากวัสดุเพาะเชื้อได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข โดยนำมาบด ในน้ำ 1:1 ส่วน บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร

จากนั้นนำมานึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันตามขบวนการในข้อ 3.2 และเก็บตัวอย่างสปอร์ของเชื้อที่อายุ 30 วัน มาสกัด genomic DNA ของตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Maurer *et al.* (1997, pp. 159-164) กล่าวคือนำตัวอย่างมาสลายส่วนที่เป็นโปรตีนใน lysis buffer ที่มีเอนไซม์ protease K โดยบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดโดยใช้ chloroform: isoamyl alcohol หรือ isopentyl alcohol ในอัตรา 24:1 โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง นำ DNA ที่ได้ไป ปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์และปล่อยให้แห้งในสภาพสุญญากาศ นำ DNA ที่ได้มาละลายใน Tris EDTA buffer ปริมาตร 300-500 ไมโครลิตร และนำ DNA ที่

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ marker RAPD โดยใช้ไพร์เมอร์ได้แก่ OPA-3 และ OPB -10 (โดย Operon Technologies, Alabama, USA) สำหรับการตรวจเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อนี้ ตามวิธีของ Castrillo *et al*. (2003, pp. 75–83) ในสภาพ PCR denaturation เริ่มต้น 4 นาที ที่ 95 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาพ denaturation 40 วินาที ที่ 94 องศาเซลเซียส annealing 40 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส extension 40 วินาที ที่ 72 องศาเซลเซียส รวมจำนวน 35 cycles และ final extension 4 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส จากนั้นนำผลผลิต PCR ดำเนินการ electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย ethidium bromide และ ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลท และใช้ ladder ขนาด 500 และ ใช้ ladder ขนาด 1000 คู่เบส เป็นตัวชี้วัดขนาดโมเลกุล

3.4 ผลของชนิดอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อความสามารถในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 (ตัวชี้วัดเชิงคุณภาพ)

3.4.1 การตรวจหาเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับชีวโมเลกุล

ตรวจหาการสร้างเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยในระดับชีวโมเลกุลที่มีผลต่อความสามารถในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับชีวโมเลกุลในการศึกษาครั้งนี้วัดโดยการวัดประมาณการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารและวัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันโดยวิธีซึ่งดัดแปลงจาก Kucera (1971, pp. 211-215) โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดต่างๆ ตามขบวนการในข้อ 3.3 จากนั้นทำการปลูกเชื้อรา Bbs01 ลงในอาหารแต่ละชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ บ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 3 วัน จากนั้นนำของเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมากรองด้วยฝ้าขาวบาง และนำไป centrifuge ที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และนำไปตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์โดยอาศัยน้ำหนักโมเลกุลของ protease โดยวิธี acrylamide gel electrophoresis ใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย เจล 0.3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพที่ไม่มีการชักนำ ที่สภาพอุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ใน Triton X -100 solution 2.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้าง SDS และทำให้เอนไซม์เสียสภาพ นำเจลมาบ่มในบัฟเฟอร์ (Tris-HCl (pH 8) 0.01 โมล – CaCl2 10 มิลลิโมล) นาน 5-8 ชั่วโมง นำมา fixed และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง และยับยั้งปฏิกิริยาด้วย methanol และ acetic acid 1 ชั่วโมง และนำไปส่องบนพื้นหลังสีฟ้าเข้ม โดยวัดขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีนด้วยตัวชี้วัดมาตรฐาน (standard marker)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

3.4.2 การวัดปริมาณการผลิตเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นปัจจัยความรุนแรงในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ในระดับชีวโมเลกุล

วัดปริมาณการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเทียมและวัสดุเพาะชนิดต่างๆ โดยเริ่มจากการเตรียมอาหารเทียมจำนวน 6 ชนิดได้แก่ Potato Dextrose (PDB), Sabouraud Dextrose Broth (SDB), Sabouraud Dextrose Broth Supplemented with Yeast Extract (SDBY), Malt Extract Broth (MEB), Nutrient Broth (NB) และ Water Broth (WB) โดยนำสูตรสำเร็จของอาหารเหล่านี้มาละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหาร PDA นาน 15 วัน และขูดสปอร์ของเชื้อรามาละลายในน้ำกลั่นและปรับความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร นำมา 1 มิลลิลิตร มาบ่มในอาหารที่เตรียมไว้บนเครื่องเขย่า ที่ 28 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ที่ 180 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ปรับระดับ pH ของอาหารเทียมแต่ละชนิดให้เป็น 8.0 และบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส ที่ 180 รอบต่อนาที นาน 56 ชั่วโมง และเก็บเส้นใย โดยการกรองด้วยผ้าขาวบาง และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ นำมาแยกเส้นใยด้วยการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำของเหลว (supernatant) มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีของ Kunitz (1947, pp. 291-310) โดยเตรียมสารตั้งต้นการย่อยสลายของเอนไซม์ (substrate) ซึ่งคือ casein (Sigma) ปริมาณ 2 กรัม ใน 0.01 M Tris HCl เข้มข้น 1 โมล (pH 8.0) ซึ่งมี CaCl2 (pH 8.0) 10 มิลลิโมล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่น นำ substrate ที่เตรียมไว้นี้ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้นที่ละลายใน Tris HCl 0.01 โมล (pH 8) และ 10 mM CaCl2 10 มิลลิโมล (รวม 200 ไมโครลิตร) บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และหยุดปฏิกริยาด้วย TCA 1.2 โมล นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และนำของเหลวไปวัดการดูดกลืนแสงที่ระดับช่วงแสง 280 นาโนเมตร เทียบกับน้ำ โดย 1 หน่วยกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) วัดเป็นปริมาตรเอนไซม์ที่ผลิตสาร Tyrosine ต่อนาที ในสภาพที่ศึกษา

โดยใช้สารนี้เป็นสารมาตรฐานสำหรับการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์นำข้อมูลหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์มาหาค่าเฉลี่ยจากการ ทำซ้ำวิธีการทดลอง (อาการเทียมแต่ละชนิด) ละ 5 ซ้ำ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดย วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

เตรียมวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยเริ่มจากการเตรียมข้าวเปลือกโดยนำข้าวหอมมะลิมาหุงโดยการนึ่งให้สุกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาเกลี่ยให้เย็นในถาดซึ่งสานด้วยไม้ไผ่เพื่อลดความชื้นส่วนเกิน นำข้าวเปลือกไปล้างน้ำให้สะอาด นำแช่น้ำนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มนาน 15 นาที และนำมาผึ่งลมให้หมาดในถาดไม้ไผ่นาน 30 นาที เตรียมข้าวฟ่างเช่นเดียวกับการเตรียมข้าวเปลือก ส่วนอาหารสุนัขเตรียมโดยการนำอาหารสุนัข (ยี่ห้อพลีโม่ สำหรับสุนัขโตทุกพันธุ์รสตับ) นำมาแช่น้ำสะอาดนาน 1.5 นาที และนำออกมาผึ่งในถาดที่สานด้วยไม้ไผ่ให้สะเด็ดน้ำ นำวัสดุเพาะแต่ละชนิดมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดอาหารโดยการเติมน้ำกลั่นระหว่างบด จากนั้นนำวัสดุที่บดแล้วปริมาตร

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

100 มิลลิลิตร มาบรรจุในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร และขูดสปอร์ของเชื้อมาละลายในน้ำกลั่น และปรับความเข้มข้น 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิเมตร 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในอาหาร บ่มในเครื่องเขย่า ที่ 150 รอบต่อนาที ที่ 35 องศาเซลเซียส นานา 72 ชั่วโมง และนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บเส้นใยโดยการกรอง และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ และนำเส้นใยที่กรองได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาที และนำไปตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราบนวัสดุเพาะแต่ละชนิดโดยวิธี acrylamide gel electrophoresis และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวมาข้างต้น นำข้อมูลหน่วยกิจกรรมของเอนไซม์มาหาค่าเฉลี่ยจากการ ทำซ้ำวิธีการทดลอง (วัสดุเพาะแต่ละชนิด) ละ 5 ซ้ำ โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD โดย วิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อหานัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ และหากพบนัยสำคัญ ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อรา และ วัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ protease

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), SDA with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรค กับแมลงเป้าหมายทั้งสามชนิด (เพลี้ยอ่อนผักด้วงหมัดผัก และ หนอนกระทู้ผัก) โดยการใช้สมการถดถอย (regression equation) ซึ่งกำหนดให้ค่า log ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease y และเปอร์เซ็นต์การก่อโรค x และ วัดค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r และ R) ในสมการ เป็นตัวชี้วัดระดับและแนวโน้มความสัมพันธ์ (LeClerg *et al*., 1966, Snedecor and Cochran, 1967, Wadley, 1967) จากนั้นนำข้อมูลชุดดังกล่าวมาแสดงค่าเป็นระดับความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากนั้นนำเข้ามูลมาพลอตกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นให้เป็นแนวโน้มความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

นำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่างและอาหารสุนัข มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรคกับแมลงเป้าหมายทั้งสามชนิด (เพลี้ยอ่อนผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก) โดยการใช้สมการถดถอย (regression equation) ซึ่งกำหนดให้ค่า log ของค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease y และ เปอร์เซ็นต์การก่อโรค x และ วัดค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r และ R) เป็นตัวชี้วัดระดับและแนวโน้มความสัมพันธ์ (LeClerg *et al*., 1966; Snedecor and Cochran, 1967; Wadley, 1967) และนำข้อมูลชุดดังกล่าวมาแสดงค่าเป็นระดับความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ย จากนั้นนำเข้ามูลมาพลอตกราฟเพื่อแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นให้เป็นแนวโน้มความสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

3.6 เครื่องมือในการวิจัยและการตรวจสอบคุณภาพเครื่องมือ

ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (Laminar flow) ที่มีการรับรองมาตรฐานตามมาตรฐานของ Nation Science Foundation (NSF) ได้แก่ การทดสอบความปลอดภัยของผู้ปฏิบัติงาน โดยวัดปริมาณของสปอร์ของแบคทีเรียที่ออกมาจากพื้นที่การทำงานภายในตู้สู่สิ่งแวดล้อม ทดสอบความปลอดภัยของชิ้นงาน โดยวัดปริมาณของสปอร์ของแบคทีเรียภายนอกที่เข้ามาในพื้นที่การทำงานภายในตู้ และทดสอบการป้องกันการเกิด cross contamination โดยวัดปริมาณสปอร์ของแบคทีเรียที่ตกค้างภายในตู้หลังจากการทำงานรวมทั้งการทดสอบต่างๆ นี้จะวัดทั้งความเร็วของการไหลเวียนอากาศภายในและภายนอกตู้ วัดความเร็วของอากาศที่หมุนเวียน ในห้องปฏิบัติการ ทดสอบการรั่วของแผ่นกรอง HEPA นอกจากนี้ยังทดสอบไปถึง การสั่นและความดัง ของตู้ขณะทำงาน และวัดปริมาณความเข้มแสงในห้องปฏิบัติงาน โดยเจ้าหน้าที่ดูแลอุปกรณ์

