



รายงานการวิจัย

การแยกและคัดเลือกเชื้อราก่อโรคในแมลงเพื่อประเมินการสร้างเอนไซม์
ไคตินเนส โปรตีนเนส และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
Isolation and Screening of Entomopathogenic Fungi to
Evaluation of Chitinase and Proteinase Producing
and Antimicrobial Activity.

จรินทร์ พุดงาม Jarin Poodngam
ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขต นครศรีธรรมราช

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560



รายงานการวิจัย

การแยกและคัดเลือกเชื้อราก่อโรคในแมลงเพื่อประเมินการสร้าง
เอนไซม์ไคติเนส โปรติเนส และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์
Isolation and Screening of Entomopathogenic Fungi to
Evaluation of Chitinase and Proteinase Producing
and Antimicrobial Activity.

จรินทร์ พุดงาม Jarin Poodngam
ธนากรณ์ ดำสุด Thanakorn Damsud

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560

การแยกและคัดเลือกเชื้อราก่อโรคในแมลงเพื่อประเมินการสร้างเอนไซม์ไคติเนส โปรตีนและฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

จรินทร์ พุดงาม¹ และ ธนากรณ์ คำสุด¹

บทคัดย่อ

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อรา ในบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง ร่วมกับการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงเกษตรกรรมรอบนอกอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง และ ดินแปลงเกษตรกรรมที่ไม่มีประวัติการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช มาแยกเชื้อราสาเหตุของโรคแมลง ได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลท เพื่อประเมินการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ยีสต์ ราเส้นใย พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp.PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beaveria* sp. PS61W1, *Paecilomyces* spp.PS72G1, *Cordyceps* sp.PI32W2, *Ophiocordyceps* sp.PP91W1 และ *Hirsutella sawsurei* PC131G1 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีระดับศักยภาพในการผลิตไคติเนสและโปรติเอสสูงสุด (High/High) และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองในช่วงพีเอช 4-9 และอุณหภูมิในช่วง 40 – 60 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกได้บางส่วน และมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราเส้นใยได้เกือบทุกชนิด เชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 ให้มดคันไฟชนิด *Solenopsis geminata* มีอัตราการตายที่แท้จริงเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 95.43 ± 1.83 รองลงมาคือ *Metarhizium* sp. PS15G1, *Ophiocordyceps* sp PP91W1, *Hirsutella sawsurei* PC131G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Cordyceps* sp.PI32W2, *Paecilomyces* sp. PS72G1 และ *Nomuraea* sp. VS51W5 อัตราการตายที่แท้จริงเฉลี่ยร้อยละ 56.02 ± 15.67 , 37.19 ± 25.96 , 48.62 ± 12.23 , 46.62 ± 13.31 , 23.87 ± 8.63 , 17.47 ± 2.66 และ 5.13 ± 8.04 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงอันดับ Hymenoptera ได้

คำสำคัญ : มดคันไฟ, ไคติเนส, โปรติเอส, เชื้อราสาเหตุโรคแมลง

¹คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

Isolation and Screening of Entomopathogenic Fungi to Evaluation of Chitinase and Proteinase Producing and Antimicrobial Activity.

Jarin Poodngam¹ and Thanokorn Damsud¹

Abstract

The objective of this research was to evaluation of chitinase, proteinase production, antimicrobial of entomopathogenic fungi were isolated from mummy insect at Nam ToK Yong Natural National Park area and organic agricultural soil at Thumyai sub-district, Thungsong district, Nakhon Si Thammarat province. The evaluation chitinase producing on Colloidal chitin agar (CCA) medium supplemented with bromocresol purple and protease producing on Sabouraud dextrose agar (SDA) medium supplemented with skim milk and bromocresol green. The results showed that only 8 of 105 isolates strains : *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beauveria* sp. PS61W1, *Paecilomyces* spp. PS72G1, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1 and *Hirsutella sawsurei* PC131G1 were classified in the High / High group producing. All of selected strains were produced the enzyme maximally, the thermal stability on the enzyme activity was between 40 – 60°C. The optimal pH on the enzyme production on the enzyme activity was 4 – 9. All of 8 entomopathogenic fungi were active against Bacterial and test fungal. The evaluation of controlling fire ant (*Solenopsis geminata*), the results showed that *Beauveria* sp. PS61W1 had the cumulative mortality percentage on 95.43 ± 1.83 in 30 days., followed by *Metarhizium* sp. PS15G1, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1, *Hirsutella sawsurei* PC131G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Paecilomyces* sp. PS72G1 and *Nomuraea* sp. VS51W5 had the cumulative mortality percentage on 56.02 ± 15.67, 37.19 ± 25.96, 48.62±12.23, 46.62±13.31, 23.87±8.63, 17.47 ± 2.66 and 5.13 ± 8.04 respectively. Our results suggest that 5 selected entomopathogenic fungi might be useful as a source for Hymenoptera biocontrol.

Keywords : *Solenopsis geminate*, Chitinase, Protease, Entomopathogenic

¹ Faculty of Science and Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, ThungSong, Nakonsrithammarat.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2560 ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ที่ให้การสนับสนุนสถานที่สำหรับสถานที่ อุปกรณ์ ในการทำวิจัย

ขอบคุณ นายจีรวัฒน์ บ่อน้อย ผู้ช่วยวิจัย นายเอกวิทย์ จันทร์พิบูลย์ นักศึกษาสาขาพืชศาสตร์ ที่ช่วยเหลือในการเก็บรวบรวมข้อมูล จนสำเร็จด้วยดี ขอขอบคุณคุณวิชัย-คุณวิรัตน์ ไชยช่วย ที่อนุเคราะห์หนอนกินไข่ม้วน และตัวอย่างดิน รวมทั้งผู้ที่ให้การช่วยเหลือที่ไม่ได้เอ่ยนาม

คุณความดีและผลประโยชน์ที่เกิดจากงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอยกให้กับพ่อแม่ ที่ให้กำลังใจในการดำเนินชีวิตมาโดยตลอด แต่บูรพคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ในด้านวิชาการและ จริยธรรม ให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้มาประยุกต์ใช้ในการทำวิจัยอย่างลุล่วงด้วยดี และมีพระคุณทุกท่าน

จรินทร์ พุดงาม
ธนากรณ์ ดำสุด
กันยายน 2561

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	
บทนำ (Introduction)	1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ทฤษฎี	2
บทที่ 2	
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	13
วัสดุ อุปกรณ์	13
วิธีการดำเนินการวิจัย	14
บทที่ 3	
ผล และอภิปรายผลการทดลอง	21
การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อราจากอโรครในแมลง	21
การประเมินการผลิตเอนไซม์	27
ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	32
การวัดกิจกรรมของเอนไซม์	35
การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์	37
การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น	40
ประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้คัดเลือก	42
บทที่ 4	
สรุปผลการทดลอง	47
บรรณานุกรม	48
ภาคผนวก	57

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ตัวอย่างราทำลายแมลงในป่าบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง	22
2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ 45 ไอโซเลท จากตัวอย่างแมลง 11 ตัวอย่าง	24
3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกจากตัวอย่างดินที่ทำการเก็บตัวอย่างราแมลง จากบริเวณน้ำตกโยง และน้ำตกวังปริง ด้วยสูตรอาหาร PDA และ VSM	25
4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกจากตัวอย่างดินแปลงเกษตร	26
5 ประเมินศักยภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเบื้องต้นบนอาหารแข็งหลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน	29
6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	33
7 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเนสของเชื้อรา <i>Beaveria</i> sp. PS61W1 และ <i>Ophiocordyceps</i> sp. PP91W1	38
8 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเนสของเชื้อรา <i>Beaveria</i> sp. PS61W1 และ <i>Ophiocordyceps</i> sp. PP91W1	39
9 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเนสของเชื้อรา <i>Beaveria</i> sp. PS61W1 และ <i>Ophiocordyceps</i> sp. PP91W1	40
10 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 8 ไอโซเลท	41
11 ประสิทธิภาพการกำจัดมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้	44

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบบ extoparasite ของสปอร์ของเชื้อรา <i>Aegeritella tuberculata</i> บนตัวมด <i>Formica pressilabris</i> (ลูกศร)	3
2 ลักษณะการดำรงชีวิตแบบ endoparasitic ของเชื้อรา <i>Myrmicinosporidium</i> sp. ภายในตัวมดชนิด <i>Pheidole pallidula</i> (ศรชี้)	3
3 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา <i>Beauveria basiana</i> ทางทะเลบนผิวชั้นนอกของด้วง <i>Cyclocephala lunulata</i> (ก) และการพัฒนาเป็นสโตรมา(ข) (ศรชี้)	4
4 การแทงทะลุผ่านผนังลำตัวของเชื้อรา	8
5 ขบวนการทำให้แมลงเกิดโรค	9
6 กระบวนการติดเชื้อของเชื้อรากล่อโรคในแมลงในแมลง ตัวอย่างของเอนไซม์ย่อยสลายคิตินและออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นพิษจากเชื้อราที่หลั่งออกมาใน hemolymph รวมทั้งองค์ประกอบที่ผิวของแมลงและระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อรา	12
7 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar ที่เติม โบรมีครีซอล เพอร์เฟิล	27
8 กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ในระดับ High ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้อากาศ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	35
9 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ในระดับ High ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้อากาศ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	36
10 ลักษณะพฤติกรรมทำความสะอาดลำตัวของมดคันไฟ	42
11 แสดงลักษณะการกินอาหารและอาการที่อ่อนแอลงของมดคันไฟ	43
12 ลักษณะเชื้อราเจริญบนตัวมดคันไฟ	43
13 ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเจริญบนตัวมดคันไฟ ที่ 30 วัน ของการทดลอง	46

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

ปัจจุบันมีผู้ให้ความสนใจงานด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางชีวภาพมากขึ้นวิธีการหนึ่งที่ได้รับความสะดวกคือการนำเชื้อจุลินทรีย์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชซึ่งนอกจากมีความปลอดภัยของตัวเกษตรกรผู้ใช้งานทั้งผู้บริโภคแล้วยังไม่ทำให้เกิดการฆ่าแมลงในสภาพแวดล้อมรอบอโรคในแมลง (insect fungi) เป็นเชื้อราที่มีความสัมพันธ์กับแมลงคือดำรงชีพแบบก่อโรคโดยเจริญและสร้างเส้นใยอยู่ในร่างของหนอนแมลงเป็นเชื้อราที่ก่อโรคในแมลงตามธรรมชาติ (entomopathogenic fungi) นอกจากนี้จะมีประโยชน์ในการควบคุมสมดุลของแมลงในธรรมชาติแล้วยังมีหลายชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากอโรคในแมลงมีมากกว่า 700 ชนิด แต่มีไม่กี่ชนิดที่พบได้บ่อย และเป็นก่อโรคของแมลงประเทศไทยนั้นจัดอยู่ในเขตร้อนชื้นลักษณะของป่ามีความอุดมสมบูรณ์มีความหลากหลายด้านชนิดของแมลง อุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง จังหวัดนครศรีธรรมราช มีลักษณะภูมิประเทศเป็นป่าดงดิบชื้นที่อุดมสมบูรณ์สูง จึงเป็นแหล่งที่จะสำรวจเพื่อศึกษาเชื้อราก่อโรคในแมลงได้อย่างดี

การศึกษาเชื้อราก่อโรคในแมลงที่ผ่านมามีส่วนใหญ่มุ่งเน้นทางด้านอนุกรมวิธานมากกว่าจะศึกษาเพื่อหาคุณสมบัติทางด้านอื่น ๆ จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อราเหล่านี้จะมีความสามารถในการสร้างสารทุติยภูมิได้อีกหลายชนิด งานวิจัยนี้มุ่งเน้นในการสำรวจเชื้อราที่เป็นก่อโรคแมลงจากแหล่งธรรมชาติในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง และตัวอย่างจากดินในสวนส้ม มะนาว ในาข้าว มาแยกเชื้อและจำแนกชนิด เพื่อนำมาศึกษาคัดกรองหาความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีแนวโน้มในการเป็นสารกำจัดแมลง และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเชื้อราก่อโรคในแมลงจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มพูนความรู้เกี่ยวกับความสามารถในการผลิตสารของเชื้อราเหล่านี้รวมถึงจะได้นำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อไปในเชิงลึกและนำไปประยุกต์ใช้ให้เป็นประโยชน์ทางด้านอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและบ่งชนิดเชื้อราก่อโรคในแมลงบางชนิดจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง และตัวอย่างจากดินแปลงเกษตรกรรม คือ ในสวนส้ม สวนมะนาว และดินนาข้าว
2. เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์โคติเนส เอนไซม์โปรติเนส และฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อราก่อโรคในแมลงที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้คัดเลือก

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการสำรวจชนิดของราก่อโรคในแมลง ในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง จังหวัดนครศรีธรรมราช ร่วมกับการเก็บตัวอย่างดินจากดินในสวนส้ม สวนมะนาว และดินในนาข้าวที่คาดว่าจะมีการระบาดของแมลงศัตรูพืช และเป็นพื้นที่ที่ไม่มีประวัติการใช้ยาปราบศัตรูพืชที่เป็นสารเคมีนำ

ตัวอย่างมาแยกเชื้อราก่อโรคในแมลง แล้วศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์โปรติเนส และฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และยีสต์ของสารสกัดหยาบจากเชื้อราก่อโรคในแมลงที่แยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในเขตอุทยานแห่งชาติ น้ำตกโยง
2. เพื่อได้สายพันธุ์เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่มีประสิทธิภาพ และมีประโยชน์ในการใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช
3. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษางานวิจัยต่อไปในเชิงลึก และนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

ทฤษฎี

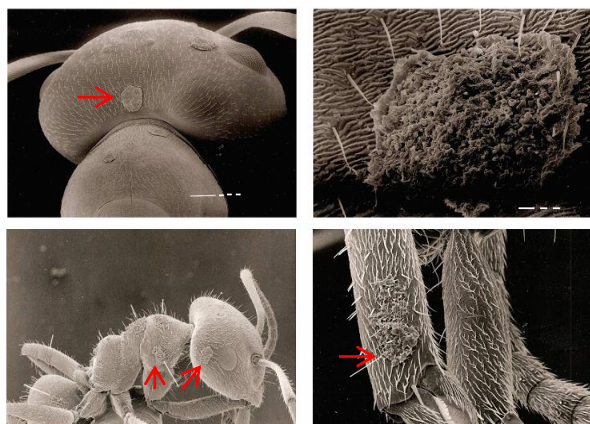
เชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราจัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ คือผนังเซลล์ประกอบด้วย โพลีแซคคาไรด์ และไคติน มีโครงสร้างเป็นเส้นใยและส่วนใหญ่ขยายพันธุ์ด้วยการสร้างสปอร์ เชื้อราสาเหตุโรคแมลงเป็นกลุ่มเชื้อราที่มีความเฉพาะเจาะจงกับแมลง เช่น แมงมุม ไรเห็บ ตั๊กแตน เป็นต้น โดยเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงนี้ สามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงได้ โดยทางทะลุผ่านเข้าไปทางผิวหนังและไปเจริญเติบโตภายในตัวแมลงโดยจะสร้างสารพิษ (Toxin) ทำลายเนื้อเยื่อ และระบบต่างๆ ทำให้แมลงตายได้หรือบางครั้งเชื้อราอาจเข้าไปทางปากแต่ไม่มีผลต่อแมลง เพราะจะถูกถ่ายออกทางอุจจาระ การเกิดโรคของแมลงจะเกิดได้ดีและรวดเร็วเมื่อแมลงอ่อนแอและได้สัมผัสโดยตรงกับเชื้อราที่มีความรุนแรงในสภาพแวดล้อมที่พอเหมาะแก่การเจริญเติบโตของเชื้อรานี้ๆ การติดเชื้อโรคของแมลงจะเป็นไปด้วยดี รวดเร็ว มีประสิทธิภาพ

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง (Insect fungi หรือ entomopathogenic fungi) หมายถึงเชื้อราที่สามารถเจริญเติบโตได้ในแมลง ซึ่งอาจจะอยู่ร่วมกับแมลงที่มีชีวิตหรือทำให้เกิดโรคและสามารถฆ่าแมลงได้ ซึ่งเชื้อรากลุ่มนี้มีความสัมพันธ์กับแมลงในลักษณะที่อาจเป็นทั้ง saprophytic commensalistic parasitic หรือ pathogenic

การดำรงชีวิตแบบปรสิตของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมี 2 รูปแบบ (ชฎารัตน์, 2556)

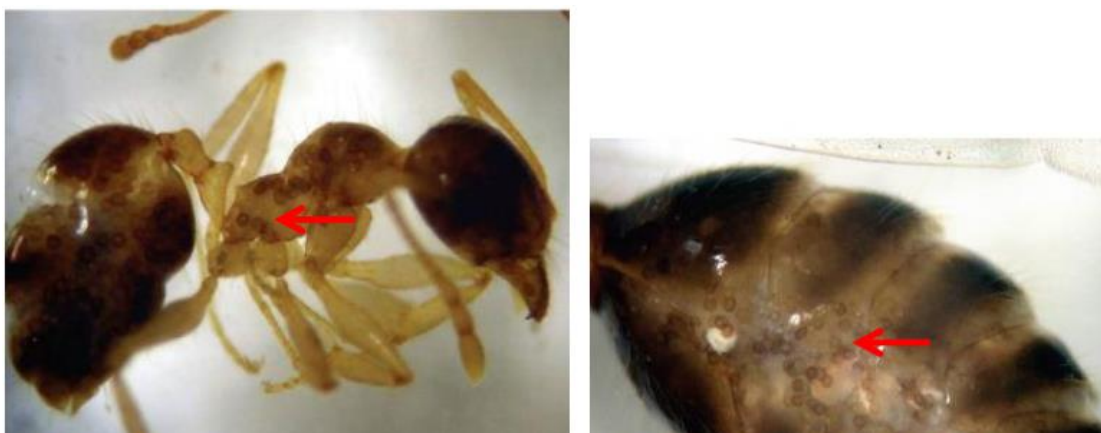
1. เชื้อราปรสิตภายนอก (extoparasitic fungi) พบเจริญอยู่เฉพาะผิวชั้นนอกของแมลง ดังภาพที่ 1 เชื้อรากลุ่มนี้จะไม่ก่อโรคจนส่งผลให้แมลงตาย แต่จะมีผลทำให้แมลงอ่อนแอลงในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันไป



ภาพที่ 1 ลักษณะการดำรงชีวิตแบบ extoparasite ของสปอร์ของเชื้อรา *Aegeritella tuberculata* บนตัวมด *Formica pressilabris* (ครซึ่)

ที่มา : Espadaler and Santamaria (2012)

2. endoparasite เชื้อราในกลุ่มนี้จะสร้างสปอร์เข้าไปเกาะยึดติดกับผิวชั้นนอกของแมลง จากนั้นจะผลิตเอนไซม์ต่างๆ มาย่อยสลายผนังชั้นนอก และสร้างอวัยวะพิเศษเพื่อใช้สำหรับแทงผ่านผิวชั้นนอกเข้าไปภายในตัวแมลง เมื่อเข้าไปภายในตัวแมลง เส้นใยของเชื้อราบางชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ของยีสต์ จากนั้นจึงเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายในตัวแมลง (haemocoel) สารอาหารต่างๆ ที่มีอยู่ในเลือดของแมลง ถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา นอกจากนี้เชื้อราอาจเข้าไปทำลายเนื้อเยื่อส่วนอื่น ๆ หรือปล่อยสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไปรบกวนพัฒนาการ และกระบวนการเมตาโมอร์ฟอซิส (matamorphosis) ของแมลง ลักษณะแมลงในระยะนี้จะคล้ายมัมมี่ เหลือเพียงเปลือกหุ้มชั้นนอกเท่านั้น ดังภาพที่ 2 เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสม สเคอโรเทรียม (sclerotium) จะพัฒนาไปเป็นสโตรมา (stroma) เจริญออกมาบนผิวของแมลง และมีผลทำให้แมลงตายในที่สุด ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ลักษณะการดำรงชีวิตแบบ endoparasitic ของเชื้อรา *Myrmicinosporidium* sp. ภายในตัวมดชนิด *Pheidole pallidula* (ครซึ่)

ที่มา : Espadaler and Santamaria (2012)



ภาพที่ 3 ลักษณะเส้นใยเชื้อรา *Beauveria basiana* แทะทะลุบนผิวชั้นนอกของดั่ง *Cyclocephala lunulata* (ก) และการพัฒนาเป็นสโตรมา(ข) (ศรีชัย)

ที่มา : Lydia et al. (2014)

การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (Classification of entomopathogenic fungi)

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีมากกว่า 700 ชนิด แต่มีไม่กี่ชนิดที่พบได้บ่อยและมีบทบาทสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Verticillium* sp., *Nomuraraea* sp., และ *Paecilomyces* sp. (Lydia et al., 2014) โดยสามารถจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ดังนี้

Phylum	Class	Order	Family	Genus
Oomycota	Oomycetes	Lagenidiales		<i>Lagenidium</i>
		Saprolegniales		<i>Aphanomyces</i> <i>Atkinsiella</i> <i>Couchia</i> <i>Leptolegnia</i>
Chytridiomycota	Chytridiomycetes	Blastocladales	Coelomomycetaceae	<i>Coelomomyces</i> <i>Coelomycidium</i> <i>Catenaria</i>
			Chytridiales	<i>Myriophagus</i>
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Ancylistaceae	<i>Conidiobolus</i> <i>Basidiobolus</i>
			Entomophthoraceae	<i>Entomophthora</i> <i>Entomophaga</i> <i>Erynia</i> <i>Eryniopsis</i> <i>Furia</i> <i>Massospora</i> <i>Strongwellsea</i> <i>Pandora</i> <i>Orthomyces</i> <i>Tarichium</i> <i>Zoophthora</i>

			Neozygiteaceae	<i>Neozygites</i> <i>Thaxterosporium</i>
		Mucorales	Mucoraceae	<i>Sporodiniella</i> <i>Amoebiales</i> <i>Septobasidium</i> <i>Uredinella</i>
Basidiomycota	Trichomyces	Amoebidiales		
	Phragmobasidiomycetes	Septobasidiales		
Ascomycota	Plectomyces	Ascosphaerales		<i>Ascoaphaera</i>
	Sordariomycetes	Hypocreales	Hypocreaceae	<i>Cordycepioideus</i> <i>Hypocrella</i> <i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Metacordyceps</i> <i>Regiocrella</i> <i>Torrubiella</i> <i>Cordyceps</i> <i>Ophiocordycipitaceae</i> <i>Ophiocordyceps</i> <i>Elaphocordyceps</i>
		Clavicipitales	Nectriaceae Clavicipitaceae	<i>Nectria</i> <i>Hypocrella</i> <i>Metacordyceps</i> <i>Regiocrella</i> <i>Torrubiella</i> <i>Cordyceps</i> <i>Ophiocordycipitaceae</i> <i>Ophiocordyceps</i> <i>Elaphocordyceps</i>
Deuteromycota	Coelomyces	Sphaeropsidles	Cordycipitaceae Ophiocordycipitaceae	<i>Aschersonia</i> <i>Tetranacrium</i> <i>Akanthomyces</i> <i>Aschersonia</i> <i>Aspergillus</i> <i>Beauveria</i> <i>Culicinomyces</i> <i>Fusarium</i> <i>Gibellula</i> <i>Hirsutella</i> <i>Hymenostilbe</i> <i>Metarhizium</i> <i>Nomuraea</i> <i>Paecilomyces</i> <i>Parasaria</i> <i>Pseudogibellula</i> <i>Sorospora</i> <i>Sporothrix</i> <i>Tetracrium</i> <i>Tilachlidiopsis</i> <i>Tolypocladium</i> <i>Verticillium</i>
	Hyphomycetes	Monilliales	Moniliaceae	

เชื้อราสาเหตุโรคแมลง แบ่งอย่างกว้าง ๆ เป็น 2 ประเภท คือ

1. General, opportunistic pathogens เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถก่อโรคกับแมลงได้หลายชนิด สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยทั่วไป เช่น *B. bassiana*, *M. metarhizium*, *I. fumosorosea* และ *I. farinose*

2. *Fasidious pathogens* เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความจำเพาะกับแมลงบางชนิด ยากต่อการแยกเชื้อและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่เป็นเชื้อราใน family *Clavicipitaceae*

แหล่งที่พบเชื้อราก่อโรคในแมลง

แหล่งที่พบเชื้อรากลุ่มนี้มักจะแตกต่างกันไปตามบริเวณที่อยู่อาศัยของแมลงซึ่งอาจจะฝังอยู่ในดินซากพืชที่ทับถมหรือไม้ผุ (Arora, 1986) หรือแม้กระทั่งบนกิ่งไม้ใบไม้ที่ติดกับต้น ชนิดที่พบตามพื้นดินส่วนใหญ่มักพบในฤดูฝนเนื่องจาก เชื้อราต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโตเพื่อเจริญผ่านชั้นดินขึ้นมาส่วนชนิดที่เจริญบนแมลงที่อาศัยอยู่ตามผิวหน้าดินขึ้นไปก็จะพบตามผิวหน้าดินโดยที่สปอร์มาไม่ได้เจริญผ่านชั้นดินขึ้นมาแต่จะเจริญผ่านชั้นของใบไม้ที่ปกคลุมแมลงอยู่ส่วนชนิดที่พบตามส่วนต่างๆของพืชที่แมลงอาศัยอยู่มักจะพบได้ตลอดทั้งปีโดยส่วนใหญ่พบตามใต้ใบไม้เนื่องจากแมลงจะอาศัยอยู่เพื่อการพรางตัวจากศัตรูตามธรรมชาติ (Benjamin *et al.*, 2000)

ความหลากหลายของเชื้อราก่อโรคในแมลง

เชื้อราในกลุ่มนี้เริ่มศึกษาในประเทศจีนเมื่อ 2000 ปีก่อนมีการนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรบำรุงกำลังบำรุงประสาท บำบัดวัณโรค แก้อาการผิดปกติของโรคไต ซึ่งเป็นเชื้อ *Cordycep sinensis* หรือที่รู้จักกันในนามถั่งเช่าหรือหนาวหนอนร้อนหญ้าเป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงที่เจริญบนหนอนผีเสื้อชนิดหนึ่ง (Isaka *et al.*, 2005; Benjamin, 2000; Jianzhe *et al.*, 1987) มีความพยายามที่จะเพาะเลี้ยงเนื่องจากเป็นที่ต้องการของตลาดมากแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จนอกจากนี้ยังนำไปใช้ในการควบคุมแมลงซึ่งทำให้เกิดผลเสียหายทางการเกษตรและแมลงที่ก่อโรคบางชนิด (Boucias and Pendland, 1988; Churchill, 2001) ซึ่งเชื้อ *Beauveria bassiana* จะถูกเลือกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงที่ก่อให้เกิดความเสียหายในการเกษตรแทนการใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดสารพิษตกค้าง (Churchill, 2001) เชื้อราก่อโรคในแมลงที่มีการศึกษาส่วนใหญ่จะอยู่ในจีนัส *Cordyceps* ซึ่งมีรายงานการค้นพบอย่างกว้างขวาง Dennis (1978) รายงานการพบ *Cordyceps* จำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *C. canadensis*, *C. capitata* และ *C. ophioglossoides* เจริญบน ascocarp ของเห็ด truffle, *C. gracilis* เจริญบนตัวอ่อนของผีเสื้อ, *C. militaris* เจริญบนตัวอ่อนและดักแด้ของผีเสื้อที่ฝังอยู่ในดิน, *C. forquiloni* เจริญบนแมลงวัน Order *Diptera*, *C. sphecocephala* เจริญบนตัวต่อและผึ้งใน Order *Hymenoptera* และ *C. tuberculata* เจริญบนตัวอ่อนหรือตัวเต็มวัยของผีเสื้อกลางคืน Bramley (1985) สำรวจและเก็บรวบรวมเชื้อรา *Cordyceps* จากแคว้น Yorkshire ประเทศอังกฤษพบ 6 ชนิด ได้แก่ *C. capitata*, *C. forquiloni*, *C. gracilis*, *C. militaris*, *C. ophioglossoides* และ *C. entomorrhiza* เจริญอยู่บนตัวอ่อนของด้วงในปี ค.ศ. 1986 Arora ได้รายงานการค้นพบ *Cordyceps* ที่เจริญบนมดเป็นครั้งแรกในรัฐแคลิฟอร์เนียประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1988 Samson *et al.* ได้รายงานการพบ *Cordyceps* จำนวน 8 สปีชีส์ ได้แก่ *C. australis*, *C. curculionum*, *C. dipterigena*, *C. locustiphila*, *C. militaris*, *C. tuberculata*, *C. unilateralis* และ *C. variabilis* ปี 1989 Evans ศึกษา *Cordyceps* ที่เจริญบนมดในเขตร้อนและพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเกิดการติดเชื้อพบว่ามดที่ติดเชื้อ *C. australis* และ *C. unilateralis* จะเคลื่อนที่อย่างไร จุดหมายเมื่อถูกรบกวนโดยการไต่ขึ้นไปบนต้นพืชที่เป็นแหล่งอาหารและแสดง

อาการระตุกของขาหน้าและหนวดไปพร้อมกันมดเหล่านี้จะตายโดยเกาะยึดติดแน่นกับกิ่งก้านหรือใบของพืชและพบสปอร์มาเจริญออกมาจากทางช่องเปิดหรือรอยต่อระหว่างลำตัวของมดทำให้ผู้ศึกษาเชื่อว่าในกลุ่มนี้มากขึ้นและมีการรายงานจากหลายประเทศเช่นในประเทศจีนญี่ปุ่นเกาหลีอินโดนีเซีย เป็นต้น

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราก่อโรคในแมลงเริ่มเมื่อ Schumacher ซึ่งเป็นบุคคลแรกที่ได้เข้ามาศึกษาและเก็บรวบรวม *Ascomycetes* ทางภาคเหนือของประเทศไทยได้รายงานการค้นพบ *C. nutans* ที่เก็บรวบรวมได้จากปาก่อและป่าเบญจพรรณในเขตอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ – ปุย (Schumacher, 1982) ทำให้ Hywell-Jones สนใจที่จะศึกษาและเก็บรวบรวมเชื้อราที่เจริญบนแมลงในประเทศไทยโดยได้รายงานการพบเชื้อราชนิดใหม่ที่พบเป็นครั้งแรกจากตัวอ่อนของผีเสื้อ 2 ชนิดคือ *C. khaoyaiensis* จากอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ และ *C. pseudomilitaris* จากเขาสามหลั่น (Hywell-Jones, 1994) ในปีต่อมาก็ได้พบเชื้อราก่อโรคแมลงชนิดใหม่อีกซึ่งชนิดนี้พบบนตัวอ่อนของตัวงใน family *Elateridae* คือ *C. brunneapunctata* (Hywell-Jones, 1995) และมีการสำรวจเชื้อราในกลุ่มนี้จนพบอีกจำนวนมากและได้ทำการเก็บรักษาเชื้อราไว้ที่ศูนย์ BIOTEC ของประเทศไทย

นอกจากนี้ เมื่อนำราก่อโรคในแมลงมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเหมาะสม พบว่าราก่อโรคในแมลงบางชนิดสร้างสารโพลีเมอร์ชีวภาพที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ เช่น โพลีเมอร์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดน้ำตาลในเลือด บางชนิดใช้เป็นสารประกอบภavnนำพยา หรือใช้ขึ้นรูปอาหารให้มีความคงตัวมากขึ้น โพลีเมอร์ชีวภาพจากราก่อโรคในแมลงบางชนิดมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นวัสดุปิดแผล เพื่อใช้ทดแทนการนำเข้าวัสดุปิดแผลจากต่างประเทศที่มีราคาสูงได้ ราก่อโรคในแมลงจึงเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจ

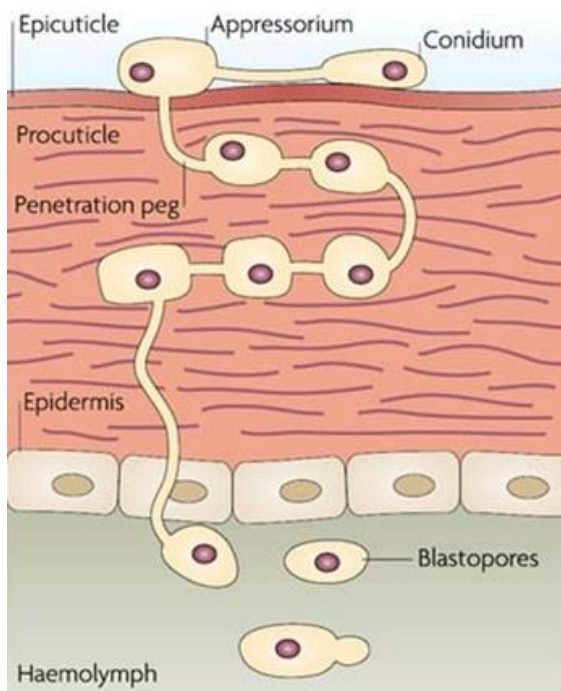
กลไกการก่อโรคของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ชฎารัตน์ (2552) Urquiza และ Keyhani (2013) กล่าวว่าเชื้อราทำให้เกิดโรคในแมลงได้โดยการแทงเข้าสู่แมลงทางผนังลำตัว หรือรูหายใจ หรือ บาดแผลที่ผนังลำตัว โดยสปอร์ของเชื้อราหรือคอนิเดีย (conidia) ตกลงบนผนังลำตัวของแมลง ชั้นคิวติเคิล เมื่อมีความชื้นที่พอเหมาะ เชื้อราเจริญ โดยพยายามยึดเกาะกับผนังลำตัวของแมลงด้วยการสร้างปุ่มยึด หรือ appressorium พร้อมสร้าง germ tube

การแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงจะอาศัยเอนไซม์ต่างๆ ที่เชื้อราสร้างขึ้น เช่น Lipase ช่วยย่อยสลายชั้นไขมัน ที่เคลือบอยู่บนผนังลำตัว หรือเอนไซม์ Chitinase และ Proteinase ช่วยย่อยสลายชั้นต่างๆ ของผนังลำตัว โดยปกติเข้าบริเวณที่มีผนังบางๆ เช่น รอยต่อระหว่างปล้องหรือข้อต่อของรยางค์ต่างๆ เมื่อเชื้อราเข้าไปในช่องว่างภายในตัวแมลง จะเจริญสร้างเส้นใยจนเต็มตัวแมลง แย่งแร่ธาตุอาหาร เบียดเบียนและทำลายอวัยวะต่างๆ ในตัวแมลง เมื่อแมลงตายเชื้อราจะแทงทะลุผนังลำตัวแมลงออกมา โดยทั่วไปจะออกมาตรงจุดที่เชื้อราแทงเข้าไป เชื้อราจะสร้างก้านชูสปอร์บนผนังลำตัวของแมลงและเริ่มสร้างสปอร์ ซึ่งในที่สุดจะคลุมทั่วตัวแมลง ทำให้แมลงมีลักษณะคล้ายมัมมี่ คือเป็นซากแห้งแข็งและมีสปอร์ ขึ้นปกคลุมทั้งตัว เรียกอากการเช่นนี้ว่า Mummified ซากแห้งนี้จะแตก

ละเอียดเป็นผงเมื่อถูกสัมผัส โคนิเดียมหรือสปอร์บนผนังลำตัวแมลง จะปลิวกระจายไป เพื่อเข้าทำลายแมลงตัวอื่นต่อไป ดังภาพที่ 4

นอกจากการเข้าเบียดเบียนและทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ ของแมลงแล้ว เชื้อราหลายชนิดสร้างสารพิษทำลายแมลงด้วย เช่น เชื้อรา *Beauveria bassiana* ผลิตสารพิษบิวเวอริซิน (beauvericin) และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ผลิตสารพิษเดสตรักซิน (Destruxin) เป็นต้น สารพิษเหล่านี้มีพิษรุนแรงต่อแมลงมากน้อยแตกต่างกัน (ทิพย์วดี, 2535) สปอร์เชื้อราเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดโรคแพร่กระจาย การเข้าทำลายของเชื้อราผ่านทางระบบหายใจ และระบบทางเดินอาหาร ส่วนใหญ่เข้าก่อโรคทางผนังลำตัว (มลิวัลย์, 2539) แต่ตัวแมลงก็มีกลไกในการป้องกันเชื้อรา ได้แก่ การสร้างสารประกอบ antifungal และมีพฤติกรรมต่าง ๆ เช่น การขุดและอาศัยอยู่ภายในโพรง (burrowing) เพื่อให้ร่างกายอบอุ่น การขนย้ายซากแมลงที่ตายออกจากรัง (corpse removal) รวมถึงการทำความสะอาดตัวเองและทำความสะอาดให้กันระหว่างสมาชิกภายในรัง (grooming)



ภาพที่ 4 การแทงทะลุผ่านผนังลำตัวของเชื้อรา

ที่มา : Thomas และ Read (2007)

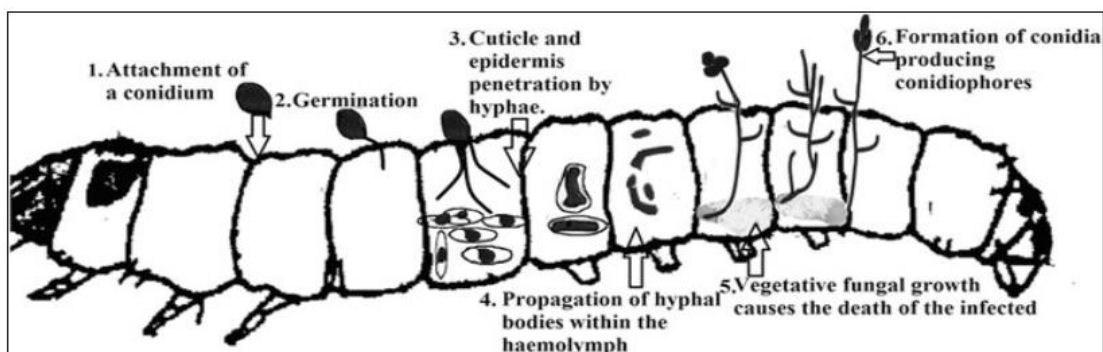
ขบวนการทำให้แมลงเกิดโรค แบ่งได้ 4 ระยะดังนี้ (ภาพที่ 5)

1. ระยะประชิดกับผนังลำตัวแมลง เชื่อกันว่าแรงทางเคมีและแรงไฟฟ้าสถิตมีส่วนร่วมกับปฏิกิริยาร่วม (Interaction) ระหว่าง lipolytic บนผิวของ spore และ lipids บนผิวลำตัวแมลงอาศัย อาจมีส่วนสำคัญในการงอกของ spore

2. ระยะการงอก โดยทั่วไปสปอร์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงจะพักตัวในสภาพแวดล้อมที่อุดมสมบูรณ์ เช่น ดิน เป็นต้น ถึงแม้ว่าความชื้นและอุณหภูมิ จะพอเหมาะกับการงอกก็ตาม spore เหล่านี้จะงอกทันทีภายหลังที่ได้ประชิดติดลำตัวแมลงอาจเป็นเพราะมีการกระตุ้นทางเคมี โดยสารบนผิวลำตัวแมลง และการกระตุ้นทางสรีระซึ่งสัมพันธ์กับขบวนการประชิดตัว หรืออาจเป็นเพราะการประชิดผิวแมลงทำให้เชื้อราสร้างสารที่ทำให้การงอก ดีขึ้น และกระตุ้นให้เกิดการงอกของ spore

3. ระยะแทงทะลุผิว โดยราจะงอก germ tube สั้นๆ และใช้ germ tube หรือ Injection Pegs ที่ราสร้างขึ้นจาก spore แทงทะลุผนังลำตัวแมลงเข้าไปภายใน โดยมี appressoria เป็นส่วนที่ช่วยยึดผิวลำตัวแมลงไว้ (Madelin *et al.*, 1967) เข้าใจว่ามีแรงทางเคมีและฟิสิกส์เข้ามาเกี่ยวข้องในขบวนการนี้โดยเอนไซม์มีความสำคัญช่วยในการแทงทะลุผนังลำตัวแมลงที่ประกอบด้วยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน โดยเฉพาะโคตินมีเอนไซม์บางชนิดที่จำเป็นในการแทงผนังลำตัวแมลง

4. ระยะการพัฒนาในตัวแมลง เมื่อเข้าไปแล้วเชื้อราจะสร้างเส้นใยเข้าไป ตามทางเดินโลหิต และเข้าไปขยายจำนวนในเลือดโดยเส้นใยที่งอกเป็นท่อนสั้นๆ และเข้าทำลายอวัยวะต่างๆ เช่น ชิ้นไขมัน เป็นต้น ภายหลังที่แมลงตายลง หรือก่อนตายเล็กน้อย จะพบว่า เส้นใยขยายไปทั่วภายในลำตัวแมลงจนเต็มไปด้วยเชื้อราหนาแน่นและแข็ง ในระยะต่อมาเชื้อราจะสร้าง conidiophores และแทงทะลุออกมาภายนอกลำตัวแมลงสร้าง conidia ตรงปลาย (ทิพย์วดี, 2535)



ภาพที่ 5 ขบวนการทำให้แมลงเกิดโรค

ที่มา : Source:www.researchgate.net/publication/277017477 A Review of Bio pesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests.