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy autoclave ss-320, Tomy Seiko Co. Ltd., Japan) ซึ่งได้รับการประกันคุณภาพและบำรุงรักษาจากบริษัทผู้จำหน่าย ผู้เชี่ยวชาญ หรือผู้ผลิต ได้แก่ 1) ตัวบ่งชี้ทางกายภาพ ประกอบไปด้วย โลหะอัลลอยด์ ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ถ้าโลหะนี้เกิดหลอมเหลวหรือเสียหายจากการทำงานของเครื่องจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถมองเห็นได้ 2) ตัวบ่งชี้ทางเคมีได้แก่ การมีเทปสำหรับนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave tape) ซึ่งจะมีแถบสีที่จะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีดำหรือน้ำตาลเข้ม เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3) ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ โดยตัวบ่งชี้ชนิดนี้คือการบรรจุสปอร์ของแบคทีเรียที่ทนความร้อนได้สูงมาก ถ้าเครื่อง Autoclave ไม่สามารถทำอุณหภูมิที่ถูกต้อง สปอร์เหล่านี้จะเจริญเติบโตต่อไปได้ ซึ่งตัวบ่งชี้ทางชีวภาพนี้จะได้กล่าวถึงอย่างละเอียดในหัวข้อต่อไป อีกทั้งมีการทดสอบเครื่อง Autoclave ทุกๆ 6 เดือน โดยการทำ Spore test โดยใช้ชุดทดสอบแบบสำเร็จ (spore strips) ของเชื้อแบคทีเรียพวก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทนความร้อนได้สูงมาก โดยใส่ชุดทดสอบซึ่งภายในมีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ หลังจากเริ่มการทำงานเครื่องแล้วจะทำให้หลอดแก้วภายในชุดทดสอบแตกสปอร์ที่อยู่ภายในก็จะตกลงไปในอาหารเหลวภายใน หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำชุดทดสอบไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ถ้าสปอร์ถูกทำลายทั้งหมดสีของอาหารจะยังคงเป็นสีฟ้าเช่นเดิม แต่ถ้าสปอร์มีการเจริญเติบโตและมีกระบวนการเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นจะทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อีกทั้งมีการใช้เครื่องมือ และมีการบรรจุสิ่งที่จะฆ่าเชื้ออย่างปลอดภัยตามคำแนะนำของผู้ผลิต

กล้องจุลทรรศน์ แบบ compound microscope และกล้องจุลทรรศน์แบบ stereomicroscope ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพโดยบริการหลังการขายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการจัดการด้านพื้นฐานการใช้และการดูแลเบื้องต้นโดยผู้ใช้และดูแลอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ ในห้องปฏิบัติการเช่น การเก็บกล้องจุลทรรศน์ไว้ในที่ที่ปราศจากฝุ่นละออง ไม่มีความชื้นสูง ในห้องมีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หลีกเลี่ยงจากสถานที่ที่มีเชื้อรา การเตรียมสไลด์ ที่เหมาะสมกับการใช้กล้อง การเช็ดเลนส์ต้องใช้กระดาษเช็ดเลนส์ทุกครั้งโดยน้ำยาที่ใช้เช็ดเลนส์ ได้แก่ xylene 85 เปอร์เซ็นต์ ผสม ether 15 เปอร์เซ็นต์ หรือ alcohol 80 เปอร์เซ็นต์ ผสม ether 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไมโครมิเตอร์ที่ใช้วัดขนาดของสิ่งที่ส่องใต้กล้อง ได้มีการเทียบค่าระยะห่างของแต่ละช่องกัน stage micrometer เมื่อ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ต้องการวัดขนาดวัตถุ ให้ใส่แผ่นกระจกกลมในกระบอกเลนส์ใกล้ตา วางแผ่น stage micrometer บนแท่นวางสไลด์ หลังปรับกล้องให้เห็นภาพขีดแบ่งบนสไลด์ แล้วเทียบระยะห่างแต่ละช่องบนแผ่นกระจกกลมกับขีดแบ่งบนแผ่นสไลด์ และ คำนวณค่าของระยะห่างของช่องบนแผ่นกระจกกลมตามสูตร ค่า 1 ช่องของ ocular micrometer = จำนวนช่องของ stage micrometer/ จำนวนช่องของ ocular micrometer x ค่า 1 ช่องของ stage micrometer

อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยาอื่น ๆ เช่นเครื่องแก้วและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ขนาดเล็ก มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

อุปกรณ์พื้นฐานสำหรับ gel electrophoresis มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

เรือนทดลอง กรง กล่อง และและอุปกรณ์พื้นฐาน สำหรับเพาะเลี้ยงแมลงมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางผู้รับเหมาจัดทำและผู้ตรวจรับ รวมทั้งมีการปฏิบัติงานตามความเหมาะสมในระดับที่ทดสอบ

อุปกรณ์สำหรับฉีดพ่นเชื้อราโรคแมลงมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

อุปกรณ์สำหรับให้ความชื้น (Devatec Stream Humidifier) มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น (Temperature and Humidity Data Logger รุ่น SKL200THIIa, SK Sato, Japan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องชั่งดิจิตอล (Digital Scale 3000g, GM-3KG, Lutron, Taiwan) ซึ่งมีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ

เครื่องเขย่าสารและควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) KS 4000 ic control, Germany มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศทุก 6 เดือน รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

เครื่องมือสำหรับการปั่นเหวี่ยง (Centrifuge, Z206A with 6x50ml, Hermle, Germany) มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศทุก 3 เดือน รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

เครื่อง PCR Model MJ Research DYAD ALD สำหรับการทำ PCR มีการตรวจสอบคุณภาพก่อนการจำหน่ายจากทางบริษัทตัวแทนจำหน่ายในประเทศ รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัดโดยผู้ปฏิบัติงาน

อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ขนาดเล็กที่จำเป็น สำหรับการสกัดโปรตีนและการทำ electrophoresis รวมทั้งมีการปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้มีการสั่งซื้อจากตัวแทนจำหน่วยที่ได้รับความเชื่อถือ รวมทั้งมีการคัดเลือกบริษัทผู้ผลิตที่มีคุณภาพ มีการตรวจสอบสภาพและอายุการใช้งาน และการใช้ในอัตราและวิธีการตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด โดยสารเคมีที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

1. Potato Dextrose Agar (PDA) (Hi-Media Laboratories PVt. Ltd., Mumbai-400 086, India)
2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (BIOMARK Laboratory, Pune 411011,India)
3. Nutrient Agar Yeast Extract (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
4. Malt Extract Agar (MEA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
5. Beef Extract (Becton Dickinson Microbiolog Systems Company, Spatks, USA)
6. Peptone (Hi Media Laboratories PVt. Ltd., Mumbai400 086, India)
7. Casein Acid Hydrolysate (Hi-Media Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai 400-086 India
8. Agar (ผงวุ้น)
9. Malt Extract (Fluka biochemika)
10. Magnesium sulphate, Maso47H2O) (CARLO ERBA REAGENTI, France)
11. K2HPO4 (CARLO ERBA REAGENTI, France)
12. Glycerol
13. Dextrose (DIFCO, BECTON DICKINSON, MD, USA)
14. สารจับใบ Tween 80
15. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
16. PCR Buffer
17. Iso amyl alcohol
18. Chloroform
19. Agarose
20. Ethidium bromide
21. acrylamide gel
22. Tyrosine
23. Coomassie brilliant blue R – 250
24. ethanol 70 เปอร์เซ็นต์
25. methanol
26. acetic acid
27. $CaCl_2$
28. Tris EDTA
29. สารเคมีอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ protease

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของหัวเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

4.1.1 อาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อ

ผลการคัดเลือกชนิดของอาหารเทียมที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยพิจารณาจากความสามารถในการเจริญและการผลิตสปอร์บนอาหารเทียมได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) พบว่าอัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.01$) (ตารางที่ 4.1) โดย มีค่าเฉลี่ยสูงสุดและต่ำสุดเป็น 3.21 และ 0.53 มิลลิเมตรต่อ 24 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงบนอาหาร NA และ WA ตามลำดับ เชื้อราสามารถขยายเส้นรอบวงของโคโลนีได้เร็วที่สุด บนอาหาร NA คือ 3.04 ± 0.17 มิลลิเมตรต่อ 24 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างตามนัยทางสถิติจากการเจริญบนอาหาร MEA ส่วนผลการวัดปริมาณการสร้างสปอร์ต่อหน่วยมิลลิลิตร พบว่าชนิดของอาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา มีผลต่อปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 อย่างมีนัยสำคัญ โดยในเวลา 10 วันในสภาพห้องปฏิบัติการ เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้สูงสุด 9.35 และต่ำสุดที่ 1.57 สปอร์ต่อมิลลิเมตรเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA และ WA ตามลำดับ และปริมาณการสร้างสปอร์บนอาหารเทียมแต่ละชนิดของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้การเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA เป็นวิธีที่พบว่ามีค่าเฉลี่ยสูงสุดคือ 8.80 ± 0.55 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.2)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.1 อัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยวของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตรต่อ 24 ชั่วโมง)
Potato Dextrose Agar (PDA)	2.36 ± 0.30c
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	2.72 ± 0.08b
SDA with Yeast Extract (SDAY)	2.70 ± 0.17b
Malt Extract Agar (MEA)	2.78 ± 0.19a
Nutrient Agar (NA)	3.04 ± 0.17a
Water Agar (WA)	0.68 ± 0.15d

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.2 ปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณการสร้างสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
Potato Dextrose Agar (PDA)	6.62 ± 0.27d
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	8.80 ± 0.55a
SDA with Yeast Extract (SDAY)	7.40 ± 0.43c
Malt Extract Agar (MEA)	8.10 ± 0.45b
Nutrient Agar (NA)	7.40 ± 0.84c
Water Agar (WA)	2.20 ± 0.45e

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

4.1.2 การคัดเลือกวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงและเตรียมหัวเชื้อรา