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคของแมลงโดยเชื้อรา (นราทร, 2549)

การก่อโรคของเชื้อรากับแมลงนั้นจะมีความรุนแรงมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของเชื้อราและแมลง ดังนั้นเชื้อราบางชนิดไม่สามารถใช้ควบคุมแมลงได้เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคดังนี้

1. สายพันธุ์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงได้แตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรม เชื้อราสายพันธุ์ใดทำให้แมลงเกิดโรคได้ขึ้นอยู่กับ

1.1 ความสามารถในการทำให้แมลงเกิดโรค (pathogenicity) คือ เชื้อราสามารถเข้าทำลายแมลงได้ และทำลายระบบภูมิคุ้มกันในตัวแมลงทำให้แมลงเป็นโรคตาย เชื้อราบางชนิดผลิตสารพิษที่รุนแรงทำให้แมลงตายเร็วขึ้น บางชนิดเพียงแค่ใช้แร่ธาตุ และสารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโตเท่านั้น หรือบางชนิดแมลงสามารถกำจัดเชื้อราออกจากตัวแมลงได้ ซึ่งความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับสกุล และชนิดของเชื้อรานั้นๆ

1.2 ความรุนแรงของเชื้อรา (virulence) คือ เชื้อราที่สามารถทำให้แมลงเกิดโรคและทำให้แมลงตายได้มาก หรือน้อยแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับ สกุล ชนิด และสายพันธุ์ ดังนั้นเชื้อราในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันจึงทำให้แมลงเกิดโรค และตายได้แตกต่างกัน

2. ชนิดของแมลง ผนังลำตัวของแมลงประกอบด้วยไคติน และโปรตีน ในปริมาณที่ต่างกันไป ในแมลงแต่ละชนิด ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการงอกของคอนิเดีย และการแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง นอกจากนี้สารอาหารที่อยู่ภายในตัวแมลงที่มีปริมาณแตกต่างกันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตต่อเชื้อรา องค์ประกอบเหล่านี้จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะเจาะจงของเชื้อราต่อแมลงชนิดนั้น ๆ

3. ตำแหน่ง และวิธีการเข้าสู่ตัวแมลง ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราจะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยไม่สามารถเข้าสู่ตัวแมลงได้ทางผนังลำตัว และเข้าได้ทุกส่วนของตัวแมลง เช่น หัว ตา ขา ปีก โดยเฉพาะตามรอยต่อของข้อ ปล้องของแมลง เช่น ปล้องอก ปล้องท้อง ปล้องขา และปล้องหนวด เป็นต้น แมลงที่มีผนังลำตัวแข็งจะทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราได้ดีกว่าแมลงที่มีผนังลำตัวอ่อนนุ่ม

4. สภาพแวดล้อม ได้แก่ สภาพของฤดูกาล อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ ปริมาณฝน และแสงอัลตราไวโอเล็ต ล้วนมีผลต่อการทำให้แมลงเกิดโรค

เชื้อร่าก่อโรคในแมลงกับการผลิตเอนไซม์ (Lluvia *et al.*, 2014 และ Subhoshmita *et al.*, 2016)

1. **ไลเปส** จะถูกสร้างขึ้นเพื่อตัดพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ย่อยสลายไขมัน (lipids) และไข (waxes) ที่เป็นส่วนประกอบในผนังชั้น epicuticle

2. **โปรติเอส** จะถูกสร้างขึ้นหลังจากการย่อยสลายผนังชั้น epicuticle เพื่อสลายโปรตีน โดยตัดพันธะ peptide ของโปรตีนเป็นสายเปปไทด์ที่สั้นลง และกรดอะมิโน เพื่อใช้เป็นสารอาหารในการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง โดยความสามารถในการก่อโรคและระดับความรุนแรงขึ้นอยู่กับศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3. **ไคติเนส** จะถูกสร้างขึ้นเพื่อสลายไคตินโดยตัดพันธะ β -1,4 glycosidic ของ β -1,4 N-acetyl glucosamine เป็น N-acetyl glucosamine (GlcNAc) โดยเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจะนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ การสร้างเส้นใยในการเจริญเติบโต

St Leger *et al.* (1993) ได้ศึกษาเอนไซม์ในกลุ่มย่อยไคตินจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ME1 ซึ่งเป็นเชื้อร่าก่อโรคใน แมลงโดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อราสามารถ ผลิตเอนไซม์ย่อยไคตินได้ 2 ชนิดคือ endochitinase (CHI1, CHI2 และ CHI3) ซึ่งมีมวลโมเลกุล 33, 43.5 และ 45 กิโลดาลตัน ตามลำดับ และ exochitinase (N-acetyl

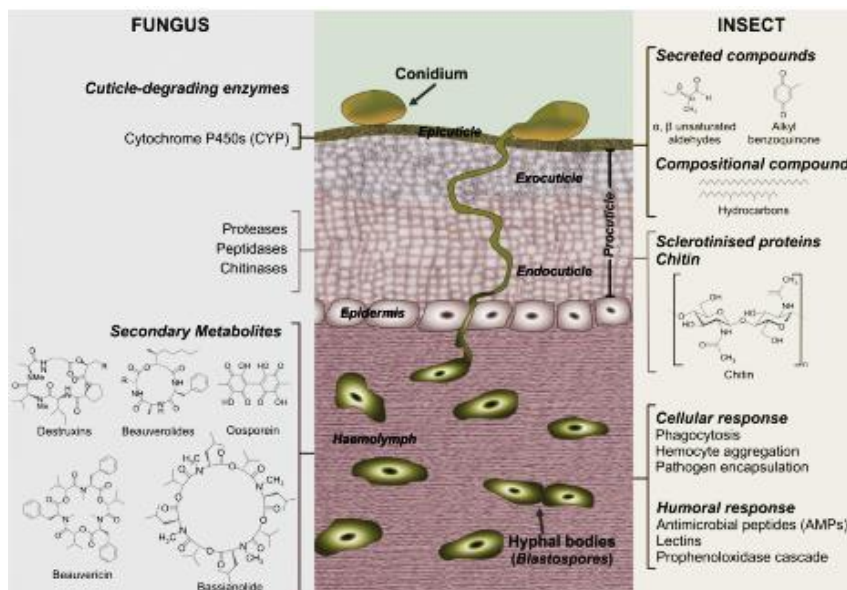
glucosaminidase) มีมวลโมเลกุล 110 กิโลดาลตันนอกจากนี้ในการผลิตเอนไซม์อื่นๆพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic) โดยสามารถผลิตได้ทั้ง endoprotease ได้แก่ serine protease subclass subtilisin (Pr1), trypsin like serine protease (Pr2), cysteine protease (Pr3-4) และ metalloprotease ในส่วน exoprotease ได้แก่ aminopeptidase, dipeptidylpeptidase และ carboxypeptidase ตามลำดับ และเอนไซม์ protease ยังพบในเชื้อรากลุ่ม Beauveria bassiana สามารถผลิตเอนไซม์ protease ในกลุ่ม serine protease เชื้อ Entomophthora coronata, Nomuraea rileyi (El-Sayed et al., 1989), Verticillium lecanii (Jackson et al., 1985) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ protease เพื่อใช้ในการเข้าก่อโรคในแมลง

Hsiao (1998) ได้ใช้ชุดทดสอบ API ZYM กับเชื้อ Beauveria bassiana, Metarhizium anisoplia, Verticillium lecanii พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ phosphoamidase, α -mannosidase, leucine aminopeptidase, acid phosphatase, β -glucosaminidase และ esterase lipase เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราก่อโรคในแมลง

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงหลายชนิดสร้างสารพิษทำลายแมลง (bioinsecticide) เช่น เชื้อรา Beauveria bassiana ผลิตสารพิษบิวเวอริซิน (Beauvericin) และเชื้อรา Metarhizium anisopliae ผลิตสารพิษเดสตรักซิน (Destruxin) เป็นต้น Hypocrellins A (HA) และ B (HB) คือรงควัตถุที่แยกได้จากเชื้อรากลุ่ม Hypocrella bambusae และ Shiraia bambusicola โดย H. bambusae เป็นก่อโรคของ Sinarundinaria sp. quinonoid hypocrellin สามารถนำมาใช้เป็น phototherapeutic agent รักษาแผลที่ผิวหนังได้ (Nenghui and Zhiyi, 1992) สกัดสารจากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ Aschersonia sp. นำมาประเมินฤทธิ์การฆ่าแมลง Drosophila melanogaster พบว่าสารที่แยกได้คือ destruxins A4 และ A5 มีฤทธิ์ฆ่าแมลงโดยมี ค่า LC เท่ากับ 41 ppm และ 52 ppm ตามลำดับ (Krasnoff et al., 1996) Boonphong et al. (2001) นำเส้นใยของเชื้อ Aschersonia tubulata BCC1785 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกสาร พบว่า สารที่แยกได้คือ dustanin และ 3β -acetoxy-15 α , 22dihydroxyhopane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค Mycobacterium tuberculosis H37R9 โดย ให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สารพิษเหล่านี้มีพิษรุนแรงต่อแมลงมากน้อยแตกต่างกัน (ทิพย์วดี, 2535) แต่ตัวแมลงก็มีกลไกในการปกป้องตนเอง (self-medication) จากเชื้อรา ได้แก่ การสร้างสารต้านเชื้อรา (antifungal) และมีพฤติกรรมต่าง ๆ เช่น การขุดและอาศัยอยู่ภายในโพรง (burrowing) เพื่อให้ร่างกายอบอุ่น การขนย้ายซากแมลงที่ตายออกจากรัง (corpse removal) รวมถึงการทำความสะอาดตัวเอง (grooming) และทำความสะอาดให้กันระหว่างสมาชิกภายในรัง (allogrooming) (Okuno et al., 2012 และ Qiu et al., 2016)



ภาพที่ 6 กระบวนการติดเชื้อของเชื้อราก่อโรคในแมลงในแมลง ตัวอย่างของเอนไซม์ย่อยสลาย คิวติเคิลและออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นพิษจากเชื้อราที่หลั่งออกมาใน hemolymph รวมทั้งองค์ประกอบที่ผิวของแมลงและระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองต่อการบุกรุกของเชื้อรา ที่มา : Pedrini (2018)

เชื้อราก่อโรคในแมลงกับการผลิตสารปฏิชีวนะ

ความพิเศษในคุณสมบัติของการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของราก่อโรคในแมลงที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานหลายๆด้านที่มีความสำคัญเช่นทางการแพทย์ใช้เพื่อรักษาหรือป้องกันการติดเชื้อจากเชื้อก่อโรคชนิดต่างๆเป็นต้นเชื้อราก่อโรคในแมลงนั้นถือเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแหล่งใหญ่ที่ได้จากธรรมชาติ นับแต่อดีตที่แพทย์ชาวจีนสมัยโบราณได้มีการนำไปใช้ในการรักษาโรคต่างๆจนมีการพัฒนาปรับปรุงและสังเคราะห์เป็นตัวยาใช้ในปัจจุบัน (Isaka *et al.*, 2005) การศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นสารปฏิชีวนะของเชื้อราก่อโรคในแมลงเริ่มมีการศึกษาเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ดังรายงานที่มีการค้นพบของ ริชดาและคณะ (2547) ได้รายงานการค้นพบสารใหม่ในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloids) จากการหาโครงสร้างสารโดยอาศัยข้อมูลทางสเปกโทรสโกปี (spectroscopy) ซึ่งสารนี้แยกได้จากเชื้อราก่อโรคในแมลงสายพันธุ์ *Isaria tenuipes* BCC7831

Lee *et al.* (2005) ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antibacterial/antifungal) ของสารสกัดจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 47 ตัวอย่าง ที่อยู่ในสกุลต่างๆพบว่ามีฤทธิ์ต้าน *Bacillus subtilis* จำนวน 38 ตัวอย่าง, มีฤทธิ์ต้าน *Staphylococcus aureus* จำนวน 30 ตัวอย่าง และมีฤทธิ์ต้าน *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 10 ตัวอย่าง

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. ตัวอย่างแมลง

ตัวอย่างเชื้อราแมลง (Samples of insect fungi) ได้จากการแยกจากตัวอย่างแมลง และการแยกจากตัวอย่างดิน

หนอนผีเสื้อกินไข่ม้วนขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.)

2. เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

กระดาษกรอง (Filter paper) เบอร์ 1

จานเพาะเชื้อ (Petri dishes)

กล่องพลาสติก (Plastic box)

กระจกปิดสไลด์ (Cover Slide) แผ่นสไลด์ (Slide)

แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader glass)

บีกเกอร์ (Beaker)

ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)

เข็มฉีดยา (Needle)

ที่เจาะจุกคอร์ก (Cork borer)

ฮีโมไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer)

venire caliper

กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope และแบบ stereo microscope

กล้องถ่ายภาพ (Camera)

ตู้อบเชื้อ (Incubator) : ยี่ห้อ Memmert ประเทศเยอรมนี

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) : ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HICLAVE HG –

50 ประเทศญี่ปุ่น

ตู้ปลอดเชื้อ (Safety Cabinet) : ยี่ห้อ Heal Force 1200 ประเทศจีน

เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex) : ยี่ห้อ Mixer Uzusio VTX – 300 ประเทศเยอรมนี

ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

3. สารเคมี

โบรโมครีซอล เพอร์เพิล (Bromocresol purple)

โบรโมครีซอล กรีน (Bromocresol green)

ยาปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (Streptomycin)

ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล (Chloramphenicol)

โดดีน (Dodine)

โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite)

กรดทาร์ทาริก (Tartaric acid)

- นมขาดมันเนย (Skim milk)
- สีย้อมเชื้อรา Lactophenol cotton blue
- แอลกอฮอล์ (Alcohol) ความเข้มข้น ร้อยละ 70 และร้อยละ 95
- ทวิน 80 (Tween-80)
- น้ำตาล (Sugar)
- 4. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ
 - อาหารสูตร PDA (potato dextrose agar)
 - อาหารสูตร VSM (Veens semiselective medium)
 - อาหารสูตร SDAY (Sabouraud Dextrose Agar plus Yeast)
 - อาหารสูตร SDA (Sabouraud dextrose agar)
 - อาหารสูตร colloidal chitin agar
 - อาหารสูตร Emzyme production medium

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อราก่อโรคในแมลง

1.1 สํารวจหาตัวอย่างแมลงในป่าบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง

เก็บตัวอย่างจากแหล่งสำรวจด้วยความระมัดระวังเนื่องจากตัวอย่างมีขนาดเล็กและ บอบบางอาจเสียหายได้ง่ายตัวอย่างที่เป็นแมลงฝังอยู่ในดินจะใช้พู่กันช่วยในการขุดขึ้นมาตัวอย่างที่ติดอยู่กับใบไม้หรือกิ่งไม้เล็กๆจะใช้มีดค่อยๆตัดเพื่อแยกตัวอย่างออกจากใบไม้และกิ่งไม้นั้นออกมา ตัวอย่างราก่อโรคบนแมลงที่สำรวจพบจะแยกเก็บลงกล่องพลาสติกตัวอย่างแต่ละชนิดถูกเก็บแยกออกจากกันทั้งนี้เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสปอร์ บันทึกข้อมูลต่างๆของเชื้อราได้แก่ สี ชนิดของแมลงที่ราก่อโรค นำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการโดยการนำมาวางบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) (วารุณี, 2554)

1.2 การแยกราก่อโรคแมลง

1) การแยกราก่อโรคในแมลงจากตัวแมลง

นำราบนตัวแมลง (จากข้อ 1.1) มาแยกเชื้อราก่อโรคในแมลง วิธีการแยกเชื้อราก่อโรคบนตัวแมลงนั้นมีหลายวิธีการทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะรูปร่างและหน้าที่ของสปอร์ของเชื้อราก่อโรคบนแมลงโดยแบ่งวิธีการที่ใช้ตามความเหมาะสมได้ดังต่อไปนี้

แมลงที่เก็บรวบรวมได้นำมาล้างที่ผิวด้วยสารละลาย 2% sodium hypochlorite เป็นเวลา 3 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น วางบนกระดาษกรอง ซับให้แห้ง นำมาวางบนอาหาร PDA ที่เติม 0.25 mg/ml chloramphenicol เป็นปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Lazgeen *et al.*, 2011)

- การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการใช้ส่วนของเชื้อราที่มีสปอร์ปาดไปโดยตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

- การใช้ส่วนของเชื้อราที่มีสปอร์จมลงใต้น้ำกลั่นเพื่อให้สปอร์ของราปล่อยออกมาเอง หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อแต่ละสปอร์และปาดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อนำตัวอย่างมาแยกให้ได้เส้นใยบริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation (Kalika *et al.*, 2004)

- การปล่อยให้สปอร์ราปล่อยออกมาเองโดยการใช้ส่วนของก้อนสโตรมา วางอยู่ด้านบนของอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วทิ้งไว้ข้ามคืนสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์จะพบว่าเชื้อราที่มีการปล่อยสปอร์ออกมาเป็นจำนวนมากวิธีนี้เหมาะสมกับราในสกุล *Cordyceps*, *Torrubiella*, *Hypocrella* นำไปบ่มเป็นที่ 25°C เป็นเวลา 6 วัน

2) การแยกรากอโรคิในแมลงจากดิน (Asensio *et al.*, 2003)

เก็บตัวอย่าง ดินจากอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง โดยให้มีส่วนของเศษใบไม้ด้วย สุ่มตัวอย่างดินในแต่ละที่ประมาณ 1.5-2 กิโลกรัม เก็บ 3 จุดแต่ละจุดเก็บให้ลึก 0-20 ซม. ผสมให้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้วใช้ตะแกรงขนาด 2 มิลลิเมตร ร่อนเอาเศษใบไม้และเก็บไว้ที่ 4°C ในที่มืดก่อนการใช้งาน (ไม่เกิน 12 เดือน)

1) นำตัวอย่างดินจำนวน 0.2 กรัม ใส่ในหลอดไมโครที่มีสารละลาย Tween-80 ความเข้มข้น 0.02% ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร นำไปเขย่า เป็นเวลา 15 นาที นำมาทำการเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}

2) นำมาวางบนจานอาหารที่ใช้ในการคัดเลือก (selective medium) 2 ชนิด คือ

- PDA ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้ potato dextrose agar น้ำกลั่น 1,000 มล.ปรับค่า pH เท่ากับ 4.0 ด้วย HCl (Shimazu and Sato, 1996)

- Veens semiselective medium (VSM) ซึ่งประกอบด้วย Dodine 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Chloramphenicol 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, Streptomycin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, SDA (sabouraud dextrose agar) 32.5 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร (Veen and Ferron, 1996) จากนั้นนำไปบ่มเป็นที่ 25°C เป็นเวลา 6 วัน

3) การแยกรากอโรคิในแมลงโดยการใช้เหยื่อปฏิปักษ์ (Zimmermann, 1986)