วัสดุเพาะเลี้ยงที่สามารถหาได้ในท้องถิ่นได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว พบว่าเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 บนวัสดุเพาะเลี้ยง 150 กรัม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.01$) (ตารางที่ 4.3) โดยมีค่าสูงสุดและต่ำสุดอยู่ที่ 99.89 และ 66.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ วัสดุเพาะเลี้ยงที่เส้นใยของเชื้อราสามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีที่สุดได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุก แต่ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างจากการใช้ข้าวสวยเป็นวัสดุเพาะเลี้ยง โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราบนวัสดุเพาะเลี้ยง 98.80 ± 1.09 และ 94.60 ± 3.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราในวัสดุเพาะเชื้อพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีสูงสุดอยู่ที่ 11.49 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง 6.85 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยอาหารสุนัข ทั้งนี้เชื้อราสามารถสร้างสปอร์ได้สูงสุดบนเมล็ดข้าวฟ่างในระดับค่าเฉลี่ยเป็น 10.60 ± 0.89 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และรองมาคือข้าวสวย 10.20 ± 1.30 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.4) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามลำดับ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

วัสดุเพาะ	เปอร์เซ็นต์การเจริญ (เปอร์เซ็นต์)
ข้าวสวย	94.60 ± 3.65a
ข้าวเปลือก	87.60 ± 8.26b
ข้าวฟ่าง	98.80 ± 1.09a
อาหารสุนัข	70.40 ± 3.91c

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสปอร์สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของเชื้อราบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

วัสดุเพาะ	ปริมาณการสร้างสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิเมตร)
ข้าวสวย	10.20 ± 1.30a
ข้าวเปลือก	8.60 ± 1.34b
ข้าวฟ่าง	10.60 ± 0.89a
อาหารสุนัข	7.40 ± 0.55b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

4.2 ผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อระดับความรุนแรงในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชโดยเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01

ความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*, Hemiptera: Aphididae) ของเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียมแต่ละชนิด ได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียมนาน 10 วัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.01) (ตารางที่ 4.5) โดยค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในเวลา 7 วันของเพลี้ยอ่อนมีค่าสูงสุดอยู่ที่ 98.22 เปอร์เซ็นต์ และค่าต่ำสุดอยู่ที่ 74.14 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร SDAY และ NA มาปลูกเชื้อแก่เพลี้ยอ่อนผักที่ปลอดโรคตามลำดับ ทั้งนี้ผลชี้ว่า เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร SDAY สามารถก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนผักได้สูงสุดโดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 94.20 $\pm$ 4.02 และ 78.80 $\pm$ 4.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นหลังจากทดลองปลูกเชื้อราที่ผ่านการเพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 4 ชนิดได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข ปรากฏว่า เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน สามารถก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนผักได้ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.01) (ตารางที่ 4.6) โดยเชื้อที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสามารถก่อโรคได้สูงสุดโดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของเพลี้ยอ่อนผักอยู่ที่ 96.00 $\pm$ 2.92 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การก่อโรคโดยรวมมีค่าอยู่ที่ 98.92 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 78.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำเชื้อที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวฟ่างนึ่งสุกและอาหารสุนัขตามลำดับมาปลูกเชื้อแก่เพลี้ยอ่อนผัก

ความรุนแรงในการก่อโรคแก่ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuate*, Coleoptera: Chrysomelidae) ของเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารเทียมชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P= 0.01) จากตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า เชื้อราที่ได้จากการเลี้ยงบนอาหาร SDAY สามารถก่อโรคแก่ด้วงหมัดผักได้ดีที่สุดโดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม 7 วันของด้วงอยู่ที่ 79 $\pm$ 1.58 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้โดยรวมค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของด้วงอยู่ที่ 80. 58 เปอร์เซ็นต์ และค่าต่ำสุดอยู่ที่ 58.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงด้วย SDAY และ PDA ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทดสอบปลูกเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมลงที่ทดสอบมีค่าอยู่ระหว่าง 61.10 – 82.00 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของด้วงหมัดผักมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P = 0.01) และผลจากตารางที่ 4.8 ชี้ว่าเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงบนข้าวฟ่างนึ่งสุกสามารถก่อโรคได้ในระดับสูงสุดในขณะที่เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวยสามารถก่อโรคได้ในระดับต่ำสุด

ความรุนแรงในการก่อโรคแก่หนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*, Lepidoptera: Noctuidae) ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ ชี้ว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อความแตกต่างของค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของหนอนกระทู้ผักอย่างมีนัยสำคัญ (P= 0.01) (ตารางที่ 4.9) และโดยรวมเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงบน SDAY สามารถก่อโรคได้สูงสุด และที่เพาะเลี้ยงบน NA สามารถก่อโรคได้ต่ำสุด โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 43.92 – 75.25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนผลการเปรียบเทียบความความสามารถในการก่อโรคต่อหนอน กระทู้ผักของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่า

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

เชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงที่ต่างกันมีความสามารถในการก่อโรคแก่แมลงที่ทดสอบอย่างมีนัยสำคัญ (P = 0.01) ดังข้อมูลซึ่งแสดงในตารางที่ 4.10 ทั้งนี้จากการทดลองพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การก่อโรคมีค่าอยู่ระหว่าง 47.36 - 74.96 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อ *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุกสามารถก่อโรคได้ในระดับสูงสุด และที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสุนัขสามารถก่อโรคได้ในระดับต่ำสุด

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
Potato Dextrose Agar (PDA)	86.00 ± 2.74b
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	82.00 ± 2.55b
SDA with Yeast Extract (SDAY)	94.20 ± 4.02a
Malt Extract Agar (MEA)	84.20 ± 3.19b
Nutrient Agar (NA)	78.80 ± 4.66c
Water Agar (WA)	ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้เพียงพอสำหรับการทดสอบ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
ข้าวสวย	87.40 ± 2.51a
ข้าวเปลือก	79.80 ± 1.64b
ข้าวฟ่าง	96.00 ± 2.92a
อาหารสุนัข	83.00 ± 2.00b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
Potato Dextrose Agar (PDA)	63.80 ± 5.26b
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	65.40 ± 2.61b
SDA with Yeast Extract (SDAY)	79.00 ± 1.58a
Malt Extract Agar (MEA)	68.80 ± 3.35a
Nutrient Agar (NA)	63.80 ± 3.96b
Water Agar (WA)	ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้เพียงพอสำหรับการทดสอบ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
ข้าวสวย	63.40 ± 2.30c
ข้าวเปลือก	66.40 ± 2.88c
ข้าวฟ่าง	80.00 ± 2.00a
อาหารสุนัข	67.20 ± 3.11b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
Potato Dextrose Agar (PDA)	67.20 ± 4.15b
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	56.00 ± 3.81b
SDA with Yeast Extract (SDAY)	71.40 ± 3.85a
Malt Extract Agar (MEA)	50.60 ± 4.22c
Nutrient Agar (NA)	49.60 ± 5.68c
Water Agar (WA)	ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้เพียงพอสำหรับการทดสอบ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

ตารางที่ 4.10 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) จากการได้รับเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10^{10} สปอร์ต่อมิลลิลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ ± SD)
ข้าวสวย	65.40 ± 4.56b
ข้าวเปลือก	56.00 ± 2.00c
ข้าวฟ่าง	72.60 ± 2.30a
อาหารสุนัข	48.20 ± 0.84d

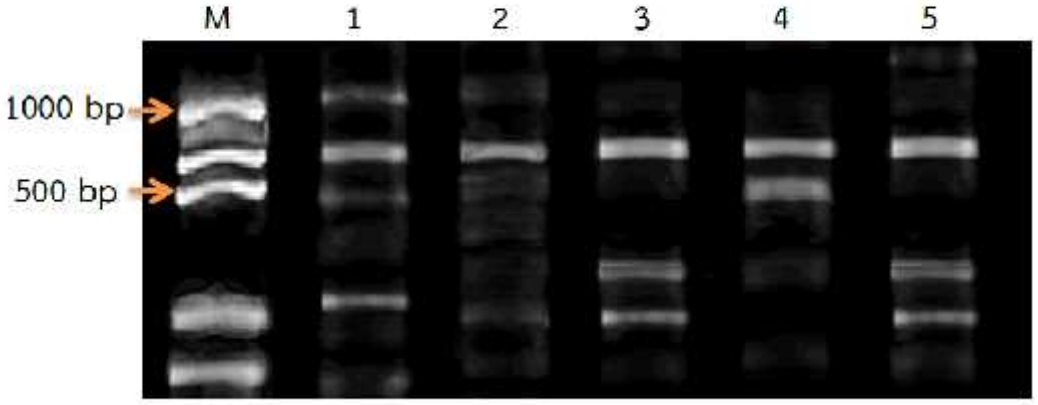
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

4.3 ผลของอาหารเทียมในระดับโมเลกุลและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อตัวชี้วัดในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01

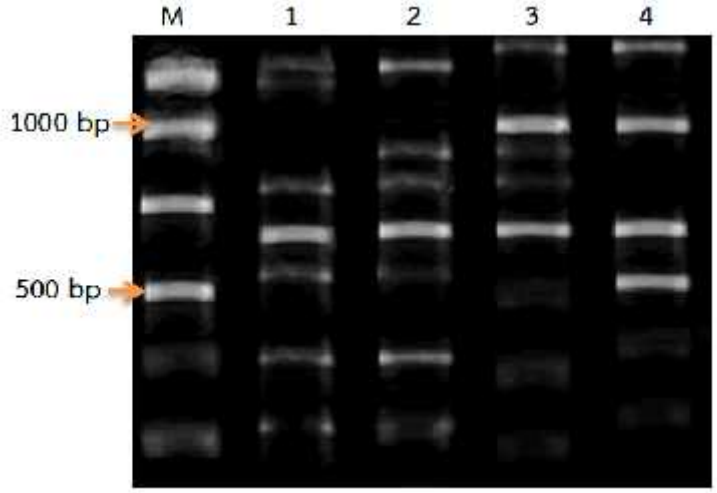
4.3.1 ผลของอาหารเทียมในระดับโมเลกุลและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01

ผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยตัวชี้วัด RAPD-PCR โดยใช้ RAPD primer; OPA-3 OPB-10 และ Universal primer (ITS4) ตามลำดับ พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหารเทียมชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) (1), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (2), Potato Dextrose Agar (PDA) (3), Malt Extract Agar (MEA) (4) และ Nutrient Agar (NA) (5) มีลักษณะพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน โดยพบว่าสามารถสร้าง (generated) แถบ DNA จำนวน 5 แถบ ขนาดตั้งแต่ 500-1000 คู่เบส (ภาพที่ 4.1) ส่วนเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งเพาะเลี้ยงบนวัสดุเพาะเลี้ยงต่างชนิดกันซึ่งตรวจสอบพันธุกรรมด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงโดยใช้วัสดุเพาะเลี้ยงข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข (4) มีลักษณะพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 ผลผลิต RAPD-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (M) และพันธุกรรมของ *B. bassiana* กลุ่มที่หนึ่งซึ่งมีพันธุกรรมไม่แตกต่าง ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จาก Potato Dextrose Agar (PDA) (1), Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (2), Potato Dextrose Agar (PDA) (3), Malt Extract Agar (MEA) (4) และ Nutrient Agar (NA) (5) ตามลำดับ โดย M หมายถึงตัวชี้วัดขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 500-1000 คู่เบส

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



ภาพที่ 4.2 ผลผลิต RAPD-PCR ซึ่งใช้ ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (M) และพันธุกรรมของ *B. bassiana* กลุ่มที่หนึ่งซึ่งมีพันธุกรรมไม่แตกต่าง ได้แก่ เชื้อราที่แยกได้จาก ข้าวสวย (1) ข้าวเปลือก (2) ข้าวฟ่าง (3) และ อาหารสุนัข (4) ตามลำดับ โดย M หมายถึงตัวชี้วัดขนาดโมเลกุล ตั้งแต่ 500-1000 คู่เบส

4.3.2 ผลของอาหารเทียมในระดับโมเลกุลและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่น ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01

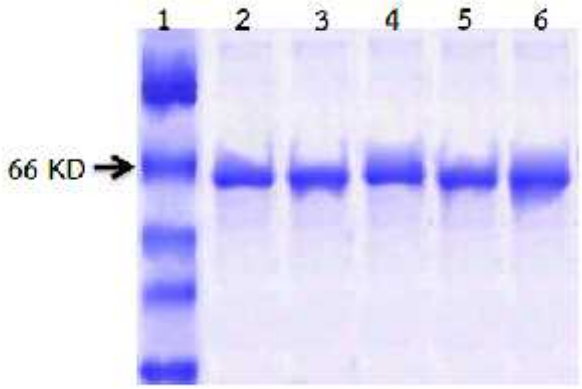
4.3.2.1 การตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ที่ผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

หลังจากการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* บนอาหารเทียมชนิดต่างๆ ซึ่งผ่านการตรวจสอบเบื้องต้นว่าเป็นอาหารเทียมซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหัวเชื้อราดังกล่าวได้ในระดับที่เพียงพอ เพื่อการตรวจสอบตรวจยืนยันการสร้างเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อความสามารถในการก่อโรค และจากสมมุติฐานที่ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อราและวัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อระดับการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นก่อนจะทำการดำเนินการวัดระดับเอนไซม์เพื่อเปรียบเทียบ ทางคณะผู้ศึกษาจึงทำการตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิด โดยวิธี acrylamide gel electrophoresis ใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถตรวจสอบยืนยันได้ว่า เชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียมทั้ง 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA) และ Nutrient Agar (NA) ผลิตเอนไซม์ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 66 KD ในระดับที่สามารถตรวจสอบได้ ดังแสดงในภาพที่ 4.3 และ 4.4

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

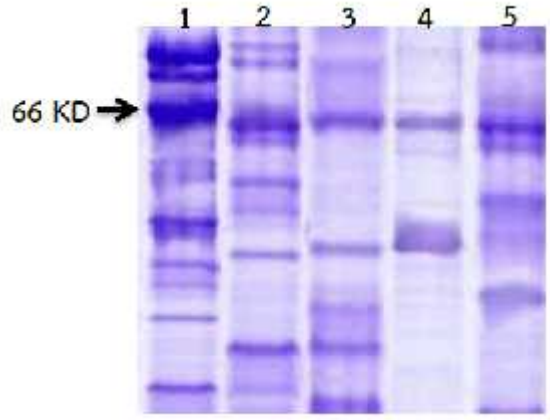
4.3.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์ ที่ผลิตจากเชื้อซึ่งเจริญบนอาหารเทียมและวัสดุเพาะชนิดต่างๆ

จากการวัดปริมาณการผลิตเอนไซม์ protease ซึ่งผลิตจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งสามารถวัดได้จากการเกิดกิจกรรมการย่อยสลาย casein ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีน ในห้องปฏิบัติการ ชี้ให้เห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อรา รวมทั้งวัสดุเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์นี้อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.01$) ปริมาณการผลิต protease บนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.69 หน่วยต่อมิลลิลิตร (เลี้ยงเชื้อราบนอาหาร PDA) ถึง 2.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร (U/ml) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อราที่เชื้อเจริญและสามารถผลิต protease ได้สูงได้แก่ SDA with Yeast Extract (SDAY) ซึ่งสามารถผลิตได้ไม่แตกต่างจากเชื้อราที่เลี้ยงบน Malt Extract Agar (MEA) (ตารางที่ 4.11) ส่วนวัสดุเพาะที่เชื้อ *B. bassiana* สามารถผลิต เอนไซม์ protease ได้ในระดับสูงที่สุด คือ อาหารสุนัข (1.86 ± 0.08 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับระดับกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงด้วยเมล็ดข้าวฟ่างนึ่ง (1.79 ± 1.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร) และโดยรวมเชื้อ ที่เจริญบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ มีระดับการผลิต อยู่ระหว่าง 1.07 หน่วยต่อมิลลิลิตร (เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวย) ถึง 1.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร (เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสุนัข) (ตารางที่ 4.12)



ภาพที่ 4.3 ผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis โดยใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง แถบที่ 1 คือ protein marker ส่วนแถบที่ 2, 3, 4, 5 และ 6 คือโปรตีนที่สกัดจากเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA) และ Nutrient Agar (NA) ตามลำดับ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ด้วยวิธี acrylamide gel electrophoresis โดยใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย Coomassie brilliant blue R – 250 นาน 3 ชั่วโมง แถบ ที่ 1 คือ protein marker ส่วนแถบที่ 2, 3, 4 และ 5 คือโปรตีนที่สกัดจากเชื้อ ที่เพาะเลี้ยงด้วยข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข ตามลำดับ

ตารางที่ 4.11 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเจริญบนอาหารเทียมชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร $\pm$ SD)
Potato Dextrose Agar (PDA)	0.85 $\pm$ 0.16c
Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	1.43 $\pm$ 0.08a
SDA with Yeast Extract (SDAY)	1.99 $\pm$ 0.09b
Malt Extract Agar (MEA)	1.91 $\pm$ 0.06a
Nutrient Agar (NA)	1.32 $\pm$ 0.08b
Water Agar (WA)	ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้เพียงพอสำหรับการทดสอบ

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ตารางที่ 4.12 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease ที่ผลิตจากเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเจริญบนวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ

วัสดุเพาะ	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร ± SD)
ข้าวสวย	1.40 ± 0.25b
ข้าวเปลือก	1.17 ± 0.10c
ข้าวฟ่าง	1.79 ± 0.16a
อาหารสุนัข	1.86 ± 0.08a

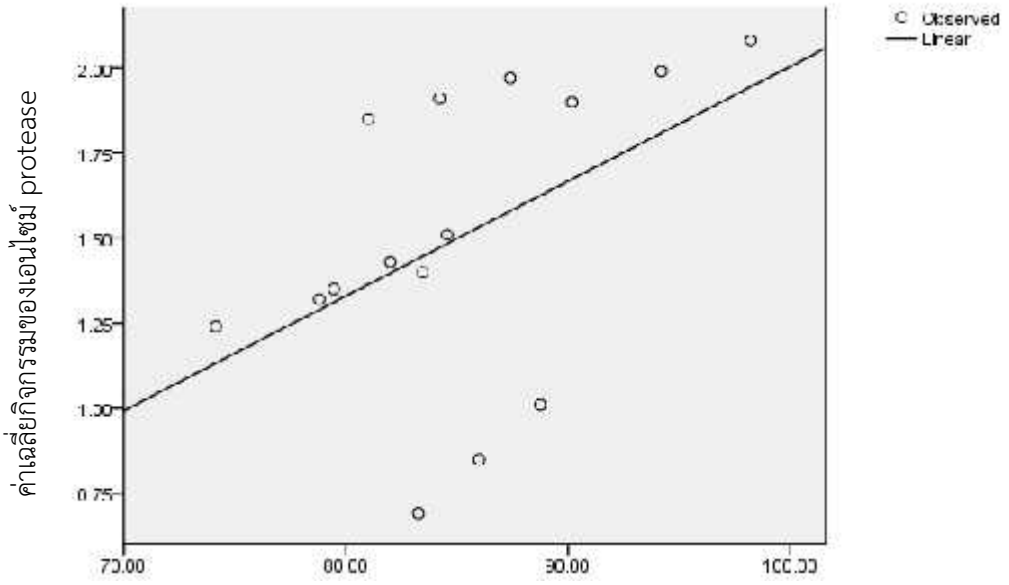
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± SD จากการทำซ้ำ วิธีทดลองละ 5 ซ้ำ ซึ่งตามด้วยอักษรต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับช่วงความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT

4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์ protease

จากการนำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ซึ่งได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA) Sabouraud Dextrose Agar (SDA) SDA with Yeast Extract (SDAY) Malt Extract Agar (MEA) Nutrient Agar (NA) มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรค กับแมลงเป้าหมายทั้งสามชนิด (เพลี้ยอ่อนผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก) โดยการใช้สมการถดถอย (regression equation) ตามวิธีของ LeClerg*et al*. (1966); Snedecor and Cochran (1967) และ Wadley (1967) พบว่าในภาพรวมการเพิ่มขึ้นของกิจกรรรมของเอนไซม์ protease มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อแมลงเป้าหมายแต่ละชนิดซึ่งได้แก่ เพลี้ยอ่อนผัก และด้วงหมัดผักโดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เป็น 0.42 และ 0.438 ตามลำดับซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับการก่อโรคมีแนวโน้มเพิ่มตามการเพิ่มปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์ในกรณีของการศึกษากับหนอนกระทู้ผักซึ่งค่าพบสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เป็น 0.01 ดังนั้นแนวโน้มความสัมพันธ์อาจไม่เป็นเช่นเดียวกันกับผลการทดสอบกับแมลงในเป้าหมายสองตัวแรกที่กล่าวมา (ภาพที่ 4.5 – 4.7) ส่วนผลการนำข้อมูลค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ protease และความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงในวัสดุเพาะ ซึ่งได้แก่ ข้าวสวยข้าวเปลือก ข้าวฟ่างและอาหารสุนัข มาหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการสร้างเอนไซม์ protease กับเปอร์เซ็นต์การก่อโรค กับแมลงเป้าหมายทั้งสามชนิด โดยการใช้สมการถดถอย (regression equation) พบว่าในกรณีของแมลงในเป้าหมายจำนวน 2 ชนิดซึ่งได้แก่ เพลี้ยอ่อนผัก และด้วงหมัดผัก การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ protease มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เป็น 0.447 และ 0.772 ตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่าระดับการก่อโรคมี