ใช้หนอนผีเสื้อกินไหม้ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.) เป็นแมลงปฏิปักษ์ที่เหมาะสมที่สุดของราจากดินแปลงเกษตร นำดินที่เก็บสดๆหรือดินที่เก็บที่ 4°C ไม่เกิน 12 เดือน จำนวน 40 กรัม นำมาร้อนด้วยตะแกรงร่อนขนาดรู 1 มิลลิเมตร นำไปใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) นำตัวหนอนในระยะ L1-L3 มาฝัง 3 ตัวต่อจานเพาะเชื้อ ปิดขอบจานด้วยพาราฟิล์ม บ่มจานที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 15 วัน ในที่มืด จากนั้นนำแมลงออกมาตัดเป็นชิ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวแมลงด้วย 1% sodium hypochlorite เป็นเวลา 1 นาที ด้วยความระมัดระวัง ล้างออกด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำแมลงที่ปลอดเชื้อมาวางในจานเพาะเชื้อที่มีกระดาษซับที่ปลอดเชื้อ ซับให้แห้งแล้ววางใน moist chambers เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25°C ในที่มืด ซึ่งสภาพดังกล่าวจะทำให้มีการเจริญของเส้นใยรากอโรคิในแมลง และมีการสร้างสปอร์ ซึ่งจะสังเกตเห็นเป็นเส้นใยสีขาวคล้ายสำลี นำตัวอย่างที่มีเชื้อรามาวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่มี penicillin 50 µg/ml,

streptomycin 50 µg/ml, rose bengal 50 µg/ml และ Triton X-100 ปริมาณ 1 mg/ml. จากนั้นนำไปบ่มเป็นที่ 25°C เป็นเวลา 6 วัน

ทำการคัดเลือกราก่อโรคในแมลงทั้งหมดที่แยกได้ โดยดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี เช่น สี ขนาด และ รูปร่างของสปอร์ เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีและเนื้อของเส้นใย(mycelia texture) เมื่อแยกได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วส่วนหนึ่งส่งให้นักอนุกรมวิธานเชื้อเพื่อการจำแนก ใช้เปรียบเทียบกับเอกสารงานวิจัยอนุกรมวิธานของราก่อโรคบนแมลง ที่รายงานมาก่อนเพื่อระบุชื่อทางวิทยาศาสตร์ของราชชนิดนั้น (Hywel-Jones, 1995a, 1995b, 1996, 1997a, 1997b และ Hywel-Jones, 1998)

2 การประเมินการผลิตเอนไซม์

2.1 การประเมินการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง (Agrawal and Kotasthane, 2012)

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ซึ่งมีอายุ 5 วัน โดยการ subculture ด้วยการเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนอาหาร colloidal chitin agar ที่มีไคตินความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร และเติม bromocresol purple ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เท่ากับ 4.7 ซึ่งถ้ามีการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส เอนไซม์นี้จะสามารถตัดพันธะ β -(1-4)-glycosidic ของไคตินที่ผสมอยู่ในอาหารให้เป็นหน่วยเล็ก ๆ คือ N-acetylglucosamine (GlcNAc) เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH จะเกิดการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีเหลืองเป็นสีม่วง โดยการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสในปริมาณที่แตกต่างกัน จะเกิดโซนของสีม่วงขึ้นบนอาหารขนาดแตกต่างกันไป ทำการวัดขนาดของโซนสีหลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการวัดขนาดของโคโลนี และขนาดของ clear zone ของเชื้อทำทุก ๆ วัน เป็นเวลา 7 วัน

2.2 การประเมินการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง (Vijayaraghavan and Vincent, 2013)

นำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ซึ่งมีอายุ 5 วัน โดยการ subculture ด้วยการเจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ไปเลี้ยงบนอาหาร sabouraud dextrose agar ผสม skim milk ความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร และเติม bromocresol green ความเข้มข้น 0.015 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เท่ากับ 4.7 ซึ่งถ้ามีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH จะเกิดการเปลี่ยนสีของ bromocresol green จากสีฟ้าปนเขียว (greenish-blue) เป็นสีเขียวเหลือง (yellow-green) โดยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณที่แตกต่างกันจะเกิดโซนของสีเขียวเหลืองขึ้นบนอาหารขนาดแตกต่างกันไป ทำการวัดขนาดของโซนสีหลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน

2.3 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ (Kanlayakrit *et al.*, 2004)

การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราก่อโรคแมลง

เชื้อราก่อโรคแมลงที่แยกได้มา subculture ด้วย ที่เจาะจุกคอร์กขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรจำนวน 10 ชิ้นใส่ลงไปในช่วงรูปขมพู ขนาด 500 มิลลิเมตรที่มีอาหารเหลว

enzyme producing medium (EPM) pH 5.0 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรแล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ/นาที เป็นเวลา 25 วัน

2.3.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (chitinase activity)

เก็บตัวอย่าง crude enzyme จากขบวนการหมัก โดยการดูดสารละลายในอาหารเหลวปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรทุกๆ 48 ชั่วโมงเป็นเวลา 25 วันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำส่วนของเหลวใสซึ่งเป็น crude enzyme มาหากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสซึ่งเป็นการวัดปริมาณน้ำตาล(reducing sugar) ที่เกิดจากการย่อยไคติน โดยเอนไซม์ไคตินเนส ด้วยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS) ของ Miller (1959) ซึ่ง N-acetylglucosamine (GlcNAc) เป็นตัวมาตรฐานโดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (IU) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินไปเป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.3.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Proteinase activity)

ตัวอย่างของเหลวใสซึ่งเป็น crude enzyme ที่เหลือจากการทดลองที่ 3.3.1 นำมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยการวัดปริมาณโปรตีนที่เกิดจากการย่อยเคซีน (casein) โดยเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการของ Sundararajan *et al.* (2010) ด้วยวิธี Folin-Lowry ของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นตัวมาตรฐาน โดยเอนไซม์ 1 ยูนิต (IU) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยเคซีนไปเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมลภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ (Kanlayakrit *et al.*, 2004)

การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดให้ละเอียดลงใน crude enzyme ที่มีปริมาณ 100 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กวนอย่างต่อเนื่องจนสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 20 หลังจากนั้นกวนทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นแยกเก็บตะกอนที่เกิดขึ้นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีนาน 15 นาทีแล้วละลายตะกอนด้วย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.0 หลังจากนั้นบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส แล้วนำไปไดอะไลซิสใน 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl บัฟเฟอร์ pH 8.0 นำสารละลายเอนไซม์ไปวัดปริมาณ ปริมาณโปรตีน และ กิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน (ศิริลาภา, 2544)

เตรียมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 250, 400, 500, 700 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตรเติม reagent C หลอดละ 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารฟอลินรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu reagent) ลงไปหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้น

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากสารละลายตัวอย่าง

นำตัวอย่างของสารละลายที่ต้องการทดสอบมาบรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการทดลองเช่นเดียวกับการเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน มีอัตราค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณโปรตีน

3.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4-12 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ทดลองในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสโดยเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสตามลำดับ

3.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์ช่วงพีเอช ระหว่าง 4-12 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้ได้ 7.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (residual activity)

3.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสตามลำดับโดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนำไปต้มในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีแล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันทีจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่

4. การประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น (ดัดแปลงมาจาก Lorian, 1996)

การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

นำเชื้อราก่อโรคในแมลงที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพาะเลี้ยง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 5 วันใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรเจาะรูรอบโคโลนีของเชื้อราก่อโรคในแมลงนำมาประเมินฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

4.1 การประเมินฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย เชื้อที่นำมาทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ทำการทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี agar diffusion

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture ที่เก็บไว้ในอาหาร nutrient agar (NA) slant มา streak บนอาหาร Mueller Hinton agar (MHA) ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆบ่มที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมงแล้วนำโคโลนีเดี่ยวๆมา 2-3 โคโลนีใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

วิธีการทดสอบ ใช้ cotton swab ปลอดเชื้อจุ่มแบคทีเรียที่เตรียมไว้บิดข้างหลอดพอหมาดๆนำมาป้ายให้ทั่วบนอาหาร MHA โดยป้าย 3 แนวทำมุม 60 องศาจากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีวางลงบนวุ้นอาหารใน 1 plate วางประมาณ 4 จุดโดยมีชุดควบคุมเป็นวุ้นอาหารปลอดเชื้อและแผ่นยามาตรฐานที่เหมาะสมต่อเชื้อทดสอบดังนี้

- *S.aureus*, *S. epidermidis* ใช้แผ่นยามาตรฐาน vancomycin , amikacin หรือ ampicillin
- *E. coli* ใช้แผ่นยามาตรฐาน ampicillin amikacin หรือ tetracycline
- *P. aeruginosa* ใช้แผ่นยามาตรฐาน tetracycline
- นำไปเพาะเลี้ยงที่ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นด้วย venire caliper

4.2 การประเมินฤทธิ์ต้านยีสต์และรา

4.2.1 การประเมินฤทธิ์ต้านยีสต์ เชื้อยีสต์ที่นำมาทดสอบได้แก่ *Candida albicans* ทำการทดสอบแบบ agar diffusion เช่นเดียวกับการทดสอบแบคทีเรีย

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อยีสต์จาก stock culture ที่เก็บไว้ในอาหาร Sabouraud's dextrose agar (SDA) slant มา streak บนอาหาร SDA plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง แล้วนำโคโลนีเดี่ยวๆมา 2-3 โคโลนีใส่ใน 0.85% NaCl ปลอดเชื้อและปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

วิธีการทดสอบ

ใช้ cotton swab ปลอดเชื้อจุ่มเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้บิดข้างหลอดพอหมาดๆนำมาป้ายให้ทั่วบนอาหาร SDA โดยป้าย 3 แนวทำมุม 60 องศาจากนั้นนำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีวางลงบนวุ้นอาหารใน 1 plate วางประมาณ 4 จุดโดยมีชุดควบคุมเป็นวุ้นอาหารปลอดเชื้อและยา amphotericin B (10 ไมโครกรัมต่อแผ่น disc) สำหรับเชื้อ *C. albicans* นำไปเพาะเลี้ยงที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone ที่เกิดขึ้นด้วย venire caliper

4.2.2 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อราชนิดเส้นใย ทำการประเมินฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นต่อเชื้อ *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Cladosporium* sp., *Alternaria* sp. และ *Curvularia* sp. โดยวิธี dual culture ดังนี้

วิธีการเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบ เชื้อราจาก stock culture มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ให้มีขนาดโคโลนี ประมาณ 1-2 เซนติเมตร

วิธีการทดสอบ นำชิ้นวุ้นที่เจาะรอบโคโลนีราที่โรยในแมลงที่แยกได้วางให้ห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2 เซนติเมตร และวางให้ห่างจากขอบโคโลนีราที่ทดสอบ 5 เซนติเมตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตผลที่เกิดขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เชื้อราทดสอบที่เพาะในอาหารที่ไม่เพาะเชื้อราที่โรยในแมลงเชื้อเป็นชุดควบคุม สังเกตผลที่เกิดขึ้นหากสามารถยับยั้งเชื้อราได้สายราบริเวณที่อยู่ใกล้กับชิ้นวุ้นที่วางจะไม่เจริญหรือเจริญช้าลงเปรียบเทียบกับด้านที่ไม่ได้อยู่ใกล้ชิ้นวุ้นและชุดควบคุม

บันทึกผลดังนี้

- ไม่มีการยับยั้งเชื้อราเจริญเลย
- + มีการยับยั้งเพียงเล็กน้อย
- ++ มีการยับยั้งเห็น inhibition zone ชัดเจน

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ในการกำจัดมดคันไฟ

เพาะเลี้ยงมดคันไฟ (*Solenopsis geminata*) จากพื้นที่ทำการเกษตร ในตำบลควนกรด อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 2 รัง ในกล่องพลาสติก (15 x 15 x 35 เซนติเมตร) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 85% และให้หนอนนกระยะตัวหนอนเป็นอาหาร (Qiu *et al.*, 2016)

เพาะเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 14 วัน มาละลายสปอร์ด้วย Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในน้ำกลั่น ตรวจนับปริมาณสปอร์ ด้วย Hemocytometer และปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้เท่ากับ 5×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ธัญมณ, 2557)

นำมดคันไฟระยะมดงานมาศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ โดยดัดแปลงตามวิธีการของ Okuno *et al.* (2012) และ Qiu *et al.* (2016) จุ่มมดงาน ในสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงแต่ละไอโซเลต เป็นเวลานาน 10 วินาที แล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ในหลอดทดสอบซึ่งมีน้ำตาล ความเข้มข้น 25 % ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 80 - 90 % นับจำนวนการตายของมดคันไฟทุก 7 และ 14 วัน มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง โดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

$$\text{สูตร} \quad \text{เปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริง} = (A-B) \times 100 / (100-B)$$

$$A = \text{อัตราการตายของกลุ่มทดลอง}$$

$$B = \text{อัตราการตายของชุดควบคุม}$$

$$\text{โดย} \quad \text{อัตราการตาย} = \text{จำนวนมดที่ตาย} \times 100 / \text{จำนวนมดทดลอง}$$

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว จะใช้มดงานที่ไม่จุ่มสปอร์ของเชื้อราเป็นชุดควบคุมและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการ DMRT

บทที่ 3

ผล และอภิปรายผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง และการแยกเชื้อราก่อโรคในแมลง

1.1 สํารวจหาตัวอย่างแมลงในป่าบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง

จากการสำรวจราก่อโรคในแมลง ในป่าบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ป่าที่สามารถเดินสำรวจได้ จำนวน 3 พื้นที่ คือ

1. ป่าบริเวณน้ำตกโยง (เฉพาะในเขตนํ้าตกเท่านั้น) ซึ่งเป็นเส้นทางเดินป่าสำหรับนักท่องเที่ยว ลักษณะผิวดินจะถูกปกคลุมด้วยใบไม้หนาประมาณ 5 เซนติเมตร มีทั้งไม้ยืนต้นขนาดใหญ่และไม้ขนาดเล็ก

2. ป่าบริเวณน้ำตกวังปริง เป็นเส้นทางที่ชาวบ้านใช้เดินป่า โดยลักษณะพื้นที่เป็นภูเขาสูงชัน ต้นไม้ใหญ่ถูกบุงกรุก มีเพียงต้นไม้ขนาดเล็กเป็นส่วนใหญ่ พื้นดินมีใบไม้ไม่เยอะ

3. ป่าบริเวณน้ำตกปลิว เป็นเส้นทางเดินป่า โดยลักษณะพื้นที่เป็นภูเขาสูงชัน และเป็นผาหินยากต่อการเดินสำรวจ ต้นไม้ใหญ่ปกคลุม มีไม้ขนาดเล็กเล็กน้อย

พบราทำลายแมลงจากบริเวณที่ศึกษา จำนวน 13 ตัวอย่าง คือ บนตัวมดสีดำ, แมลงวัน, ผีเสื้อ, ตัวแตน, ผึ้ง ที่อยู่ใต้ใบไม้ และหนอนด้วง, มวนบริเวณท่อนไม้ที่กำลังผุ ซึ่งสามารถจำแนกเบื้องต้นเป็นราในจีนัส *Hirsutella* sp., *Cordyceps* sp., *Ophiocordyceps* sp., *Beauveria* sp., *Erynia* sp. และ *Paecilomyces* sp. (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างราทำลายแมลงในป่าบริเวณเขตอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง

ตัวอย่างแมลง แหล่งที่พบ	อันดับของแมลงอาศัย	การจัดจำแนกชนิดราแมลง
IA1 น้ำตกโยง	มดสีดำ อันดับ Hymenoptera	 <i>Hirsutella</i> sp.
IF2 น้ำตกวังปริง	แมลงวัน อันดับ Diptera ลักษณะเส้นใยคลุมทั้งตัว แต่ ไม่มีก้าน stoma	 <i>Erynia</i> sp.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างแมลง แหล่งที่พบ	อันดับของแมลงอาศัย	การจัดจำแนกชนิดราแมลง
IA3 น้ำตกวังปริง	มดสีดำ Hymenoptera	 <i>Cordyceps</i> sp.
IC4 น้ำตกวังปริง	แมลงอันดับ Coleoptera พบบริเวณผิวดิน มีลักษณะเป็นเส้นใยเส้นเดียวและส่วนที่เหนือดินมีลักษณะสโตรมาสีขาว	 <i>Ophiocordyceps</i> sp.
IC5 น้ำตกวังปริง	แมลงอันดับ Coleoptera บริเวณท่อนไม้ที่กำลังผุ เชื้อราเจริญขึ้นมาเป็นก้อน สโตรมาสีเทา มีสปอร์สีขาวปกคลุมบริเวณด้านบน	 <i>Beauveria</i> sp.
IC6 น้ำตกโยง	แมลงอันดับ Coleoptera เชื้อราเจริญมีลักษณะเส้นใยคล้ายเขากวาง	 <i>Paecilomyces</i> sp.
IA7 น้ำตกโยง	มด อันดับ Hymenoptera	 <i>Ophiocordyceps</i> sp.