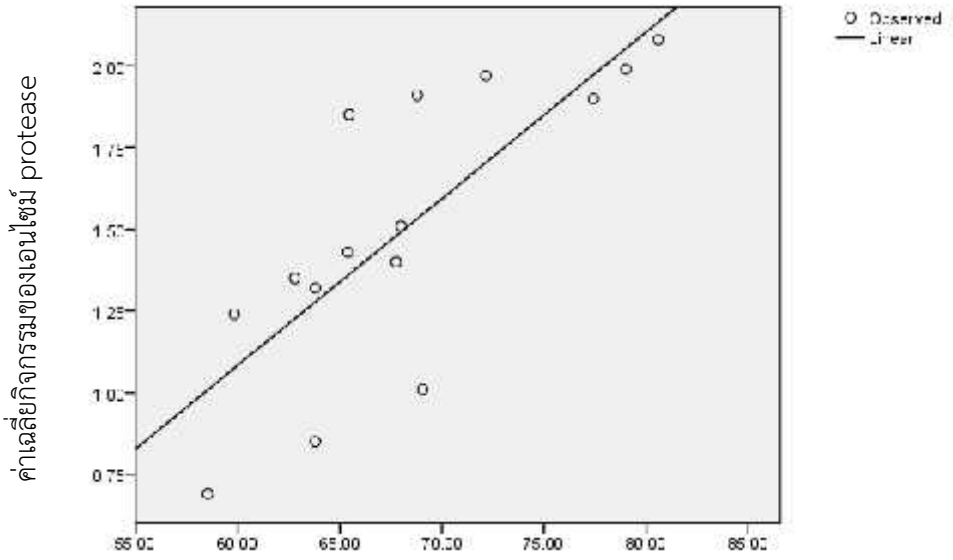
Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

แนวโน้มเพิ่มตามการเพิ่มปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วนในกรณีของหนอนกระทู้ผัก ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เป็น 0.027 ดังนั้นแนวโน้มความสัมพันธ์จึงอาจไม่เป็นเช่นเดียวกับผลการทดสอบกับแมลงสองชนิดแรกที่กล่าวมา (ภาพที่ 4.8 – 4.10)

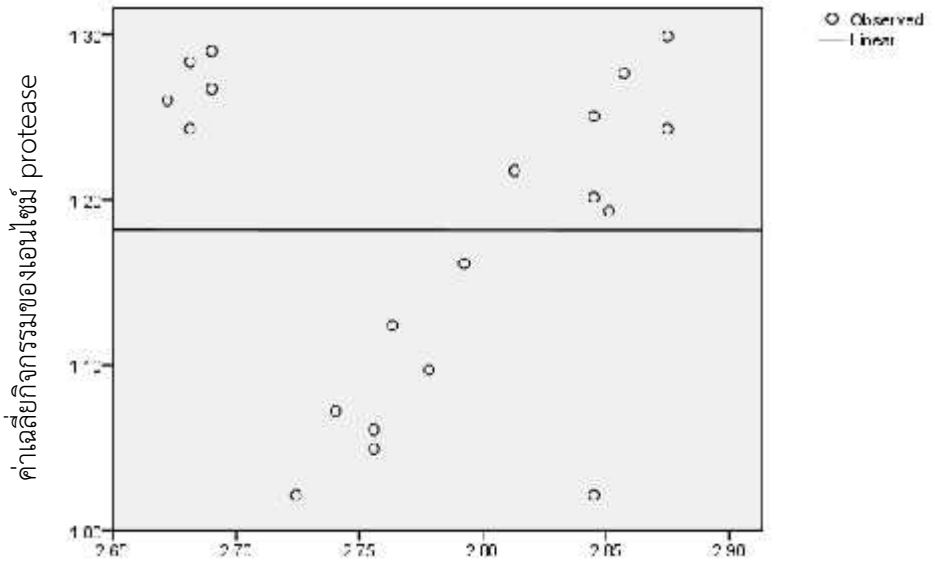


ภาพที่ 4.5 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

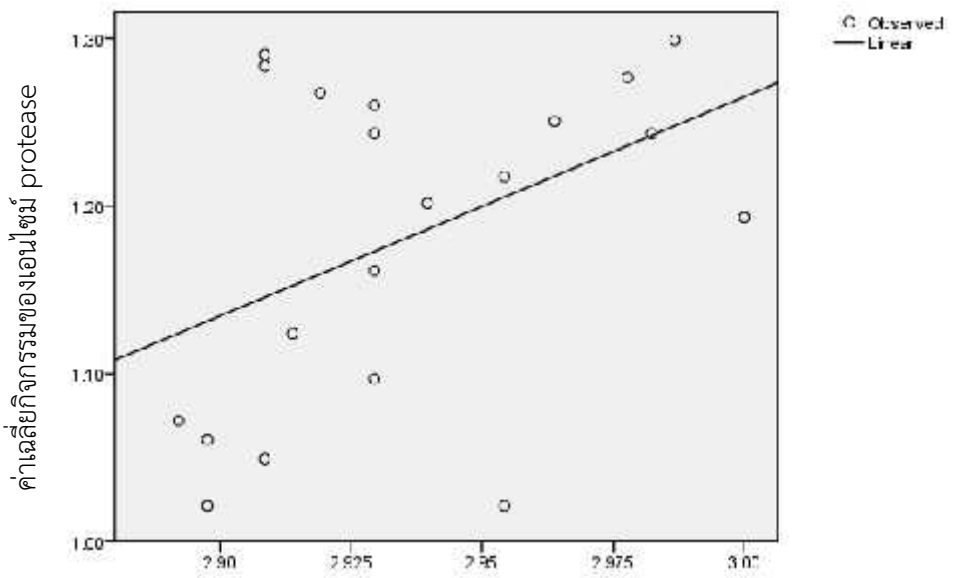


ภาพที่ 4.6 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา*Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*)

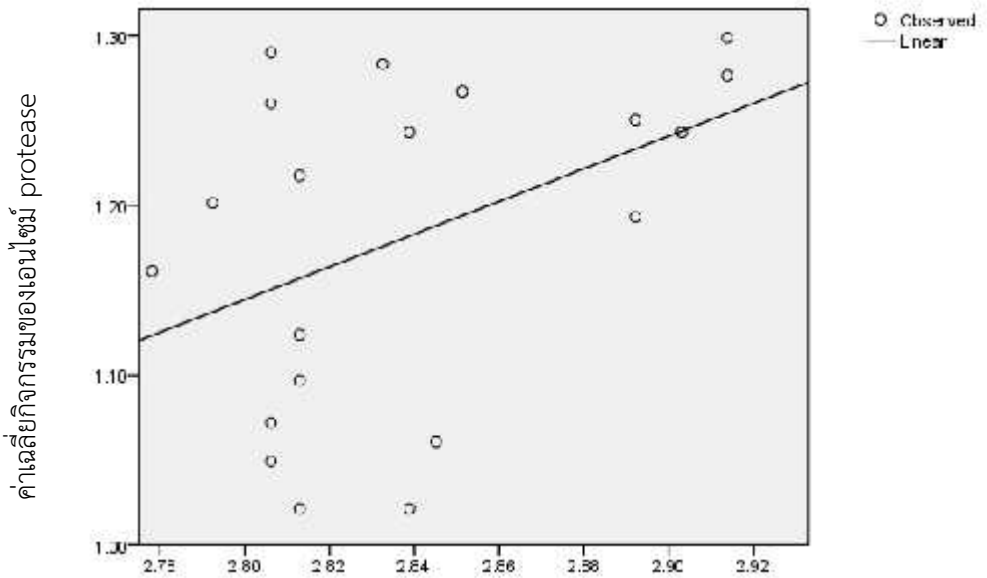


ภาพที่ 4.7 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา*Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

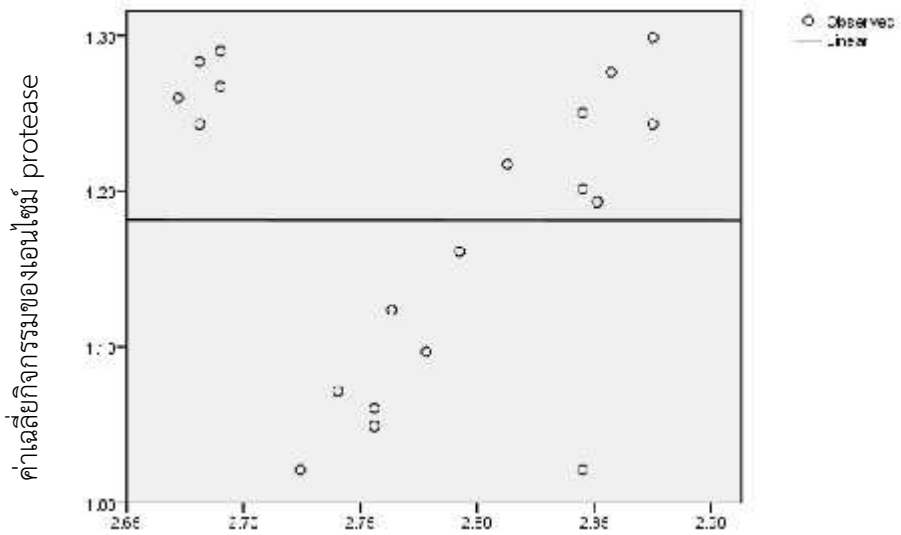


ภาพที่ 4.8 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*)



ภาพที่ 4.9 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการก่อโรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



ภาพที่ 4.10 กราฟจากสมการถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ซึ่งแสดงแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างระดับกิจกรรมของเอนไซม์ Protease ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะชนิดต่างๆ กับระดับความสามารถในการ ก่อ โรค (ค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสม) ต่อหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่นซึ่งเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 จากอาหารที่ใช้ทดสอบจำนวน 6 ชนิดได้แก่ Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) และวัสดุเพาะที่หาได้ในประเทศ ได้แก่ ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข โดยพิจารณาอัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยว และปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่าเชื้อสามารถขยายเส้นรอบวงของโคโลนีได้เร็วที่สุดบนอาหาร NA (3.04 $\pm$ 0.17) วัสดุเพาะที่เส้นใยของเชื้อสามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีที่สุดได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุก (98.80$\pm$1.09) สำหรับการวัดการสร้างสปอร์พบว่าเชื้อมีการสร้างสปอร์สูงสุดบนอาหารเทียมสูตร Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (8.80 $\pm$ 0.55 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง (11.49 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ส่วนการศึกษาผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะต่อความรุนแรงในการก่อโรค กับเพลี้ยอ่อนผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก พบว่าชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะมีผลต่อความสามารถในการก่อโรคโดย *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร SDAY สามารถก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผักได้สูงสุด (94.20 $\pm$ 4.02 เปอร์เซ็นต์) ด้วงหมัดผัก (79.00$\pm$1.58 เปอร์เซ็นต์) และ หนอนกระทู้ผัก (71.40$\pm$3.85 เปอร์เซ็นต์) *B. bassiana* เชื้อที่เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสามารถก่อโรคแก่แมลงทั้งสามชนิดได้สูงสุด (96.00 $\pm$ 2.92 8.00 $\pm$ 2.00 และ 72.6 $\pm$ 2.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ส่วนการตรวจสอบผลของอาหารเทียม และวัสดุเพาะต่อพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) จากตัวชี้วัด RAPD-PCR ที่ใช้ RAPD primer; OPA-3 OPB-10 และ Universal primer (ITS4) แสดงให้เห็นว่าเชื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมและวัสดุเพาะต่างชนิดกัน มีลักษณะพันธุกรรมไม่แตกต่างกัน อีกทั้งสามารถตรวจสอบพบว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ protease ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bs01 โดยปริมาณการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อราดังกล่าวมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และ/ หรือ วัสดุเพาะ กล่าวคือเชื้อราสามารถผลิตอาหารเอนไซม์ protease ได้ดีที่สุดบนอาหารเทียม และวัสดุเพาะ ตามลำดับ นอกจากนั้นผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ยังแสดงแนวโน้มให้เห็นว่าปริมาณการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียม มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับความสามารถในการก่อโรคต่อเพลี้ยอ่อนผัก และ ด้วงหมัดผัก หรืออาจกล่าวได้ว่าระดับความสามารถในการก่อโรคเพิ่มขึ้นตามระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease โดยระดับค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์คือ 0.438 และ 0.420 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามในกรณีของหนอนกระทู้ผัก ที่พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์คือ 0.01 ซึ่งเป็นค่าเข้าใกล้ศูนย์ โดยอาจหมายถึงการไม่เกิดความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่วิเคราะห์ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อข้อมูลที่วัดในโอกาสต่อไป เช่นเดียวกันในกรณีของการวัดระดับความสัมพันธ์ระหว่างระดับความสามารถในการก่อโรคกับ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

แมลงในเป้าหมายของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะชนิดต่างๆ ที่ให้ผลสอดคล้องกับกรณีการศึกษาโดยใช้อาหารเทียม กล่าวคือค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความสามารถในการก่อโรคกับแมลงในเป้าหมายสองชนิดแรกซึ่งคือ เพลี้ยอ่อนผัก และด้วงหมัดผัก แสดงแนวโน้มให้เห็นว่า การผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อที่เพาะในวัสดุเพาะ มีแนวโน้มแปรผันตามกันในเชิงบวกกับระดับความสามารถในการก่อโรคต่อแมลงทั้งสองชนิด (ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เป็น 0.470 และ 0.772) และกรณีของการทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.027 ซึ่งเป็นค่าที่ไม่สามารถระบุแนวโน้มความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ชัดเจนในเชิงสถิติ ดังนั้น ในผลการทดสอบกับแมลงดังกล่าวอาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง จึงอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยละเอียดต่อไป

5.2 อภิปรายผล

ผลของอาหารเทียม Potato Dextrose Agar (PDA), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Sabouraud Dextrose Agar Supplemented with Yeast Extract (SDAY), Malt Extract Agar (MEA), Nutrient Agar (NA) และ Water Agar (WA) และวัสดุเพาะเลี้ยงที่หาได้ในท้องถิ่น (ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข) ต่อการเจริญ และการสร้างสปอร์ ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยว และปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *B. bassiana* ในกรณีของอัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยว จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 จะพบความไม่สอดคล้องกันของผลการศึกษา กล่าวคือ อัตราการเจริญของโคโลนีเดี่ยว ต่อ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราสามารถขยายเส้นรอบวงของโคโลนีได้เร็วที่สุดบนอาหาร NA (3.04 ± 0.17) แต่ไม่แตกต่างตามนัยทางสถิติจากการเจริญบนอาหาร MEA ($p = 0.01$) ส่วนปริมาณการสร้างสปอร์ต่อหน่วยมิลลิลิตรของสารแขวนลอยสปอร์ ในผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า ข้าวฟ่างนึ่งซึ่งปลอดเชื้อมีความเหมาะสมต่อการนำไปผลิตสปอร์ของเชื้อรา ทั้งนี้ปริมาณการผลิตสปอร์ของเชื้อราโรคแมลงนับว่าเป็นส่วนสำคัญอย่างมากต่อการนำเชื้อราไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งมีอิทธิพลต่อความสามารถในการก่อโรคในเชิงปริมาณ (Fargues *et al*., 1994, pp. 173-178) ในการศึกษาครั้งนี้ปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDA เป็นวิธีที่ให้ค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์สูงสุด (8.80 ± 0.55 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ในส่วนนี้หลังจากการสังเกตลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา พบว่าแม้ว่าเชื้อราจะขยายเส้นผ่าศูนย์กลางได้รวดเร็วบนอาหาร NA และหรือ MEA แต่เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะฟู รวมตัวเป็นโคโลนีโดยไม่อัดแน่น ซึ่งแตกต่างจากเชื้อราที่เจริญบนอาหาร SDA และ SADY ซึ่งเส้นใยมีการเจริญอัดแน่นกันบนโคโลนี ซึ่งจุดนี้น่าจะเป็นการส่งผลให้เชื้อราที่เจริญบนอาหารดังกล่าวสามารถสร้างสปอร์ได้ในปริมาณที่สูงกว่า เนื่องจากมีปริมาณเส้นใย ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของส่วนสืบพันธุ์เช่น conidiophore และสปอร์ได้มากกว่า

ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และ อาหารสุนัข เป็นวัสดุเพาะเลี้ยงที่สามารถหาได้ในท้องถิ่น รวมทั้งมีราคาไม่สูง หากสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* อย่างเหมาะสมอีกทั้งหากมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ยืนยันถึงความเหมาะสมแล้ว จะเป็นผลดีอย่างมากสำหรับการนำไปใช้ผลิตเชื้อรา *B. bassiana* เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูผักอย่างปลอดภัย ในระบบเกษตร หลังจากพิจารณาตัวชี้วัดสองปัจจัยได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเจริญของเชื้อราและปริมาณการสร้าง

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

สปอร์บนวัสดุเพาะเลี้ยงซึ่งมีปริมาณ 150 กรัม ซึ่งผลชี้ให้เห็นว่าวัสดุเพาะเลี้ยงที่เส้นใยของเชื้อราสามารถครอบครองพื้นที่ได้ดีที่สุดได้แก่ เมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุก และ/หรือ ข้าวสวย (98.80±1.09 และ 94.60±3.65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยในที่นี้ผลสอดคล้องกับการวัดปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราในวัสดุเพาะซึ่งพบว่ามีเชื้อรามีการสร้างสปอร์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงบนเมล็ดข้าวฟ่าง (11.49 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) และรองมาคือข้าวสวย (10.20±1.30 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติตามลำดับ (ตารางที่ 4.3 และ 4.4) ดังนั้นในเบื้องต้น วัสดุดังกล่าวจึงนับว่ามีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana*

มีรายงานหลายรายงานอ้างว่าความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรามีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับไอโซเลทของเชื้อรา และชนิดของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ (Alves *et al*., 2002, pp. 70-77; Moino *et al*., 1998, pp. 301-305) การศึกษาครั้งนี้ได้วัดผลของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณต่อความสามารถในการก่อโรคกับแมลงศัตรูพืชของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งนับเป็นตัวชี้วัดเชิงปริมาณที่วัดได้จากการประเมินเปอร์เซ็นต์การก่อโรค โดยค่าเปอร์เซ็นต์การตายสะสมในเวลา 7 วัน กับแมลงศัตรูผักที่พบเป็นประจำสามชนิด คือ เพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi*) ด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) และหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) เป็นอีกผลการวิจัยหนึ่งที่ยืนยันว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน มีระดับความสามารถในการก่อโรคแตกต่างกันโดยนัยทางสถิติ (ตารางที่ 4.5 -4.9) จากตารางที่ 4.5 การก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผักของเชื้อรา *B. bassiana* ที่เลี้ยงบนอาหาร SDAY สามารถก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผักได้สูงสุด (98.22 เปอร์เซ็นต์) และค่าต่ำสุดคือเชื้อราที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร NA (74.14 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการทดสอบความรุนแรงในการก่อโรคแก่ หนอนกระทู้ผักซึ่งผลชี้ให้เห็นว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงบน SDAY สามารถก่อโรคได้สูงสุด (43.92 – 75.25 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.7) รวมทั้งด้วงหมัดผัก ที่เชื้อราที่ได้มาจากการเลี้ยงบนอาหาร SDAY สามารถก่อโรคแก่ด้วงหมัดผักได้ดีที่สุด (79 ± 1.58 เปอร์เซ็นต์) (ตารางที่ 4.9) อนึ่งเมื่อนำเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ที่เพาะเลี้ยงด้วยวัสดุเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 4 ชนิด (ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข) ดังข้อมูลซึ่งแสดงในตารางที่ 4.6, 4.7 และ 4.8 เชื้อราที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสามารถก่อโรคแก่เพลี้ยอ่อนได้สูงสุด (96.00 ± 2.92 เปอร์เซ็นต์) โดยมีความสอดคล้องกับผลการทดสอบใน ด้วงหมัดผัก และหนอนใยผัก ซึ่งผลโดยรวมจากการศึกษาส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่าอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงมีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา และมีความสอดคล้องกับการศึกษาที่รายงานก่อนหน้าที่มีการวัดและทดสอบจากอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด casein media + ไข่, casein media + bovine serum albumin และ casein media + gelatin เป็นต้น โดยรายงานเหล่านี้ระบุว่าเชื้อราแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการก่อโรคแก่แมลงแต่ละชนิดแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงรวมทั้งอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา (Lane *et al*. 1991, pp. 829-833; Steinhaus,1967, 756 pp.) และถึงแม้ว่าจะมีรายงานอ้างว่าระดับความรุนแรงถูกควบคุมโดยลักษณะพันธุกรรม (Zhang *et al*., 2009, pp. 787-795) ในการศึกษานี้ได้มีการตรวจสอบพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยวิธี RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs) ผลการศึกษาพบว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุเพาะเลี้ยงไม่มีผลต่อแบบพันธุกรรม (genotype) ของเชื้อราดังกล่าว ซึ่งในที่นี้อาจตีความเบื้องต้นได้ว่า อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงไม่มีผลทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม แม้ว่าระดับ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ความรุนแรงของเชื้อราจะถูกควบคุมโดยพันธุกรรมเป็นหลักก็ตาม ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจหาปัจจัยอื่นที่อาจได้รับผลจากชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ มีรายงานยืนยันว่ากิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *B. bassiana* มีความแตกต่างกันโดยได้รับอิทธิพลจากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ (strain) สถานที่ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของเชื้อ (geographical origin) รวมทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Kucera, 1971, pp. 211-215) ในการศึกษานี้จึงได้พิสูจน์สมมุติฐานที่ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อและวัสดุเพาะที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อระดับการสร้างเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวชี้วัดในระดับโมเลกุลโของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 รวมทั้งมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับประสิทธิภาพของเชื้อในการก่อโรค แก่แมลง โดยเอนไซม์ protease นับเป็นเอนไซม์ที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อความสามารถในการก่อโรค (Inglis *et al*., 2011, pp. 23-69) ซึ่งในการศึกษานี้ในปีงบประมาณ 2555 ได้มีการการตรวจพบและยืนยันการสร้างเอนไซม์ที่ผลิตบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา (PDA, SDA, SDAY, NA และ MEA) และวัสดุเพาะเลี้ยง (ข้าวสวย ข้าวเปลือก ข้าวฟ่าง และอาหารสุนัข) แต่ละชนิดโดยใช้วิธี acrylamide gel electrophoresis ใช้ SDS-PAGE 12.5 เปอร์เซ็นต์ และ protein marker ขนาด 66 KD ชี้ให้เห็นว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวบนอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงทุกชนิดที่ทดสอบ (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) ซึ่งจากผลการศึกษาในระยะที่สองนี้ พบว่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์ protease ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดระดับการผลิตเอนไซม์ดังกล่าวนั้น มีความแตกต่างกันตามชนิดของอาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา และ/หรือ วัสดุเพาะเลี้ยง ซึ่งได้แก่ SDA with Yeast Extract (SDAY) (1.99 $\pm$ 0.99 หน่วย) ซึ่งไม่แตกต่างจากการเลี้ยงด้วย Malt Extract Agar (MEA) (1.91 $\pm$ 0.06) และอาหารสุนัข (1.86 $\pm$ 0.08) ซึ่งไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงในเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุก (1.79 $\pm$ 0.16) และในเรื่องนี้ได้มีรายงาน ชี้ว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อรามีผลต่อความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* (Fan *et al*. 2007, pp. 295 - 302) โดยในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการวิเคราะห์ระดับความสัมพันธ์ระหว่างระดับการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ protease มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับระดับความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 โดยมีการทดสอบสองการทดลองได้แก่การใช้อาหารเทียมชนิดต่างๆ และวัสดุเพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ ซึ่งเหล่านี้ให้ผลการวิเคราะห์ในแนวโน้มเดียวกันกล่าวคือ อาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงมีความสัมพันธ์กับการก่อโรคต่อเพลี้ยอ่อนผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก ในเชิงบวก กล่าวคือเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 จะสามารถก่อโรคเพิ่มขึ้นเมื่อมีการผลิตเอนไซม์ protease