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างแมลง แหล่งที่พบ	อันดับของแมลงอาศัย	การจัดจำแนกชนิดราแมลง
IF8 น้ำตกโยง	เชื้อราเจริญบนผีเสื้ออันดับ Lepidoptera ยังไม่มี stoma	 <p data-bbox="1198 685 1318 719"><i>Isaria</i> sp.</p>
IF9 น้ำตกวังปริง	พบบริเวณกิ่งไม้ เชื้อราเจริญ บนตัวแตนอันดับ Hymenoptera มีstoma สี ครีม	 <p data-bbox="1198 931 1449 965"><i>Hirsutella saussurei</i></p>
IA10 น้ำตกวังปริง	มด อันดับ Hymenoptera	 <p data-bbox="1198 1155 1374 1189"><i>Hirsutella</i> sp.</p>
IC11 น้ำตกปลิว	หนอนด้วงอันดับ Coleoptera เชื้อราที่มีลักษณะ เส้นใยคล้ายเขากวาง	 <p data-bbox="1198 1379 1374 1413"><i>Beauveria</i> sp.</p>
IC12 น้ำตกปลิว	พบบริเวณผิวดิน กับแมลง อันดับ Coleoptera มี ลักษณะเส้นใยแตกเป็นแฉก คล้ายเขากวาง	 <p data-bbox="1198 1659 1430 1693"><i>Paecilomyces</i> sp.</p>
I13 น้ำตกปลิว	ผึ้ง	 <p data-bbox="1198 1964 1461 1998"><i>Hirsutella saussurei</i></p>

1.2 การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

1) การแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจากตัวแมลง

จากการนำตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อราที่สำรวจจากน้ำตกโยง น้ำตกปลิว และน้ำตกวังปริง จำนวน 11 ตัวอย่าง ประกอบด้วย IA1, IF2, IA3, IC4, IC5, IC6, IA7, IF8, IF9, IA10, IC11 และ IC13 มาแยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single spore isolation โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 45 ไอโซเลท ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ 45 ไอโซเลท จากตัวอย่างแมลง 11 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ตำแหน่งแยกเชื้อ	รหัสเชื้อ
มด IA1 จากน้ำตกโยง	จากสปอร์	PC11W1, PP11W1, PP11W2
แมลงวัน IF2 จากน้ำตกวังปริง	จากตัวแมลง	PI21W1, PI21W2, PI22W1
แมลง IA3 จากน้ำตกวังปริง	จากสปอร์	PC31W1, PC32Y1, PP31W1, PP32W1
	จากตัวแมลง	PI31W1, PI32W2
แมลง IC4 จากน้ำตกวังปริง	จากสปอร์	PP42W1, PP43W1, PP43W2
แมลง IC5 จากน้ำตกวังปริง	จากสปอร์	PP51W1, PP51W2, PP52W1, PP53Y1
แมลง IC6 จากน้ำตกโยง	จากสปอร์	PP61W1, PP61W2, PP61S1, PP62G1, PP63W1, PP63D1
มดสีดำ IA7 จากน้ำตกโยง	จากตัวแมลง	PI72W1
ผีเสื้อ IF8 จากน้ำตกโยง	จากตัวแมลง	PI81S1, PI83G1
แตน IF9 จากน้ำตกวังปริง	จากตัวแมลง	PI91W2, PI91W1, PI92W1
	จากสปอร์	PP91W1, PP93W1
มด IA10 จากน้ำตกวังปริง	จากตัวแมลง	PI101W1, PC101R1, P101W2
แมลง IC11 จากน้ำตกวังปริง	จากตัวแมลง	PI111G1
แมลง IC12 จากน้ำตกปลิว	จากตัวแมลง	PI121D1
	จากตัวแมลง	PI131W1, PI131W2, PI132W1,
ผึ้ง IF13 จากน้ำตกปลิว		PT131W1
	จากสปอร์	PC131G1, PC131W1, PC131W2

หมายเหตุ PC = แยกเชื้อโดยใช้สำลีสป้ายจากสปอร์

PI = แยกเชื้อจากตัวแมลง

PP = แยกเชื้อจากสปอร์

เช่น PP91W1 คือ ตัวอย่างแมลงที่ 9 แยกเชื้อจากสปอร์ มีสีขาวตัวที่ 1

2) การแยกรากอโรคีในแมลงจากดิน

ตัวอย่างดิน 7 ตัวอย่างที่เก็บในบริเวณที่พบตัวอย่างแมลงที่ติดเชื้อราจากน้ำตักโยง, น้ำตักปลิว และน้ำตักวังปริง นำมาแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอล ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 31 ไอโซเลท (ตารางที่ 3) ประกอบด้วยเชื้อที่แยกจากตัวอย่างดินบริเวณน้ำตักโยงจำนวน 8 ไอโซเลท น้ำตักปลิว จำนวน 8 ไอโซเลท และน้ำตักวังปริง จำนวน 15 ไอโซเลท โคโลนีหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ส่วนใหญ่มีลักษณะเส้นใยสีขาว พูเล็กน้อยและมีการสร้างสปอร์สีเขียวน ส่วนบนอาหาร VSM ที่เติมยาปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอล ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน ปริมาณ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโดดิน ปริมาณ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท) ประกอบด้วย เชื้อที่แยกจากตัวอย่างดินบริเวณน้ำตักโยงจำนวน 4 ไอโซเลท น้ำตักปลิว จำนวน 13 ไอโซเลท และน้ำตักวังปริง จำนวน 2 ไอโซเลท โคโลนีหลังจากการบ่มเชื้อเป็นเวลา 6 วัน ส่วนใหญ่มีลักษณะเส้นใยสีขาว พูเล็กน้อยและมีการสร้างสปอร์สีเหลือง

ตารางที่ 3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกจากตัวอย่างดินที่ทำการเก็บตัวอย่างราแมลง จากบริเวณน้ำตักโยง และน้ำตักวังปริง ด้วยสูตรอาหาร PDA และ VSM

แหล่งแยกเชื้อ	จำนวนไอโซเลทของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	
	อาหาร PDA	อาหาร VSM
ดินจากน้ำตักโยง	PS22G2, PS24W1, PS27W1, PS34W1, PS35W1, PS51G3, PS51D1, PS51W2	VS22W1, VS32W1, VS51W2, VS51W5
ดินจากน้ำตักปลิว	PS61S1, PS61W1, PS61G2, PS61G3, PS62G1, PS71W2, PS72R1, PS72G1	VS61S1, VS61G1, VS61G2, VS61W1, VS61W2, VS62W1, VS71W2, VS71W3, S71D1, VS72W1, VS72W2, VS73W1, VS73D1
ดินจากน้ำตักวังปริง	PS11R1, PS12W1, PS12G2, PS12G3, PS15G1, PS15Y1, PS16W1, PS17G1, PS17D1, PS41D1, PS41W2, PS41R1, PS42D1, PS42W1, PS42G2	VS12W1, VS42W1

3) การแยกรากอโรคในแมลงโดยใช้เชื้อปฏิปักษ์

ใช้หนอนผีเสื้อกินใบไม้ขนาดใหญ่ (*Galleria mellonella* L.) เป็นแมลงปฏิปักษ์ที่เหมาะสมที่สุดของรากจากดินแปลงเกษตร อ.ทุ่งสง และ อ.ชะอวด ได้ทั้งสิ้น 10 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกจากตัวอย่างดินแปลงเกษตร

ตัวอย่างดิน	ไอโซเลท
ดินในสวนส้ม อ.ทุ่งสง	SOT11, SOT 13, SOT 14, SOT 16
ดินสวนมะนาว อ.ทุ่งสง	SLT21, SLT22, SLT23, SLT26
ดินนาข้าว อ.ชะอวด	SRC41, SRC44

นราทร (2549) กล่าวว่าชนิดของแมลง ผนังลำตัวของแมลงประกอบด้วยไคติน และโปรตีน ในปริมาณที่แตกต่างกันไปในแมลงแต่ละชนิด ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการงอกของคอนิเดีย และการทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง นอกจากนี้สารอาหารที่อยู่ภายในตัวแมลงที่มีปริมาณแตกต่างกันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตต่อเชื้อรา องค์ประกอบเหล่านี้จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะเจาะจงของเชื้อราต่อแมลงชนิดนั้น ๆ

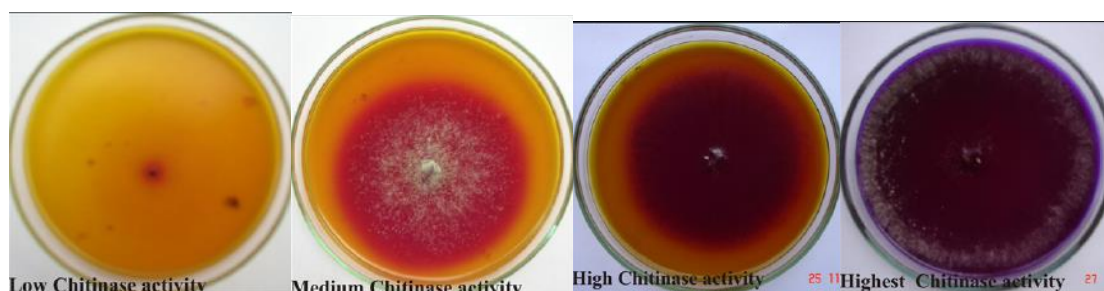
จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสูตรอาหารที่นำมาใช้ในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จากดิน ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของผู้วิจัยในการเลือกใช้สูตรอาหารและสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของแก้วบัวสอน และ สุกัญญา (2560) Tuining *et al.* (2010) และ Lucila *et al.* (2011) ที่สามารถแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจากดิน ด้วยอาหาร PDA และเมื่อนำเชื้อราที่แยกได้มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นและจำแนกชนิด ตามวิธีของ Humber (1998) และ Lydia *et al.* (2017) พบว่าเป็นเชื้อรา *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp. และ *Paecilomyces* spp. นอกจากนี้ยังพบว่าเป็นเชื้อรา *Nomuraea* sp. อีก 1 ไอโซเลท ที่แยกจากดิน ในน้ำตกโยงแต่มีรายงานการค้นพบเชื้อราชนิดนี้จากดินอยู่น้อยมาก ซึ่งจากการสังเกตลักษณะพื้นที่เก็บตัวอย่างดิน พบว่ามีผีเสื้อจำนวนมาก ซึ่งเป็นแมลงอาศัย (Host) ของเชื้อราชนิดนี้

จะเห็นได้ว่าอาหาร PDA สามารถแยกรากจากตัวอย่างดินได้มากกว่าอาหาร VSM แต่จากการสังเกตเชื้อราที่เจริญบนอาหาร VSM จะมีการปนเปื้อนของเชื้อราทั่วไปน้อยกว่าบนอาหาร PDA การเติมสารกำจัดเชื้อราทั่วไปที่เจริญได้ในดิน เป็นการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ซึ่งเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงในการเจริญเติบโต การแยกเชื้อราชนิดนี้จำเป็นต้องใช้อาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่สามารถแยกด้วยอาหารสังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ จึงมีการพัฒนาสูตรอาหารให้มีความจำเพาะต่อการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยการเติมสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เช่น คลอแรมเฟนิคอล , สเตรปโตมัยซิน หรือ เตตราไซคลิน (tetracycline) (Goetted and Inglis, 1997) ในการทดลองของแก้วบัวสอนและสุกัญญา (2560) แยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงได้ 3 ชนิด คือ *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp., และ *Paecilomyces* spp. จากตัวอย่างดินในแปลงปลูกพืชเกษตรกรรม และ ป่าธรรมชาติ ด้วยอาหาร PDA ที่เติม สเตรปโตมัยซิน 350 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, เตตราไซคลิน

50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไซโคลเฮกซอไมด์ (cycloheximide) 125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Tuining *et al.* (2010) แยกเชื้อรา *Beauveria sp.*, *Metarhizium sp.* และ *Paecilomyces sp.* จากตัวอย่างดินด้วยอาหาร PDA ที่เติม เพนิซิลลิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร และสเตรปโตมัยซิน 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สิริฉัตร (2546) แยกเชื้อรา *Hypocrella scutata* จากเพลี้ยหอยที่ตาย ด้วยอาหาร PDA ที่เติม สเตรปโตมัยซิน 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, คลอแรมเฟนิคอล 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ เพนิซิลลิน (penicillin) 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Lucila *et al.* (2011) แยก *B. bassiana*, *M. anisopliae* และ *I. fumosorosea* จากดิน ด้วยอาหาร PDA ที่เติม คลอแรมเฟนิคอล 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานการเติมสารยับยั้งการเจริญของราชนิดอื่นที่ไม่ใช่เชื้อราสาเหตุโรคแมลง Tae-Young *et al.* (2010) นำโดดิน ซึ่งเป็นสารกำจัดเชื้อราทั่วไปมาใช้ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคพืชและเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางชนิดที่แยกจากดิน พบว่า ปริมาณของโดดินที่เหมาะสมในการแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงคือ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้าหากปริมาณโดดินต่ำกว่า 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการเจริญของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงได้มากขึ้น แต่ก็อาจจะมี การเจริญของกลุ่มเชื้อราอื่นเจริญได้ เช่น เชื้อราสกุล *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* และ *Penicillium* (Humber, 1998)

2 การประเมินการผลิตเอนไซม์ไคติเนสและโปรตีนสบนอาหารแข็ง

การผลิตเอนไซม์ไคติเนส (ตารางที่ 5) เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากข้อ 1 ทั้งหมด 105 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar ที่เติม โบรโมครีซอล เพอร์เฟิล โดยเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีจากสีเหลืองเป็นสีม่วง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar ที่เติม โบรโมครีซอล เพอร์เฟิล

ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีมากที่สุด เท่ากับ 90.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ที่ระยะ 3 วันของการเจริญ จำนวน 6 ไอโซเลท ประกอบด้วย PS15G1, PS17G1, PS22G2, VS51W5, PS61W1 และ VS71W2 รองลงมาคือ PS72G1 เท่ากับ 86.50 ± 0.71 มิลลิเมตร หาอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีกับขนาดโคโลนี มีค่าสูงสุด จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PS61W1, VS51W5,

PS22G2, PS15G1 และ PS72G1 เท่ากับ 1.88 ± 0.00 , 1.88 ± 0.00 , 1.88 ± 0.00 , 1.87 ± 0.01 , 1.84 ± 0.04 ตามลำดับ รองลงมาคือ VS71W2 เท่ากับ 1.64 ± 0.00 รายงานวิจัยก่อนหน้านี้ การศึกษาศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ ไคตินเนสเบื้องต้น จะใช้อาหาร colloidal chitin agar ที่ไม่เติมอินดิเคเตอร์ (นราทร, 2554, Murthy and Bleakley, 2012 และ Methanee *et al.*, 2016) จากการวิจัยนี้เบื้องต้นพบว่า การตรวจผลอาจผิดพลาดได้จากโซนใส (clear zone) ที่ไม่ได้เกิดขึ้นอย่างชัดเจน จึงมีการปรับปรุงสูตรอาหารด้วยการเติมอินดิเคเตอร์ โบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล ทำให้ง่ายและมีความแม่นยำมากขึ้นต่อการตรวจผลไคตินเนสจะสลายพันธะ β -1,4 glycosidic บริเวณ β -1,4 N-acetylglucosamine ของไคตินได้เป็น N-acetylglucosamine (Subhoshmita *et al.*, 2016) ส่งผลต่อค่าพีเอชในอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของโบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล จากสีเหลืองเป็นสีม่วง รอบโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ โดย Agrawal and Kotasthane (2012) รายงานการผลิตไคตินเนสของเชื้อรา *Trichoderma* spp. ด้วยอาหาร colloidal chitin agar ที่เติม โบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล ปริมาณ 0.15 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอช เท่ากับ 4.7 เช่นเดียวกับ เบญจวรรณและนริศ (2561) โดยประเมินการผลิตไคตินเนสของเชื้อแอกติโนมัยซิส ด้วยอาหาร Glucose Yeast Malt extract agar ที่เติม colloidal chitin 10 กรัมต่อลิตร และโบโรโมครีซอล เพอร์เฟิล 0.15 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (ตารางที่ 5) เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้จากข้อ 1 ทั้ง 105 ไอโซเลท มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสบนอาหารแข็ง sabouraud dextrose agar ผสม skim milk และเติม โบโรโมครีซอล กรีน โดยเปลี่ยนสีอาหารรอบโคโลนีจากสีฟ้าปนเขียวเป็นสีเขียวเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีมากที่สุด เท่ากับ 90.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ที่ระยะ 3 วันของการเจริญ จำนวน 16 ไอโซเลท ประกอบด้วย PS12W1, PS15G1, PS22G2, PS34W1, VS32W1, PS41W2, PS42D1, PS42W1, PS42G2, VS42W1, VS51W5, PS61S1, PS61W1, PS72G1, VS71W3 และ VS72W1 รองลงมาคือ VS71D1 เท่ากับ 84.50 ± 0.71 มิลลิเมตร หาอัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีกับขนาดโคโลนี มีค่าสูงสุด จำนวน 5 ไอโซเลท คือ PS72G1, PS61W1, VS51W5, PS22G2 และ PS15G1 เท่ากับ 1.96 ± 0.00 , 1.96 ± 0.00 , 1.94 ± 0.00 , 1.94 ± 0.04 , 1.94 ± 0.04 ตามลำดับ รองลงมาคือ PS12W1 และ VS22W1 เท่ากับ 1.58 ± 0.04 รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้การศึกษาศักยภาพในการผลิตโปรติเอสเบื้องต้นบนอาหาร sabouraud dextrose agar ผสม skim milk ที่ไม่เติมอินดิเคเตอร์ (นราทร, 2554 และ Alnahdi, 2012) จากการวิจัยนี้เบื้องต้นพบว่า การตรวจผลอาจผิดพลาดได้จากโซนใส (clear zone) ที่ไม่ได้เกิดขึ้นอย่างชัดเจน จึงมีการปรับปรุงสูตรอาหารด้วยการเติมอินดิเคเตอร์ โบโรโมครีซอล กรีน ทำให้ง่ายและมีความแม่นยำมากขึ้นต่อการตรวจผล โปรติเอสจะสลายพันธะเปปไทด์ ของโปรตีนเป็นเปปไทด์สายสั้นลง และกรดอะมิโน (Subhoshmita *et al.*, 2016) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ โบโรโมครีซอล กรีน จากสีฟ้าปนเขียวเป็นสีเขียวเหลืองรอบโคโลนีที่มีการผลิตเอนไซม์ โดย Vijayaraghavan and Vincent (2013) รายงานการศึกษาศักยภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ VV บนอาหาร sabouraud dextrose agar ผสม skim milk และเติมอินดิเคเตอร์ โบโรโมครีซอล กรีน 0.015 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 8.0 พบว่าการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารรอบ ๆ โคโลนีที่มีการผลิต

เอนไซม์ เอนไซม์ที่ผลิตโดยเชื้อราก่อโรคในแมลงค่อนข้างโดดเด่นมักเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคตินได้ (chitinolytic enzyme) เนื่องจากกลไกการเข้าก่อโรคในแมลงของเชื้อราในขั้นเริ่มต้นในเชื้อราที่เป็น endoparasite จะเกิดขึ้นโดย germinating conidia มีการผลิต extracellular enzyme ได้แก่ chitinase, lipase และ protease เพื่อใช้ย่อยผนังชั้นนอกของแมลงทำให้เชื้อราสามารถเข้าไปเพิ่มจำนวนภายในแมลงได้ (Isaka *et al.*, 2005)

จากการสังเกตเชื้อราทดสอบบางไอโซเลทมีการเจริญของโคโลนีได้รวดเร็ว แต่มีการเปลี่ยนแปลงสีในอาหารจากการผลิตเอนไซม์ได้น้อย หาระดับศักยภาพการผลิตเอนไซม์ โดยการแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีระดับศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ต่ำ (Low) (มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าหรือเท่ากับ 60 มม.), กลุ่มที่ 2 มีระดับศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ปานกลาง (Medium) (มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 - 80 มม.) และกลุ่มที่ 3 มีระดับศักยภาพในการผลิตเอนไซม์สูง (High) (มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่าหรือเท่ากับ 81) พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด อยู่ในกลุ่ม High/High มีจำนวน 8 ไอโซเลท คือ PS15G1, PS22G2, VS51W5, PS61W1 และ PS72G1 ดังภาพที่ 4 จึงคัดเลือกเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลทนี้ไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 5 ประเมินศักยภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเบื้องต้นบนอาหารแข็ง หลังจากการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน

ลำดับที่	รหัส	ขนาดของโซนสีจากการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ขนาดของโซนสีจากการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ระดับศักยภาพการผลิตเอนไซม์
1	PC11W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
2	PP11W1	0.00 \pm 0.00 ^w	8.33 \pm 0.58 ^{pq}	Low/ Low
3	PP11W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
4	PI21W1	15.00 \pm 0.00 ^u	0.00 \pm 0.00 ^q	Low /Low
5	PI21W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
6	PI22W1	51.67 \pm 0.58 ^e	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
7	PC31W1	9.67 \pm 0.58 ^v	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
8	PC32Y1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
9	PP31W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
10	PP32W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
11	PI_31W1	12.33 \pm 1.15 ^u	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
12	PI32W2	89.00 \pm 1.73 ^a	83.3 \pm 0.58 ^a	High/High
13	PP42W1	20.00 \pm 1.00 ^t	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
14	PP43W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
15	PP43W2	31.50 \pm 0.50 ^q	5.67 \pm 0.58 ^q	Low/Low
16	PP51W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
17	PP51W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ขนาดของไซนส์จาก การผลิตเอนไซม์โคติเนส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ขนาดของไซนส์จาก การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ระดับศักยภาพ การผลิตเอนไซม์
18	PP52W1	9.33 \pm 1.15 ^v	10.67 \pm 0.58 ^p	Low/Low
19	PP53Y1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
20	PP61W1	0.00 \pm 0.00 ^w	12.00 \pm 1.00 ^p	Low/Low
21	PP61W2	8.00 \pm 0.00 ^v	10.33 \pm 0.58 ^p	Low/Low
22	PP61S1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
23	PP62G1	19.33 \pm 0.58 ^{tu}	6.00 \pm 1.00 ^q	Low/Low
24	PP63W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
25	PP63D1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
26	PI72W1	2.50 \pm 0.00 ^v	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
27	PI81S1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
28	PI83G1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
29	PP91W1	95.00 \pm 0.00 ^a	91.47 \pm 0.06 ^a	High/High
30	PP93W1	0.00 \pm 0.00 ^w	1.07 \pm 0.06 ^q	Low/Low
31	PI91W1	6.93 \pm 0.06 ^v	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
32	PI91W2	1.53 \pm 0.06 ^v	1.17 \pm 0.06 ^q	Low/Low
33	PI92W1	0.70 \pm 0.00 ^v	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
34	PC101W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.50 \pm 0.00 ^q	Low/Low
35	PC101R1	6.70 \pm 0.20 ^v	0.63 \pm 0.12 ^q	Low/Low
36	PP101W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
37	PI111G1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.57 \pm 0.06 ^q	Low/Low
38	PI121D1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
39	PT131W1	1.43 \pm 0.12 ^v	1.07 \pm 0.06 ^q	Low/Low
40	PC131G1	91.63 \pm 0.12 ^a	89.07 \pm 0.06 ^a	High/High
41	PC131W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.57 \pm 0.15 ^q	Low/Low
42	PC131W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
43	PI131W1	0.00 \pm 0.00 ^w	0.43 \pm 0.12 ^q	Low/Low
44	PI131W2	0.00 \pm 0.00 ^w	0.27 \pm 0.06 ^q	Low/Low
45	PI132W1	0.00 \pm 0.00 ^w	1.03 \pm 0.06 ^q	Low/Low
46	PS11R1	08.00 \pm 0.00 ^v	13.50 \pm 0.71 ^p	Low/Low
47	PS12W1	63.50 \pm 0.71 ^{ef}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/High
48	PS12G2	22.50 \pm 0.00 ^{rs}	38.00 \pm 2.12 ^l	Low/Low
49	PS12G3	30.00 \pm 1.41 ^{mno}	33.00 \pm 1.41 ^m	Low/Low
50	PS15G1	90.00 \pm 0.00 ^a	90.00 \pm 0.00 ^a	High/High
51	PS15Y1	39.00 \pm 0.00 ^{kl}	51.00 \pm 0.00 ^{fgh}	Low/ Medium
52	PS16W1	54.00 \pm 0.00 ^{hij}	61.00 \pm 0.00 ^e	Medium/ Medium
53	PS17G1	90.00 \pm 0.00 ^a	55.00 \pm 0.00 ^f	High/ Medium

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ขนาดของไซนส์จาก การผลิตเอนไซม์โคติเนส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ขนาดของไซนส์จาก การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ระดับศักยภาพ การผลิตเอนไซม์
54	PS17D1	32.00 \pm 1.41 ^{mn}	80.00 \pm 0.00 ^{bc}	Low / Medium
55	VS12W1	31.00 \pm 0.00 ^{mn}	77.00 \pm 0.00 ^c	Low / Medium
56	PS22G2	90.00 \pm 0.00 ^a	90.00 \pm 0.00 ^a	High/High
57	PS24W1	75.00 \pm 0.00 ^c	80.00 \pm 0.00 ^{bc}	Medium/ Medium
58	PS27W1	09.00 \pm 0.00 ^y	29.50 \pm 0.71 ^{mn}	Low/Low
59	VS22W1	28.00 \pm 4.24 ^{nopq}	30.00 \pm 1.41 ^{mn}	Low/Low
60	PS34W1	49.00 \pm 0.00 ^j	90.00 \pm 0.00 ^a	Low/ High
61	PS35W1	21.00 \pm 0.00 ^{rst}	31.00 \pm 0.00 ^m	Low/ Low
62	VS32W1	61.00 \pm 0.00 ^{fg}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
63	PS41D1	29.00 \pm 1.41 ^{nop}	26.00 \pm 1.41 ^{no}	Low/Low
64	PS41W2	59.00 \pm 0.00 ^{fgh}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/High
65	PS41R1	00.00 \pm 0.00 ^w	00.00 \pm 0.00 ^q	Low/Low
66	PS42D1	51.00 \pm 0.00 ^{ij}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium / High
67	PS42W1	56.00 \pm 1.41 ^{ghi}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
68	PS42G2	54.00 \pm 0.00 ^{hij}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
69	VS42W1	68.50 \pm 0.71 ^{de}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
70	PS51G3	17.00 \pm 0.00 ^{tu}	26.00 \pm 2.83 ^{no}	Low/Low
71	PS51D1	39.50 \pm 2.12 ^{kl}	72.00 \pm 0.00 ^d	Low/ Medium
72	PS51W2	20.00 \pm 2.83 ^{stu}	31.00 \pm 0.00 ^m	Low/Low
73	VS51W2	14.75 \pm 0.35 ^u	22.50 \pm 3.54 ^o	Low/Low
74	VS51W5	90.00 \pm 0.00 ^a	90.00 \pm 0.00 ^a	High/High
75	PS61S1	68.00 \pm 1.41 ^{de}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
76	PS61W1	94.00 \pm 0.00 ^a	93.00 \pm 0.00 ^a	High/High
77	PS61G2	30.00 \pm 0.00 ^{mnp}	47.00 \pm 0.00 ^{hij}	Low/Low
78	PS61G3	41.00 \pm 2.82 ^k	29.00 \pm 0.00 ^{mn}	Low/Low
79	PS62G1	32.00 \pm 1.41 ^{mn}	45.50 \pm 0.71 ^{ij}	Low/Low
80	VS61S1	15.00 \pm 1.41 ^u	30.50 \pm 3.54 ^{mn}	Low/Low
81	VS61G1	22.50 \pm 1.41 ^{rs}	31.75 \pm 0.35 ^m	Low/Low
82	VS61G2	32.00 \pm 1.41 ^{mn}	30.00 \pm 1.41 ^{mn}	Low/Low
83	VS61W1	25.50 \pm 0.00 ^{opqr}	40.25 \pm 0.35 ^{kl}	Low/Low
84	VS61W2	24.50 \pm 0.71 ^{pqrs}	31.50 \pm 0.71 ^m	Low/Low
85	VS62W1	28.00 \pm 0.00 ^{nopq}	46.00 \pm 0.00 ^{ij}	Low/Low
86	PS71W2	42.00 \pm 1.41 ^k	76.00 \pm 0.00 ^{cd}	Low/ Medium
87	PS72R1	25.25 \pm 2.47 ^{opqrs}	39.50 \pm 2.12 ^{kl}	Low/Low
88	PS72G1	86.50 \pm 0.71 ^{ab}	90.00 \pm 0.00 ^a	High/High
89	VS71W2	90.00 \pm 0.00 ^a	52.00 \pm 1.41 ^{fg}	High/Low

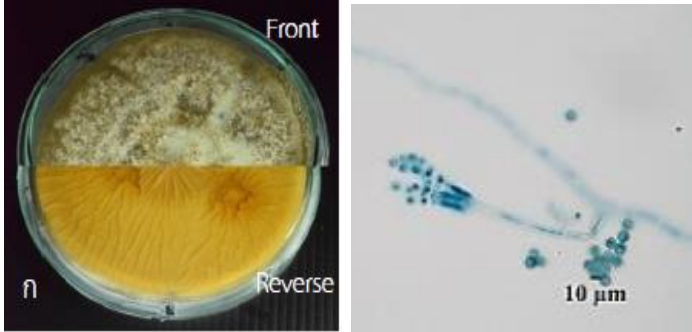
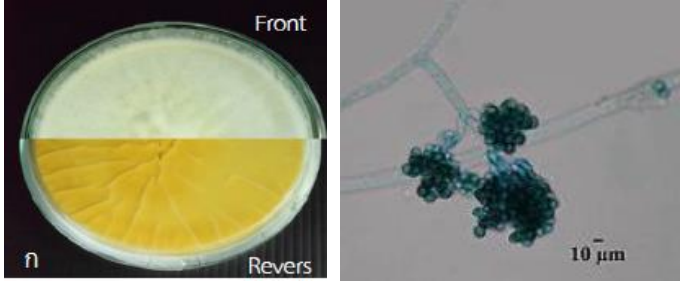
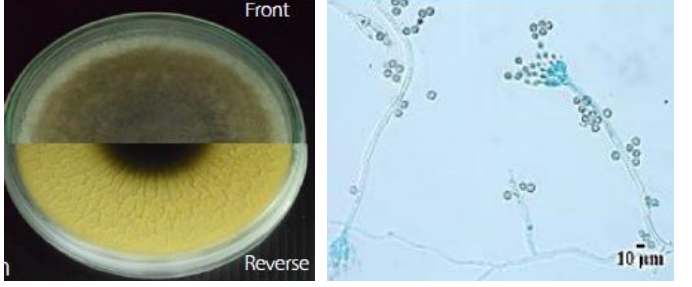
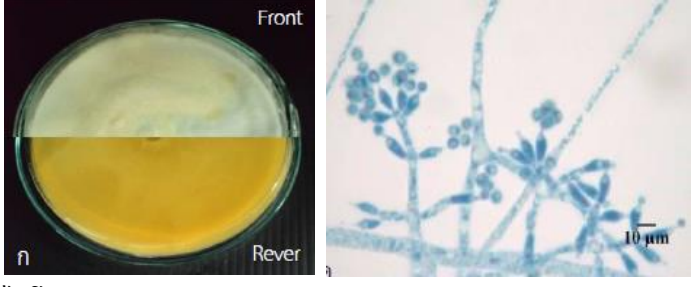
ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลำดับที่	รหัส	ขนาดของโคนสีจาก การผลิตเอนไซม์ไคติเนส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ขนาดของโคนสีจาก การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (มิลลิเมตร \pm S.D. ¹)	ระดับศักยภาพ การผลิตเอนไซม์
90	VS71W3	73.00 \pm 2.83 ^{cd}	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
91	VS71D1	53.00 \pm 0.0 ^{0ij}	84.50 \pm 0.71 ^b	Medium/ High
92	VS72W1	74.00 \pm 0.00 ^b	90.00 \pm 0.00 ^a	Medium/ High
93	VS72W2	29.00 \pm 1.41 ^{nop}	43.00 \pm 1.41 ^{jk}	Low/Low
94	VS73W1	34.50 \pm 0.71 ^{lm}	50.00 \pm 0.00 ^{ghi}	Low/Low
95	VS73D1	23.00 \pm 0.00 ^{qrs}	17.00 \pm 0.00 ^f	Low/Low
96	SOT11	60.10 \pm 0.00 ^{fg}	18.00 \pm 0.00 ^f	Medium /Low
97	SOT 13	53.00 \pm 0.0 ^{0ij}	52.00 \pm 1.41 ^{fg}	Low/Low
98	SOT 14	24.50 \pm 1.41 ^{rs}	82.50 \pm 0.71 ^b	Low/ High
99	SOT 16	85.53 \pm 0.12 ^{ab}	60.00 \pm 0.00 ^e	High/ Medium
100	SLT21	87.50 \pm 0.71 ^a	31.50 \pm 0.71 ^m	High/Low
101	SLT22	74.00 \pm 2.83 ^{cd}	61.00 \pm 0.00 ^e	Medium/ Medium
102	SLT23	60.15 \pm 0.00 ^{fg}	83.50 \pm 0.71 ^b	Medium/ High
103	SLT26	74.98 \pm 0.00 ^b	76.00 \pm 0.00 ^{cd}	Medium/ Medium
104	SRC41	71.98 \pm 0.00 ^b	75.00 \pm 0.00 ^{cd}	Medium/ Medium
105	SRC44	75.98 \pm 0.00 ^b	74.00 \pm 0.00 ^{cd}	Medium/ Medium


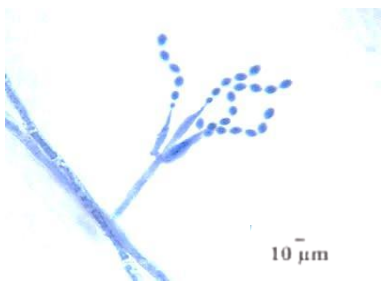

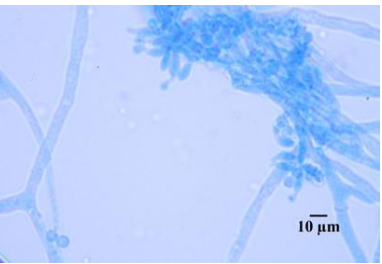



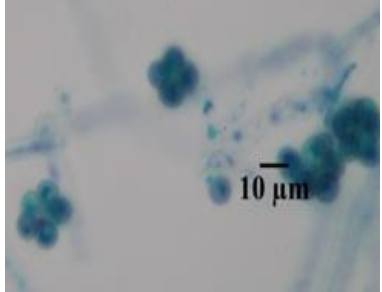
3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

นำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ จำนวน 8 ไอโซเลท ประกอบด้วย PS15G1, PS22G2, VS51W5, PS61W1, PS72G1, PI32W2, PP91W1 และ PC131G1 ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร SDAY เป็นเวลา 14 วัน และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทียบเคียงเป็น *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beaveria* sp. PS61W1, *Paecilomyces* spp. PS72G1, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1 และ *Hirsutella sawsurei* PC131G1 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) (Humber, 1998 และ Lydia *et al.*, 2017)

ตารางที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การเทียบเคียง(Humber, 1998 และ Lydia et al., 2017)
	<i>Metarhizium</i> sp.
<p>ไอโซเลท PS15G1</p> 	<i>Gliocladium</i> spp.
<p>ไอโซเลท PS22G2</p> 	<i>Nomuraea</i> sp.
<p>ไอโซเลท VS51W5</p> 	<i>Beaveria</i> sp.
<p>ไอโซเลท PS61W1</p>	

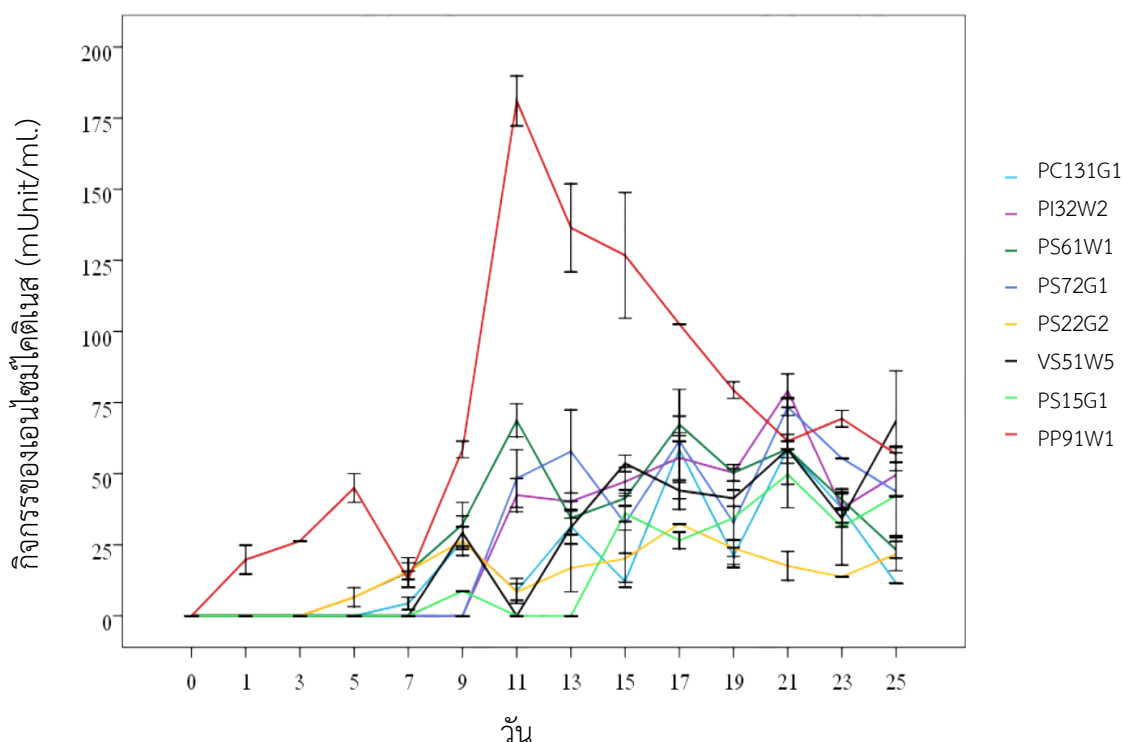
ตารางที่ 6 (ต่อ)

ลักษณะโคโลนีและสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การเทียบเคียง		
 <p>Front Reverse</p>	 <p>10 μm</p>	<i>Paecilomyces</i> spp	
ไอโซเลท PS72G1		 <p>10 μm</p>	<i>Cordyceps</i> sp.
ไอโซเลท PI32W2		 <p>10 μm</p>	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
ไอโซเลท PP91W1		 <p>10 μm</p>	<i>Hirsutella sawsurei</i>
ไอโซเลท PC131G1			

4. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity)

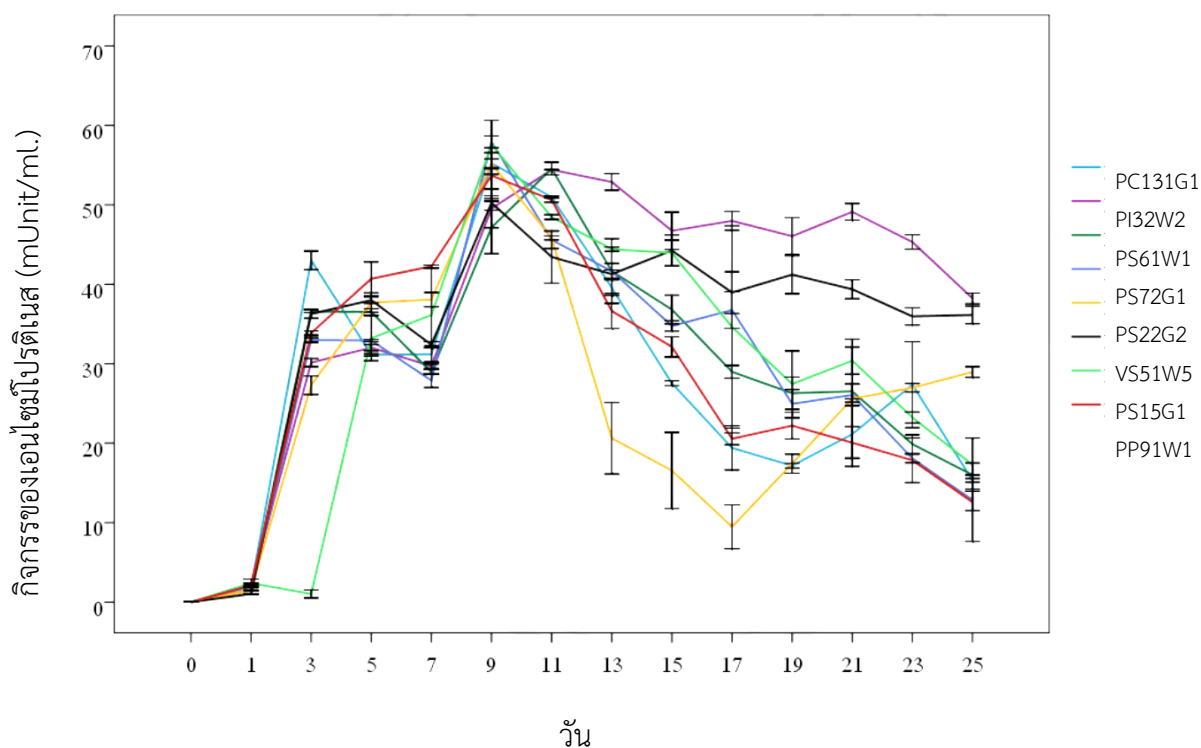
รายงานการวิจัยก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงโดย Draganova *et al.* (2010) ได้แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของขนาดโคโลนีในเชื้อรา *Beauveria* spp. มีความผันแปรของขนาด โคโลนี ตั้งแต่ 17.7 - 34 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับในเชื้อรา *M. anisopliae* มีความผันแปรของขนาดโคโลนี ตั้งแต่ 4.69 - 6.33 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mungbean agar (MU) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สุกัสสา, 2550) ในขณะที่ Shah *et al.* (2005) ได้รายงานถึงอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี (growth rate) ในเชื้อรา *M. anisopliae* อยู่ในช่วง 4.1 - 4.19 มิลลิเมตร/วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Parker *et al.* (2003) ได้แสดงถึงอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีในเชื้อรา *Beauveria* spp. ซึ่งอยู่ในช่วง 0.36 - 1.18 มิลลิเมตร/วัน (เฉลี่ย 0.87 มิลลิเมตร/วัน) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การแสดงผลการผลิตเอนไซม์โดยการวัดขนาดโซนสีที่เปลี่ยนแปลงในอาหารและขนาดโคโลนีอาจจะไม่สามารถบ่งชี้ปริมาณเอนไซม์ที่แท้จริงได้ จึงได้ทำการการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเหลว EPM พบว่าเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสอยู่ในช่วง 6.58-181.05 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร โดยเชื้อรา PP91W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุดคือ 181.05 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร ในวันที่ 11 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ในระดับ High ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้อากาศ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราในกลุ่ม high efficacy เริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันที่ 1 และมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 9-10 โดยเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในช่วง 50.24-55.24 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อรา ไอโซเลท PS61W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 55.24 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร นอกจากนี้ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจะเกิดขึ้นหลังจากเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 9-10 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 9) ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองของ Dhar and Kaur (2010) ที่เลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ในอาหารที่มีเคซีนเป็นส่วนประกอบ พบว่ามีกิจกรรมสูงสุดในช่วงวันที่ 4-6 แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบในอาหารสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจะเกิดขึ้นหลังจากการมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากส่วนประกอบของผนังลำตัวแมลงประกอบไปด้วยโปรตีนมากกว่าครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งของผนังลำตัว (Klowden, 2002; Nation, 2008) และยังประกอบไปด้วย ไคติน ฟีนอล และไขมัน (Nation, 2008) ดังนั้น เอนไซม์โปรติเอสน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงในกระบวนการย่อยโปรตีนบริเวณผนังลำตัวแมลงและอาจจะมียับยั้งที่สำคัญในการช่วยหรือส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสทำลายผนังเซลล์ลำตัวของแมลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ St. Leger *et al.* (1986b)



ภาพที่ 9 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ในระดับ High ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้อากาศ 200 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

5 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์

5.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเชื้อราไอโซเลท PS61W1 และ เชื้อราไอโซเลท PP91W1 มาศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4-12

จากผลที่ได้ในตารางที่ 7 เห็นได้ชัดว่าเชื้อราทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสทั้ง acid และ alkaline proteinase ในช่วงของ pH ระหว่าง 4 ถึง 9.0 มีรายงานว่าการผลิตโปรตีนเอสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งโปรตีนเอสเป็นกรดหรือด่าง ส่วนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดสิ่งมีชีวิตและแหล่งที่มาของการแยกเชื้อ (Pagare *et al.*, 2009) ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส คือ pH ที่ 8-9 Nascimento and Martins (1996) และ Sookkheo *et al.* (2000) รายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสอยู่ระหว่าง 7.0 ถึง 8.5 เช่นเดียวกับการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีนเอส พบว่ามีค่าสูงสุดที่ pH 9-13 (Borris, 1987)

การผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่าเชื้อราไอโซเลท PS61W1 และ PP91W1 สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ในช่วง pH ระหว่าง 4 ถึง 9.0 เช่นกัน โดยพีเอช 5 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 7.8×10^{-3} และ 13.3×10^{-3} mUnit/ml. ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Farag *et al.* (2014) พบว่า พีเอช 5 เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตได้จาก *Aspergillus terreus* และจากรายงานของ Mishra *et al.* (2013) ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ที่ได้จากรา *Beaveria bassiana* (HQ917687) พบว่า พีเอช 5 เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนส ความเหมาะสมของพีเอชที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ไคติเนสขึ้นอยู่กับความแตกต่างของอาหารที่ใช้ในการผลิต, พารามิเตอร์ รวมทั้งสายพันธุ์ของรา (Kang, 1999; Kim *et al.*, 2010; Mustafa and Kaur, 2010)

ตารางที่ 7 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเนสของเชื้อรา *Beaveria* sp. PS61W1 และ *Ophiocordyceps* sp. PP91W1

pH	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (mUnit/ml.)		กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนส (mUnit/ml.)	
	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
	PS61W1	PP91W1	PS61W1	PP91W1
4	7.4×10^{-3}	11.4×10^{-3}	11.7×10^{-3}	2.6×10^{-3}
5	7.8×10^{-3}	13.3×10^{-3}	10.6×10^{-3}	2.8×10^{-3}
6	7.0×10^{-3}	11.1×10^{-3}	10.9×10^{-3}	7.7×10^{-3}
7	6.7×10^{-3}	10.7×10^{-3}	12.4×10^{-3}	7.8×10^{-3}
8	5.4×10^{-3}	6.95×10^{-3}	13.2×10^{-3}	8.1×10^{-3}
9	7.6×10^{-3}	11.1×10^{-3}	16.1×10^{-3}	8.3×10^{-3}
10	6.7×10^{-3}	9.3×10^{-3}	12.9×10^{-3}	6.6×10^{-3}
11	6.4×10^{-3}	9.9×10^{-3}	12.8×10^{-3}	6.6×10^{-3}
12	6.6×10^{-3}	9.3×10^{-3}	12.3×10^{-3}	6.7×10^{-3}

5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

นำเชื้อราไอโซเลท PS61W1 และ เชื้อราไอโซเลท PP91W1 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ทดลองในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเนสของเชื้อรา *Beaveria* sp. PS61W1 และ *Ophiocordyceps* sp. PP91W1

อุณหภูมิ (°C)	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส (mUnit/ml.)		กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนส (mUnit/ml.)	
	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
	PS61W1	PP91W1	PS61W1	PP91W1
30	9×10^{-4}	3.5×10^{-3}	1.1×10^{-3}	3.2×10^{-3}
40	8×10^{-4}	3.6×10^{-3}	9.0×10^{-3}	3.8×10
50	3×10^{-4}	6.8×10^{-3}	9.3×10^{-3}	2.1×10
60	6.1×10^{-3}	4.2×10^{-3}	4.0×10^{-3}	9.5×10
70	7×10^{-4}	2.5×10^{-3}	2.1×10^{-3}	1.7×10
80	0.0	2.4×10^{-3}	2.5×10^{-3}	1.5×10

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากเชื้อราทั้งสองชนิด โดยการบ่มเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30 องศาเซลเซียส และ 80 องศาเซลเซียส ในการศึกษาเพื่อตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมโปรตีนเอสของเชื้อราพบว่า PS61W1 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส เท่ากับ 6.1×10^{-3} U / มิลลิลิตร / นาที; PP91W1 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส เท่ากับ 6.8×10^{-3} U / มิลลิลิตร / นาที และกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะลดลงหากอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

5.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

การศึกษาคความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียสตามลำดับโดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทันที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่

จากตารางที่ 8 จะสังเกตว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อราจะอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานที่ได้เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ที่พบว่ากิจกรรมของโปรตีนเอสเพิ่มขึ้นถึง 60 องศาเซลเซียสและการลดลงของกิจกรรมโปรตีนเอสยังพบได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Pagare *et al.*, 2009) เช่นเดียวกับเอนไซม์ไคตินเนสที่มีคุณสมบัติโดยทั่วไปคือ ทนความร้อนที่ 50°C และมีช่วงการทำงานที่ pH กว้างคือที่ pH 4.0 - 9.0 จึงเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นสารชีวภาพ ในการกำจัดและป้องกันเชื้อรา

ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์จากเชื้อราทั้งสองชนิด พบว่า เชื้อรา PS61W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด ที่ 40 องศาเซลเซียส (1.0×10^{-3} U/ml/min) เชื้อรา PP91W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุด ที่ 30 องศาเซลเซียส (4.6×10^{-3} U/ml/min) ขณะที่เชื้อรา PS61W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสสูงสุด ที่ 50 องศาเซลเซียส (6.2×10^{-3} U/ml/min) และเชื้อรา PP91W1 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสสูงสุด ที่ 40 องศาเซลเซียส (4.6×10^{-3} U/ml/min) ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ซึ่งความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอสของเชื้อราที่ทดสอบ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความทนทานต่ออุณหภูมิได้ในช่วงกว้าง จากการศึกษาคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์สามารถนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงและสามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอสได้ไปประยุกต์และศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป อีกทั้งการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์กลุ่มสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสและมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลง โดยมีการนำประโยชน์เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีศักยภาพทดแทนการสารเคมีได้

ตารางที่ 9 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสและโปรตีนเอสของเชื้อรา *Beaveria* sp. PS61W1 และ *Ophiocordyceps* sp. PP91W1

อุณหภูมิ (°C)	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส		กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส	
	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.	<i>Beaveria</i> sp.	<i>Ophiocordyceps</i> sp.
	PS61W1	PP91W1	PS61W1	PP91W1
30	0.2×10^{-3}	4.6×10^{-3}	1.7×10^{-3}	2.3×10^{-3}
40	1.0×10^{-3}	2.8×10^{-3}	1.4×10^{-3}	4.7×10^{-3}
50	0.2×10^{-3}	2.3×10^{-3}	6.2×10^{-3}	3.2×10^{-3}
60	0.3×10^{-3}	1.4×10^{-3}	4.1×10^{-3}	1.6×10^{-3}
70	0.9×10^{-4}	1.9×10^{-3}	2.3×10^{-3}	2.6×10^{-4}
80	0.3×10^{-4}	2.1×10^{-4}	0.8×10^{-3}	1.2×10^{-4}

6. การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

จากการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และโปรตีนเอสสูงสุด 8 ไอโซเลท คือ *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp.PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beaveria* sp.PS61W1, *Paecilomyces* spp.PS72G1, *Cordyceps* sp.PI32W2, *Ophiocordyceps* sp.PP91W1 และ *Hirsutella sawsurei* PC131G1 มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น ผลแสดงในตารางที่ 10

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียทดสอบ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อราส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ยกเว้น *Beaveria* sp. PS61W1 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดี และยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้บางส่วน ขณะที่ *Ophiocordyceps* sp. PP91W1 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ และยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้บางส่วน

ฤทธิ์ต้านเชื้อราเส้นใยผลการทดสอบพบว่า เชื้อราส่วนใหญ่สามารถต้านการเจริญของราเส้นใยได้เกือบทุกชนิด ลักษณะการยับยั้งราเส้นใย พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงบางไอโซเลทสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย บางไอโซเลทยับยั้งการสร้างของสปอร์หรือทำให้สีของสปอร์เปลี่ยนไป หรือเจริญปกคลุมเชื้อราทดสอบดังกล่าว บางไอโซเลทสามารถสร้างบริเวณยับยั้งราเส้นใยได้ สอดคล้องกับรายงานการผลิตเอนไซม์ทั้งในกลุ่ม chitinase และ β -1,3-/exo-1,4-glucanase ร่วมกับการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ (secondary metabolites) ของ *Streptomyces* ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราและแบคทีเรียที่ก่อโรคในพืชในระดับห้องปฏิบัติการและแปลงทดลอง (Souza *et al.*, 2008; Harikrishnan *et al.*, 2014) ผลของเอนไซม์ไคติเนสจากรา *Trichoderma* ซึ่งสามารถต้านการเจริญของเชื้อรา *Fusarium* และ *A. flavus* ได้ (Sonawane *et al.*, 2015) โดยเอนไซม์ไคติเนสจะย่อยสลายผนังเซลล์ของราเส้นใยซึ่งมีองค์ประกอบหลักคือ chitin และ β -1,3-glucan (Parker, 2000) เพื่อนำมาเป็นองค์ประกอบของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ซึ่งมีผลโดยตรงในการต้านเชื้อก่อโรคได้ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสและโปรตีนเอส

ตารางที่ 10 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 8 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์											
	SA	SE	E	PA	CA	AF	AN	R	M	CL	AL	CU
<i>Metarhizium</i> sp. PS15G1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Gliocladium</i> spp PS22G2	-	-	+	-	+	+	+	+	++	+	++	+
<i>Nomuraea</i> sp. VS51W5	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Beaveria</i> sp.PS61W1	++	++	++	-	+	+	+	+	++	+	+	+
<i>Paecilomyces</i> spp.PS72G1	-	-	+	-	+	+	+	++	++	+	++	++
<i>Cordyceps</i> sp.PI32W2	-	-	-	-	+	+	+	++	+	+	++	+
<i>Ophiocordyceps</i> sp PP91W1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
<i>Hirsutella sawsurei</i> PC131G1	-	-	-	-	+	+	+	++	+	+	++	+
Standard drug	Inhibition zone (mm.)											
Va 30 µg	13.3	17.8	0.0	16.5								
Tet 30 µg	22.8	28.6	20.6	17.5								

หมายเหตุ - ไม่มีการยับยั้งเชื้อราเจริญเลย + มีการยับยั้งเพียงเล็กน้อย ++ มีการยับยั้งเห็น inhibition zone ชัดเจน

Va=Vancomycin, Tet=Tetracycline

SA=*Staphylococcus aureus*, SE= *S. epidermidis*, E= *Escherichia coli* PA= *Pseudomonas aeruginosa*, CA= *Candida albicans*, AF= *Aspergillus flavus*, AN = *A. niger*, R= *Rhizopus* sp., M= *Mucor* sp., CL= *Cladosporium* sp., A= *Alternaria* sp. และ CU= *Curvularia* sp.

7. ประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้คัดเลือก

การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ได้คัดเลือกได้ 8 ไอโซเลท โดยการนำมดคันไฟในระยะมดงานที่มาเลี้ยงทดสอบในหลอดทดลอง ให้สารละลายน้ำตาล ร่วมกับการให้สปอร์เชื้อราเป็นอาหารเป็นเวลา 7 วัน สังเกตพฤติกรรมของมดคันไฟ หลังจากสัมผัส สารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราที่คัดเลือกทั้ง 8 ไอโซเลท พบว่า วันที่ 1 มดคันไฟทั้ง 5 ชุดการทดลอง เริ่มแสดงพฤติกรรมทำความสะอาดตัวเองและช่วยกันทำความสะอาดระหว่างสมาชิก ดังภาพที่ 10 ในวันที่ 2 มดทุกตัวเกาะรวมกลุ่มกันอยู่ที่ก้นหลอดทดลองเพื่อดูดกินอาหาร ซึ่งเป็นน้ำตาลปริมาณร้อยละ 25 ในวันที่ 3 มดทุกตัวมารวมกลุ่มกันบริเวณกลางหลอดทดลอง มดบางตัวเริ่มมีอาการอ่อนแอลง คือไม่สามารถเดินบนหลอดทดลอง บางตัวเริ่มไม่มีการเคลื่อนไหว วันที่ 5 เริ่มมีเชื้อราเจริญบริเวณ สำลีที่ติดกับแหล่งอาหาร ดังภาพที่ 11 ในขณะที่มดบางตัวเริ่มเดินไปมาภายในหลอดทดลอง ในวันที่ 15 มดที่ติดเชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 เริ่มปรากฏเชื้อราเจริญบนลำตัวมด มดที่ติดเชื้อรา *Nomuraea* sp. VS51W5 เริ่มปรากฏเชื้อราเจริญบนลำตัวมดในวันที่ 20 ดังภาพที่ 12 ส่วนมดที่ไม่ ติดเชื้อยังสามารถกินอาหารและเคลื่อนไหวได้ปกติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม มดที่ติดเชื้อรา *Metarhizium* sp. PS15G1, *Paecilomyces* sp. PS22G2 และ *Paecilomyces* sp. PS72G1 สังเกตไม่เห็นเส้นใยบนตัวมดแต่เมื่อครบ 30 วัน นำมดคันไฟที่ตายในแต่ละชุดการทดลองมา บันทึกรูปภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ปรากฏลักษณะการเจริญของเส้นใยรา แตกต่างกัน (ภาพที่ 13)



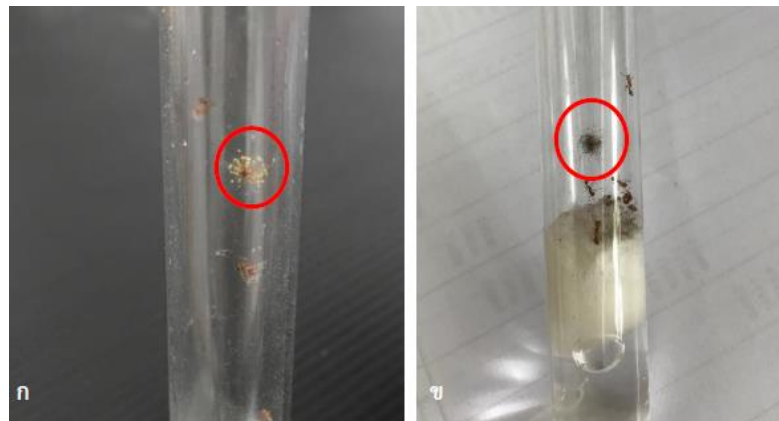
ภาพที่ 10 ลักษณะพฤติกรรมทำความสะอาดลำตัวของมดคันไฟ

(ก) มดทำความสะอาดตัวเอง (วงกลม) (ข) มดทำความสะอาดระหว่างสมาชิก (วงกลม)



ภาพที่ 11 แสดงลักษณะการกินอาหารและอาการที่อ่อนแอลงของมดคันไฟ

(ก) มดกำลังกินน้ำตาลที่ซึมผ่านสำลี (ข) เชื้อราที่เจริญบนสำลี (ศรีซี) มดที่มีมีอาการอ่อนแอลง (วงกลม)



ภาพที่ 12 ลักษณะเชื้อราเจริญบนตัวมดคันไฟ

(ก) เชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 (วงกลม) (ข) เชื้อรา *Nomuraea* sp. VS51W5 (วงกลม)

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการกำจัดมดคันไฟของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่แยกได้

ลำดับ	หน่วยทดลอง	ร้อยละการตายที่แท้จริง (mean±S.D.)			
		7 วัน	15 วัน	30 วัน	ค่าเฉลี่ย
1	ชุดควบคุม	00.00 ± 0.00 ^c	00.00 ± 0.00 ^d	00.00 ± 0.00 ^c	00.00 ± 0.00 ^d
2	<i>Metarhizium</i> sp. PS15G1	44.44 ± 9.62 ^b	48.15 ± 6.42 ^b	75.46 ± 33.34 ^a	56.02 ± 15.67 ^b
3	<i>Gliocladium</i> spp. PS22G2	38.89 ± 24.57 ^b	37.04 ± 27.96 ^{bc}	37.04 ± 27.96 ^{bc}	37.04 ± 27.96 ^{bc}
4	<i>Nomuraea</i> sp. VS51W5	3.33 ± 5.77 ^d	00.00 ± 11.11 ^d	12.04 ± 12.53 ^{bc}	5.13 ± 8.04 ^c
5	<i>Beaveria</i> sp. PS61W1	86.30 ± 5.48 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	95.43 ± 1.83 ^a
6	<i>Paecilomyces</i> spp. PS72G1	7.04 ± 6.12 ^d	18.52 ± 6.41 ^{cd}	26.85 ± 5.78 ^{bc}	17.47 ± 2.66 ^{cd}
7	<i>Cordyceps</i> sp. PI32W2	17.17±6.12 ^c	48.70±6.33 ^b	55.64±13.45 ^b	23.87±8.63 ^{cd}
8	<i>Ophiocordyceps</i> sp. PP91W1	22.67±7.84 ^{bc}	50.76±11.33 ^b	77.93±17.55 ^a	48.62±12.23 ^c
9	<i>Hirsutella sawsurei</i> PC131G1	21.17±7.69 ^{bc}	48.83±13.65 ^b	69.87±18.60 ^{ab}	46.62±13.31 ^c

¹ค่าเฉลี่ยที่เกิดขึ้นจากการวัด 3 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 99 ด้วยวิธี Duncan's Multiple Rang Test (DMRT)

ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการติดเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่คัดเลือกได้ สามารถชักนำให้มดคันไฟมีพฤติกรรมการกินอาหารเพิ่มขึ้น มีความถี่ในการทำความสะดวกตัวเองเพิ่มขึ้นและกระตุ้นพฤติกรรมการเป็นแมลงสังคม ให้มดช่วยกันทำความสะอาดระหว่างสมาชิกในชุดทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Okuno *et al.* (2012) รายงานว่า การติดเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในมดชนิด *Lasius japonicas* ส่งผลให้มดมีความถี่ในพฤติกรรมการทำความสะอาดตัวเองและช่วยกันทำความสะอาดระหว่างสมาชิกภายในรัง Qui *et al.* (2016) รายงานว่า การติดเชื้อราชนิดนี้ในมด *Solenopsis invicta* สามารถชักนำให้มดมีพฤติกรรมการกินอาหารเพิ่มขึ้นเพื่อนำสารอาหารไปใช้ในกระบวนการสร้างสารต้านเชื้อรา