5.3 ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

หลังจากการตรวจสอบในระดับห้องปฏิบัติการซึ่งได้รับผลว่า ชนิดของอาหารเทียม และวัสดุเพาะมีผลอัตราการเจริญของเส้นใยและปริมาณการสร้างสปอร์ และระดับความสามารถในการก่อโรคของต่อแมลงเป้าหมาย ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างปลอดภัย ดังนั้นผลการวิจัยในส่วนนี้จึงสามารถที่จะนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราชนิดนี้ทั้งในการผลิตหัวเชื้อราในอาหารเทียม รวมทั้งการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณของเชื้อราเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในการฉีดพ่นในแปลง ทั้งในระดับงานวิจัย และการทำการเกษตร กล่าวคือหากผู้ปฏิบัติงานต้องการเพาะเลี้ยงเพื่อ

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

เพิ่มปริมาณเส้นใย เช่นเพื่อการทดสอบหรือสกัดสารบางชนิด จากเส้นใยโดยเฉพาะ ควรใช้อาหารเทียม Malt Extract Agar (MEA) หรือ Nutrient Agar (NA) แต่หากต้องการเพิ่มปริมาณสปอร์ในการศึกษาควรใช้อาหารเทียม Sabouraud Dextrose Agar (SDA) ส่วนวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์เพื่อนำไปใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณของเชื้อรานี้ได้แก่ ข้าวฟ่างนึ่ง และข้าวสวย ที่ต้องมีการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และหากพิจารณาด้านชีวโมเลกุลอาหารเทียม SDA with Yeast Extract (SDAY) และ/หรือ Malt Extract Agar (MEA) รวมทั้ง อาหารสุนัข (1.86 $\pm$ 0.08) และ/หรือ เมล็ดข้าวฟ่างนึ่งสุก (1.79 $\pm$ 0.16) คืออาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการนำไปเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 เนื่องจากอาหารเทียมและ/หรือ วัสดุเพาะเลี้ยงเหล่านี้สามารถนำไปผลิตเชื้อราที่มีระดับความรุนแรงในการก่อโรคและที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ protease ได้ดี

5.4 ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับผลในการศึกษาทั้งในระดับลักษณะปรากฏ (phenotype) และระดับแบบชนิดพันธุกรรม (genotype) ที่เป็นข้อมูลสำหรับการต่อยอดที่จะสามารถยืนยันว่าชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงมีผลต่อระดับความรุนแรงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bbs01 หรือไม่และมีผลอย่างไร โดยผลในระยะแรกชี้ให้เห็นว่า ชนิดของอาหารเทียมและวัสดุเพาะเลี้ยงที่ใช้ผลิตหัวเชื้อรามีผลต่อการเจริญของเส้นใย การผลิตสปอร์ แต่ไม่มีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อรา และในระยะขยายผล พบว่าเอนไซม์ protease เป็นปัจจัยระดับชีวโมเลกุลที่ส่งผลต่อระดับการก่อโรคต่อ เพลี้ยอ่อนผัก ด้วงหมัดผัก และหนอนกระทู้ผัก โดยปริมาณการผลิตเอนไซม์ protease มีความสัมพันธ์กันในเชิงบวกกับชนิดของอาหารเทียม และ/หรือ วัสดุเพาะเลี้ยงที่ใช้เพิ่มปริมาณเชื้อรา โดยการวิจัยในครั้งต่อไปเนื่องจากการพบว่า ซึ่งนอกจากนี้ ยังเป็นที่สังเกตด้วยว่าการทดสอบในวัสดุเพาะเลี้ยงยังมีระดับความสัมพันธ์ (วัดโดยค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์, R) ในระดับที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับผลการวิเคราะห์ในกรณีของอาหารเทียม ซึ่งในกรณีนี้ควรที่จะมีการศึกษาโดยละเอียดต่อไปในอนาคตเนื่องจากอาจสามารถตอบคำถามที่ว่าวัสดุเพาะเลี้ยงอาจมีผลต่อระดับการผลิตเอนไซม์ protease ของเชื้อรานี้มากกว่า

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

มลิวัลย์ ปันยารชุน และ สุรพล ตรุยานนท์. (2537). *รายงานผลวิจัยก้าวหน้าการใช้เชื้อราเขียวควบคุมด้วงแรดมะพร้าวในท้องที่ประสบวาตะภัยจากพายุเกย์.* ใน *รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยประจำปี 2537 (น.6-15).* กรุงเทพฯ: กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

มลิวัลย์ ปันยารชุน. (2539). *การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยเชื้อรา. ใน: เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน* (หน้า183 –197). กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

มาลี สุวรรณอัตถ์. (2543). *ทรัพยากรจุลินทรีย์กับความหลากหลายทางชีวภาพ. จดหมายข่าวศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ 2*(1): 5 หน้า.

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และ ศมาพร แสงยศ. (2549). *ชนิดและการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคแมลงศัตรูพืชผักวงศ์กะหล่ำในตำบลโคกโคเฒ่า อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี.* ใน *เอกสารการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 6: กำหนดการประชุมและบทคัดย่อ: สู่นวัตกรรมพืชสวนไทย เพื่ออาหารปลอดภัยและเศรษฐกิจพอเพียง.* เชียงใหม่, 2549, หน้า 375.

รุ่งเกียรติ แก้วเพชร และ ศมาพร แสงยศ. (2553). *การประยุกต์ใช้เชื้อรา Beauveria bassiana สายพันธุ์ท้องถิ่นในการควบคุมศัตรูพืชเพื่อการผลิตผักวงศ์กะหล่ำปลอดภัยจากสารพิษ. รายงานวิจัยปี 2553.* กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต. 71 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (2554). *นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555-2559).* กรุงเทพฯ: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 90 หน้า

สิริพงศ์ 2508 (หน้า 7)

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. *J.Econ.Entomol., 18*, 265 –267.

Alves, S. B., Rossi, L. S., Lopes, R. B.,Tamai, M. A. & Pereira, R. M. (2002). *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrate Pathology, 81,* 70–77.

Appropriate Technology Transfer for Rural Areas (ATTRA). (2007). *Organic greenhouse vegetable production.* Retrieved October 8, 2007, from http/www.attra.org.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Brad, S., Hellmich, R.L., & Lewis, L.C. (2002). Allelic variation of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is dependent of host range and geographic origin. *Genome 45,* 125-132.

Burges, H. D., & Hussey, N. W. (1971). *Microbial control of insect and mites.* London, UK: Academic Press.

Bidochka, M. J., Menzies, F. V., & Kamp, A. M. (2002). Genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana* are associated with habitat and thermal growth preferences. *Archives of Microbiology, 178,* 531–537.

Butt, T.M., Jackson, C.W., & Magan, N. (2001). *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. London, UK: CABI Publishing.

Castrillo, L.A., Vandenberg, J.D., & Wraight S.P. (2003). Strain specific detection of introduced *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence – characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 82(2): 75-83.

Copping, L.G. (2009). *The manual of biocontrol agents* (4th ed.). Hampshire, UK: BCPC.

Dias, B.A., Neves, P.M.O.J., Furlaneto-Maia, L., & Furlaneto, M.C. (2008). Cuticle – degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry cuticle. *Brazilian Journal of Microbiology 39*, 301-306.

Fan, Y., Fang, W., Guo, S., Pei, X., Zhang, Y., Xiao, Y., Li, D., Jin, K., Bidochka, M. J., & Pei, Y. (2007). Increased insect virulence in *Beauveria bassiana* strains overexpressing an engineered chitinase. *Applied and Environmental Microbiology, 73* (1), 295–302.

Fargues, J., Maniania, N.K. & Delmas, J.C., (1994). Infectivity of propagules of *Paecilomyces fumosoroseus* during in vitro development to *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Invertebrate Pathology, 64*, 173–178.

Goettel, M. S. and Inglis, D. G. (1997). Fungi: Hyphomycetes. *In* L. Lacey, Ed., *Manual of Techniques in Insect Pathology, (pp. 213–249).* London, UK: Academic Press.