ประสิทธิภาพการควบคุมมดคันไฟด้วยร้อยละการตายที่แท้จริง (ตารางที่ 11) เฉลี่ยพบว่าเชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 ทำให้มดคันไฟมีอัตราการตายที่แท้จริงเฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 95.43 ± 1.83 รองลงมาคือ *Metarhizium* sp. PS15G1, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1, *Hirsutella sawsurei* PC131G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Paecilomyces* sp. PS72G1 และ *Nomuraea* sp. VS51W5 ร้อยละ 56.02 ± 15.67 , 37.19 ± 25.96 , 48.62 ± 12.23 , 46.62 ± 13.31 , 23.87 ± 8.63 , 17.47 ± 2.66 และ 5.13 ± 8.04 ตามลำดับ

ผนังลำตัวของแมลงประกอบด้วย โครงสร้างไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก และถูกห่อหุ้มด้วย protein matrix กลไกการเข้าก่อโรคในแมลงชั้นเริ่มต้นของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เป็นเชื้อราปรสิตภายในจะเกิดขึ้นโดย germinating conidia มีการผลิต extracellular enzyme ได้แก่ ไคตินเนส, โปรติเอส และ ไลเพส เพื่อไชย่อยผนังชั้นนอกของแมลงทำให้เชื้อราสามารถเข้าไปและเพิ่มจำนวนภายในตัวแมลง จนทำให้แมลงตายในที่สุด (Luvia *et al.*, 2014) โดยเอนไซม์ไคตินเนสจะสลายพันธะ β -1,4 glycosidic บริเวณ β -1,4 N-acetylglucosamine ของไคตินได้เป็น N-acetylglucosamine (Subhoshmita *et al.*, 2016) เอนไซม์โปรติเอสจะสลายพันธะเปปไทด์ ของโปรตีนเป็นเปปไทด์สายสั้นลง และกรดอะมิโน (Subhoshmita *et al.*, 2016) รายงานวิจัย โดย Siebeneicher *et al.* (1992) และ Li *et al.* (2016) แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *Beauveria bassina* สามารถก่อให้เกิดโรคในมดคันไฟชนิด *Solenopsis invicta* ในขณะที่ Qiu *et al.* (2016) พบว่า เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* สามารถก่อให้เกิดโรคในมดคันไฟชนิดนี้ได้เช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้โดยนำเชื้อราที่คัดเลือกทั้ง 8 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่มที่มีระดับศักยภาพในการผลิตไคตินเนสและโปรติเอสสูงสุด (High/High) ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมมดคันไฟ *S. geminata* ที่ปริมาณ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่า เชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟชนิด *S. geminata* สูงสุด รองลงมาคือ *Metarhizium* sp. PS15G1, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1, *Hirsutella sawsurei* PC131G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Paecilomyces* sp. PS72G1 และ *Nomuraea* sp. VS51W5 ตามลำดับ

นอกจากนี้ในการวิเคราะห์หากิจกรรมการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว EPM ของเชื้อรา *Beauveria* sp. และ *Metarhizium* sp. โดยนราดร (2554) พบว่า ในวันที่ 11 เชื้อรา *Beauveria* sp. มีกิจกรรมของไคตินเนสสูงสุด 181.05 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อรา *Metarhizium* sp. มีกิจกรรมของไคตินเนสสูงสุด 68.58 มิลลิวินิต/มิลลิลิตร ในขณะที่กิจกรรมของโปรติเอสโดยเชื้อรา

Metarhizium sp. มีกิจกรรมสูงสุด 55.24 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และเชื้อรา *Beauveria* sp. มีกิจกรรมสูงสุด 57.93 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร



ภาพที่ 13 ลักษณะเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเจริญบนตัวมดคันไฟ ที่ 30 วัน ของการทดลอง

- (ก) เส้นใยเชื้อรา *Metarhizium* sp. PS15G1 (ศรชี้)
- (ข) เส้นใยเชื้อรา *Paecilomyces* sp. PS22G2 (ศรชี้)
- (ค) เส้นใยเชื้อรา *Nomurea* sp. VS51W5 (ศรชี้)
- (ง) เส้นใยเชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 (ศรชี้)
- (จ) เส้นใยเชื้อรา *Paecilomyces* sp. PS72G1 (ศรชี้)
- (ฉ) เส้นใยเชื้อรา *Hirsutella sawsurei* PC131G1
- (ช) เส้นใยเชื้อรา *Ophiocordyceps* sp. PP91W1
- (ซ) เส้นใยเชื้อรา *Cordyceps* sp. PI32W2
- (ณ) ลักษณะมดคันไฟที่ไม่ติดเชื้อ (ชุดควบคุม)

จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ สำหรับ เป็นข้อมูลสนับสนุนและแสดงถึงคุณสมบัติในการฆ่าแมลงของเชื้อราได้รับการคัดเลือก ว่ามี บทบาทของเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ช่วยส่งเสริมกลไกการฆ่าแมลงร่วมด้วยหรือไม่ อีกทั้งเพื่อประโยชน์ ในการนำเชื้อราที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลงไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูทางการเกษตร

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

1. แยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง จากตัวอย่างแมลง, ตัวอย่างดินดิน ด้วยอาหาร PDA และอาหาร VSM และการใช้เหยื่อปฏิปักษ์ สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลท
2. เชื้อราสาเหตุโรคแมลง ไอโซเลท PS15G1, PS22G2, VS51W5, PS61W1 และ PS72G1 มีศักยภาพในการผลิต โคตินีน และโปรตีนเอสบนอาหารแข็งเบื้องต้นสูงสุด ประกอบด้วย PS15G1, PS22G2, VS51W5, PS61W1, PS72G1, PI32W2, PP91W1 และ PC131G1 ศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหาร SDAY เป็นเวลา 14 วัน และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เทียบเคียงเป็น *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beaveria* sp. PS61W1, *Paecilomyces* spp. PS72G1, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1 และ *Hirsutella sawsurei* PC131G1 ตามลำดับ
3. เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium* sp. PS15G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Nomuraea* sp. VS51W5, *Beaveria* sp. PS61W1, *Paecilomyces* spp. PS72G1, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1 และ *Hirsutella sawsurei* PC131G1 จัดอยู่ในกลุ่มที่มีระดับศักยภาพในการผลิตโคตินีนและโปรตีนเอสสูงสุด (High/High) แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โคตินีน และโปรตีนเอสได้ในช่วงพีเอช 4-9 อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้ดี และแบคทีเรียได้บางส่วน
3. ประสิทธิภาพการควบคุมมดคันไฟ ชนิด *Solenopsis geminata* ที่ปริมาณ 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 วัน พบว่า เชื้อรา *Beauveria* sp. PS61W1 มีประสิทธิภาพในการควบคุมมดคันไฟชนิด *S. geminata* สูงสุด รองลงมาคือ *Metarhizium* sp. PS15G1, *Ophiocordyceps* sp. PP91W1, *Hirsutella sawsurei* PC131G1, *Gliocladium* spp. PS22G2, *Cordyceps* sp. PI32W2, *Paecilomyces* sp. PS72G1 และ *Nomuraea* sp. VS51W5 ตามลำดับ

บรรณานุกรม

- แก้วบัวสอน ราชขันติ และ สุกัญญา คลังสินศิริกุล. 2560. การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีศักยภาพเพื่อควบคุมเพลี้ยอ่อนกะหล่ำ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 35(2) : 65 - 75.
- ชฎารัตน์ ชมพูพลอย. 2556. การเก็บรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเพลี้ยไฟพริกหวานในโรงเรียนจังหวัด เชียงใหม่. วารสารเกษตร. 29 (1) : 55 - 62.
- ชมัยพร บัวมาศ, ชลิตา อุณหุฒิ และ ลักขณา บำรุงศรี. 2555. ชนิดของมดที่อาศัยร่วมกับเพลี้ยแป้งสกุล *Phenacoccus*. รายงานผลงานวิจัยประจำปี สำนักวิจัยพัฒนาอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. 2187 - 2195.
- ดอกกล้วยไม้ หอมระหัด, โสภณ อุไรชื่น, ทิพย์วดี อรรถธรรม และ เทวี มณีรัตน์. 2556. การเจริญเติบโตของเส้นใยและการสร้างโคนิเดียของเชื้อรา *Aschersonia placenta* Berkeley & Broom บนอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- ทิพย์วดี อรรถธรรม, กรรณิการ์ สีนวลมาก และ จีรภา ปัญญาศิริ. 2535. เชื้อราของแมลงและศักยภาพในการใช้ควบคุมกำจัดเพลี้ยไฟ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- ทิพวรรณ แดงสวน. 2553. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูลอสจากมูลสุกร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- ธัญมน ผิวทอง. 2557. การใช้สารทุติยภูมิจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CaSUT007 และโคโตซานชักนำความต้านทานต่อโรคเชื้อราในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- นราทร ฤชฉาย. 2554. การคัดกรองและการแยกยีนโคตินีนจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- นริศ ท้าวจันทร์ และ อนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2551. ประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ในแมลงวันผลไม้ (Diptera : Tephritidae) โดยควบคุมตัวเต็มวัยของแมลงวันผลไม้ (*Bactrocera papaya* Drew & Hancock). วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 39(3) : 21 - 25.
- เบญจวรรณ ศิริกุล และ นริศ ท้าวจันทร์. 2561. การสร้างเอนไซม์โคตินีนและโปรตีนเอสของเชื้อแอคติโนมัยซีตสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีคุณสมบัติฆ่าแมลง. วารสารแก่นเกษตร. 46(1) : 52 - 64.
- พิสุทธิ เอกอานวย. 2552. โรคและแมลงที่สำคัญ. กรุงเทพฯ : สายธุรกิจโรงพิมพ์. 591 หน้า.
- มะลิวัลย์ ปันยารชุน. 2525. โรคราแมลง. รายงานการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการควบคุมโรคแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. ห้องประชุมตึกวิจัยวัดถ้ำพิช. 2 มิถุนายน 2525. 69-90.
- รัชดา หริตกุล มาซาฮิโกะ อิซาเกะ และยอดหทัย เทพธรานนท์. 2547. สารประกอบออคาลอยด์ชนิดใหม่จากเชื้อราแมลงสายพันธุ์ *Isaria tenuipes* BCC7831. Biotec.Thailand.

- วารุณี บวรรัตน์โตภาค. 2545. การรวบรวมและเพาะเลี้ยง *Cordyceps* spp. จากอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุยจังหวัดเชียงใหม่. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ชีววิทยา). มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- สิริฉัตร ดิศรพงศ์. 2546. การคัดเลือกเชื้อรา *Hypocrella scutata* ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุภัทรชรร ทับศรี, คณิต วิชิตพันธ์ และ สุกานดา วิชิตพันธ์. 2559. การศึกษาคุณสมบัติของไคตินเนสและโปรตีนเอสที่ผลิตจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเปลือกแข็งแมลงสำหรับสปีชึมพู่ (*Phenacoccus manihoti*). The National and International Research Conference 2016. 381 – 391.
- สุภัทสา ประคองสุข. 2550. ความสามารถในการก่อโรคของ *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลทต่าง ๆ กับหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* (F.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัย เชียงใหม่. 61 หน้า.
- สมชาย ปรีชาทวิกิจ, สมนึก วงศ์ทอง และ อภิชัย ดาราย. 2556. คู่มือ ผู้ควบคุมการใช้วัตถุอันตรายเพื่อใช้รับจ้าง. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด. 1 - 16.
- แสงแข น่านานิช, วิบูลย์ จงรัตนเมธีกุล, โสภณ อุไรชื่น, วราภรณ์ บุญเกิด, กัลยาณี สุวิทวัส และ สมชาย ธนสินชยกุล. 2557. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ที่มีต่อตัวเจาะลำต้นกล้วยในสภาพห้องปฏิบัติการ. วารสารแก่นเกษตร. 42(3) : 707 - 711.
- ศิริลาภา สมานมิตร. 2544. การยับยั้งการเจริญของร่าก่อโรคต่อผลลำไยโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสและทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- หงส์ฟ้า แซ่เตี๋ย, นริศ ท้าวจันทร์ และ อนุชิต ชินาจริยวงศ์. 2557. ผลของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* PSUM02 ต่อแมลงวันพริก *Bactrocera latifrons* (Hendel) (Diptera : Tephritidae) ระยะตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัยในสภาพห้องปฏิบัติการ. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์. 1(1) : 48 - 53.
- อรุญภากร จันทร์แสง. 2553. ชีววิทยาและการควบคุมแมลงที่เป็นปัญหาสาธารณสุข. นนทบุรี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. หน้า 85 - 89.
- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Entomol. 18 : 265 – 267.
- Agrawal, T. and Kotasthane, A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* spp. isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springer Plus a Springer Open Journal. 1 : 73 - 82.
- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 2(9) : 71 - 74.
- Arora, D. 1986. Mushroom Demystified : A comprehensive guide to the fleshy fungi. 2nd ed. Berkeley: Ten Speed press.

- Asensio, L., Carbonell, T., Lopez-Jimenez J.A. and Lopez-Llorca, L.V . 2003. Entomopathogenic Fungi in Soils form Alicante Province. Spanish Journal of Agricultural research. 1(3) : 37 - 45.
- Benjamin, R. K. , Blackwell, M., Chapela, I.H., Humber, R.H., Jones, K.G., Klepzig, K.A., Lichtwardt, R.W., Malloch, D., Noda, H., Roeper, R.A., Spatapora, J.W. and Weir, A. 2000.The search for diversity of insect and other arthropod associated fungi. [Online].Available: <http://lsb380.plbio.edu/-Chapter%2015>. [16 October 2017].
- Boonphong, S., Kittakoop, P., Isaka, M., Palittapongarnpim, P., Jaturapat, A., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M. and Thebtaranonth, Y. 2001. A new antimycobacterial, 3 β -Acetoxy-15 α , 22-dihydroxyhopane, from the insect pathogenic fungus *Aschersonia tubulata*. Planta Med. 67: 279-281.
- Borriss, R. 1987. Biology of enzymes. In: (Rehm H & Reed G. eds) Biotechnology. Weinheim, Verlag chemie. 35-62.
- Boucias, G.D. and Pendland, C.J. 1988. Principle of Insect Pathology. Kluwer Academic Publishers. 274 – 276.
- Bramley, W.G. 1985. A Fungi Flora of Yorkshire. Leeds : The University of leeds.
- Churchill, A. 2001. Fungi Uses as a Resource for Therapeutic Agents. Amer. Med. Assoc. Brief . on Food Biotechnol., 4.
- Dennis, R.W.G. 1978. British Ascomycetes. Vaduz : J. Cramer.
- Draganova, S. A., Takov, D. I. and Doychev, D. D. 2010. Naturally-occurring entomopathogenic fungi on three bark beetle species (Coleoptera: Curculionidae) in Bulgaria. Pesic. Phytomed. (Belgrade). 25 : 59 - 63.
- El-Sayed, G.N., Coudron, T.A., Ignoffo, C.M. and Riba, G. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolate of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. *J. Invertebr. Pathol.* 54 : 394-403.
- Evans, H.C. 1989. Mycopathogens of Insects Epigeal and Aerial Habitats. In Wilding N., Collins.
- Espadaler, X. and Santamaria, S. 2012. Ecto and Endoparasitic Fungi on Ants from the Holarctic Region. Hindawi Publishing Corporation Psyche. 10 p.
- Farag, M. Aida, Al-Nusarie, S. and Taghreed. Production, optimization, characterization and antifungal activity of chitinase produced by *Aspergillus terreus*. *Afr. J. Biotechnol* 2014; 13(14) : 1567-1578.
- Flora, P., Alam, A., Tutik, K., Mahfudz and Shahabuddin. 2014. Prespective of entomopathogenic fungi associated with *Helopeltis* spp. (*Hemiptera* :

- Miridae*) on cacao plantation. International Journal of Current Research and Academic Review. 2(11) : 227 - 234.
- Galan-Franco, L.A., Morales-Loredo, A., Alvarez-Ojeda, G., Lopez-Arvoyo, J.I., Arevalo-Nino, K., Sandaval-Coronado, C.S. and Quintero-Zapata, I. 2011. Isolation and Characterization of Entomopathogenic fungi Obtained from Citrus-growing Areas of Mexico. Southwestern Entomologist. 36(4) : 443 - 449.
- Goettel, M.S. and Inglis, G.D. 1997. Fungi : Hyphomycetes. Manual of Techniques in Insect Pathology (ed. By L.A. Lacey), Academic Press, San Diego, USA. 213 - 249.
- Harikrishnan, H., Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Sharma, M. P., & Kotchoni, S.O. 2014. Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30 : 3149–3161.
- Hsiao, W. F. 1998. Enzymatic characterization of three entomopathogenic fungi with the API ZYM system. Journal of Entomology. 18 : 203-206.
- Humber, R. A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. Originally prepared for a workshop jointly sponsored by the American Phytopathological Society and Entomological Society of America Las Vegas, Nevada.
- Hywel-Jones, N.L. 1995a. *Hymenostillbe ventricosa* sp. nov. a pathogen of cockroaches in Thailand. *Mycological Research*. 99 : 1201-1204.
- Hywel-Jones, N.L. 1995b. *Torrubiella iriomoteana* from scale insects in Thailand and a new species *Torrubiella siamensis* with notes on their respective anamorphs. *Mycological Research* 99: 330-332.
- Hywel-Jones, N.L. 1996. *Akantomyces* on spiders in Thailand. *Mycological Research*. 100 : 1065-1070.
- Hywel-Jones, N.L. 1997a. *Hirsutella* species associated with hoppers (Homoptera) in Thailand. *Mycological Research*. 101 : 1202-1206.
- Hywel-Jones, N.L. 1997b. *Torrubiella patchii*, a new species of scale insect pathogen from Thailand. *Mycological Research* 101: 330-332.
- Hywel-Jones, N.L. 1998. *Hirsutella patchabuensis* sp. Nov. form Thailand, with a *Helicoma* synanamorph. *Mycological Research*. 102: 577-581.
- Hywel-Jones, N.L. 2001. A review of invertebrate pathogenic *Clavicipitaceae* of Thailand. pp. 34-41. in Visut, B. and K. Rungsima (eds.) BRT Research Reports. 2001. Jirawat Express Co. Bangkok.

- Hywel-Jones, N. L. 2002. A Draft manual on invertebrate-pathogenic fungi. *in* International Workshop on the Collection, Isolation and Taxonomy of Insect Fungi. Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. 26- 30 August. 2002.
- Ici Piter Kulu, Abdul Latief Abadi, Aminudin Afandhi and Nooraidawati. 2015. Morphological and Molecular Identification of *Beauveria bassiana* as Entomopathogen Agent from Control Kalimantan Peatland, Indonesia. *International Journal of Chem Tech Research*. 8(4) : 2079 - 2084.
- Isaka, M., Kittakoo, P., Kirtikara, K., Hywel-Jones, N. L. and Thebtaranonth, Y. 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc. Chem. Res.* 38 : 813-823.
- Jackson, C. W., Heale, J.B. and Hall, R.A. 1985. Traits associated with virulence to the aphid *Macrosiphoniella sanborni* in eighteen isolate of *Verticillium lecanii*. *Annals of Applied Biology*. 106 : 39-48.
- Jianzhe, Y., Xiaolan, M., Qiming, M. Yichen, Z. and Huaan, W. 1987. *Icons of Medicinal Fungi from China*. Beijing: Sci. Press.
- Jouvenaz, D.P. 1984. Histopathology of the tropical fire ant, *Solenopsis geminate*, infected with *Burenella dimorpha* (Microspora: Microsporida). *Journal of Invertebrate Pathology*. 43(3) : 324 – 332.
- Kanlayakrit, W., Bovornreungroj, P., Oka, T. and Goto, M. 2004. Production and Characterization of Protease from an Extremely Halophilic *Halobacterium* sp. PB407. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 38 : 15 – 20.
- Kalika, P.S., iDharmendra, K. and Pinaki, B. 2004. A New Technique for Single Spore Isolation of Two Predacious Fungi Forming Constricting Ring. *Mycobiology*. 32(4) : 197