Inglis, D.G., Goettel, M.S., Butt, T.M., & Strasser, H. (2001). Use of Hyphomyecete fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C.W.& Magan, N. (eds.*). Fungi as Biocontrol Agents-Progress Problems and Potential (pp. 23-69)*. Wallingford, UK: CAB International.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Kucera, M. (1971). Toxins of the entomophagous fungus *Beauveria bassiana*. II. Effect of nitrogen sources on formation of the toxic protease in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology, 17*, 211-215.

Kunitz, M. C. (1947). Soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. *Journal of General Physiology*. 30 (4), 291-310.

Lane, B.S., Trinci, A.P.J. & Gillespie, A.T. (1991). Influence of cultural conditions on the virulence of conidia and blastospores of *Beauveria bassiana* to the green leafhopper, *Nephotettix virescens*. *Mycological Research, 95*, 829–833.

Lacey, L.A. 1997. *Biological control techniques: Manual of techniques in insect pathology*. San Diego, USA: Academic Press.

Lewis, L. C., Berry, E.C. & Bing, K.G. (1996). Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin for European corn borer control program for immediate and season-long suppression. *Canadian Entomologist, 123*, 387-393.

LeClerg, E.L., Leonard, W.H. & Clark, A.G. (1966). 2nd ed. *Field plot technique*. Minneapolis, Minnesota: Burgess Publishing.

Lopez, L., Carbonell, L.V. & Salinas, J. (1999). Colonization of plant waste substrates by entomopathogenic and mycoparasitic fungi- a SEM study. *Micron, 3* (4), 325-333.

Maurer, P., Couteaudier,Y., Girard, P.A., Bridge, P.D., & Riba, G. (1997). Genetic diversity of *Beauveria bassiana* and relatedness to host insect range. *Mycological Research, 101*,159–164.

Moino Jr., A., Alves, S.B., & Pereira, R.M. (1998). Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. *Journal of Applied Entomology, 122*, 301–305.

Nugroho, I., & Ibrahim, Y. b. (2007). Efficacy of laboratory prepared wet able powder of entomopathogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisolliae* and *Paecilomyces fumisoroseus* against the *Polyphagosonemus latus* (Bank) (Acari: Tarsonemidae) (Broad mite) on *Capsicum annum* (Chilli). *Jurnal Biosains, 18* (1), 1–11.

Poinar, G.O. Jr., & Thomas, G.M. (1984). *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. New York, USA: Plenum Press.

Posada-Florez, F.J. (2008). Production of *Beauveria bassiana* fungal spores on rice to control the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Colombia. *Journal of Insect Science,* 8(41), 1-13.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Rodríguez-Gómez, Loera, D. O. , Saucedo-Castañeda, G., & Viniegra-González, G. (2009). Substrate influence on physiology and virulence of *Beauveria bassiana* acting on larvae and adults of *Tenebrio molitor*. *Microbiology and Biotechnology 25* (3), 513-518.

Snedecor, G. W., & Cochran, W.G.. (1967). *Statistical methods*. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press.

Saengyot, S., & Napompeth, B. (2007). Simple technique for mass propagation of *Bueaveria bassiana* for biological control in Thailand. *Journal of International Society of Southeast Asian Agricultural Sciences (ISSAAS), supplement,* 1- 7.

Sahayaraj, K., & Namasivayam, S. K. R. (2008). Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by- products. *African Journal of Biotechnology, 7*(12), 1907-1910.

Samules, K.D.Z. (1986). Genetical studies and strain selection in *Metarhizium anisopliae* (Metschnikof) Sorokin for the control of *Nilaparvata lugens* (Stal), the brown planthopper of rice. Unpublished doctoral dissertation. London, UK: London University.

Steinhaus, E.A. (1967). *Principles of insect pathology* (Facimile of the Edition of 1949). New York, USA: Hafner Publishing.

Tanada, Y. & Kaya, H.K. (1993). *Insect pathology*. San Diego, USA: Academic Press.

The European Nucleotide Archive (ENA) . (2011). *Beauveria bassiana cuticle-degrading proteinase CDEP-1 (cdep1) gene*. Retrieved 2011, October 31. From http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/Taxon:475271.

Tinzaara, W., Gold, C.S., Dicke, M., Van Huis, A., Nankinga, C.M., Kagezi, G.H., & Ragama, P.E. (2007). The use of aggregation pheromone to enhance dissemination of *Beauveria bassiana* for the control of the banana weevil in Uganda. *Biocontrol Science and Technology, 17*(1/2), 111-124.

Ugine,T.D., Wraight, S.P., & Sanderson, J.P. (2007). Effect of manipulating spray - application parameters on efficacy of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, infesting impatiens crops. *Biological Science and Technology, 17*(1/2), 193-219.

Vandenberg, J.D., Shelton, A.M., Wilsey, W.T., & Ramos, M. (1998). Assessment of *Beauveria bassiana* sprays for control of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) on crucifers. *Journal of Economic Entomology, 91,* 624-630.

Viaud, M., Couteaudier, Y., Levis, C., & Roba, G. (1996). Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, genemapping, and telomeric fringerprint. *Fungal Genetical Biology, 20*, 175-183.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Wang, C., M.A. Typas and T.M. Butt. 2002. Detection and characterization of pr1 virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Ecology Letters*, 213, 251-255.

Wadley, F.M. (1967). *Experimental statistics in entomology*. Washington D.C., USA: Graduate School Press, U.S. Department of Agriculture.

Wright, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J., & Galaini-Wright, S. (2000). Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosiroses* for microbial control of the silver leaf whitefly, *Bemisia argentifolii***.** *Biological Control, 7,* 203-217.

Zaid, A., Hughes, H.G., Proceddu, E. & Nichloas, F. (2001). *Glossary of biotechnology for food and agriculture.* Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Zacharuk, R.Y., & Tinline, R.D. (1968). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi for five Elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. *Journal of Invertebrate Pathology, 12*(2), 3044-3049.

Zimmermann, G. (1992). *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer, 45*(63), 113-128.

Zhang, Y., Feng, M.G., Fan, Y.H., Luo, Z. B., Yang, X.Y., Wu, D., & Pei, Y. (2008). A cuticle-degrading protease (CDEP-1) of Beauveria bassiana enhances virulence. Biocontrol Science and Technology, 18 (6), 543-555.

Zhang, Y., Zhao, J., Fang, W., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Fan, Y., & Pei, Y. (2009). Nitrogen-activated protein kinase hog1 in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* regulates environmental stress responses and virulence to insects. *Applied and Environmental Microbiology, 75*(113), 787-795.

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ภาคผนวก

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเทียมสำหรับทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Beauveria bassiana* ไอโซเลท Bbs 01

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Agar with Yeast extract (SDA+Y)

Neopeptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose Broth with Yeast extract (SDA+Y)

Neopeptone	10	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Extract Agar (MAE)

Malt extract	20	กรัม
Peptone	10	กรัม
Glucose	20	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Water Agar (WA)

Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ: นายรุ่งเกียรติ แก้วเพชร

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

ประวัติการศึกษา: พ.ศ. 2542 ระดับปริญญาตรี วท.บ. (โรคพืชวิทยา)
พ.ศ. 2547 ระดับปริญญาโท วท.ม (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ทุนสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ: เทคโนโลยีของเอนไซม์, การใช้เชื้อจุลินทรีย์ควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร

ประสบการณ์การทำงาน:

รองผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2548 - 2551
เลขานุการคณะกรรมการพัฒนางานวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต พ.ศ. 2548 - 2551

ผลงานตีพิมพ์และงานวิจัยที่สำคัญ:

1. **Kawpet, R.**, W. Sridokchan and A. Aungsuratana. 2011. Performance of Entomopathogenic Fungi Endogenous Strains in Rice Pest Control towards Biological Method, p. 104. In Proceeding of ISSAAS International Symposium & Congress on A Holistic Approach in Establishing Food Security Securing Food Supplies to Meet the Future Demand of the Increasing Population. 7-10 November 2011, International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. Bogor Agricultural University (IPB), Bogor, Indonesia.
2. **Kawpet, R.** and W. Sridokchan. 2012. Entomopathogenic Fungi EndogenousStrains Efficiency on Rice Pest Management towards Organic Farming, p. 7. In Proceeding of JKTC Seminar 2012 Natural Environment and Sustainable Agriculture in Asian Countries. 10-12 November 2012, Okayama University, Okayama, Japan.
3. Detection of Genetic Exchange of Formulated and Indigenous Strains of Entomopathogenic Fungi in the Agro-ecosystem (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ.2555; วช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
228-228/1-3 ถ.สิรินธร แขวงบางพลัด เขตบางพลัด กทม. 10700
โทรศัพท์ / โทรสาร 02-423-9401-6 / 02-423-9419
Email: rungkiat99@yahoo.com

ชื่อ: นางสาวศมาพร แสงยศ

ประวัติการศึกษา: พ.ศ. 2542 - วิทยาบัณฑิต (โรคพืชวิทยา)

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

พ.ศ. 2546 - วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กีฏวิทยา)
พ.ศ. 2554 - ปริญญาดุษฎีบัณฑิต กีฏวิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ทุนโครงการ Biodiversity Research and Technology Program (BRT Program) ศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ)

สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ: กีฏวิทยาทางการเกษตร (Agricultural Entomology) การควบคุมแมลงศัตรูพืชและวัชพืชโดยชีววิธี (Biological Control of Insect Pests and Weeds) ความปลอดภัยทางชีวภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรม (Biosafety of Genetically Modified crops)

ผลงานตีพิมพ์และงานวิจัยที่สำคัญ:

1. **Saengyot, S.** and B. Napompeth. 2008. Simple technique for mass Propagation of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Ascomycota: Hypocreales) for microbial control in Thailand. Journal of ISSAAS. 13(Supplement): 96-102.
2. **Saengyot S.** and I. Burikam. 2011. Host plants and natural enemies of papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in Thailand. Thai Journal of Agricultural Science 44(3): 197-205.
3. **Saengyot, S.** and I. Burikam. 2012. Development and growth ratio of predaceous coccinellid, *Sasajiscymnus quinquepunctatus* (Weise) on papaya mealybug, *Paracoccus marginatus* Williams & Granara de Willink. Kasetsart Journal (Natural Science) 46(3): 418-426.
4. Species Diversity and Utilization of Predatory Thrips for Biological Control of Insect Pests. (หัวหน้าโครงการ, พ.ศ. 2556; สวทช.)

ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำ

สถานที่ทำงาน: หลักสูตรอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตู้ ปณ. 49 แม่โจ้ ต.หนองหาร อ. สันทราย
จ. เชียงใหม่ 50290 โทรศัพท์ / โทรสาร 053-878-540
Email: samaporn@mju.ac.th

Created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional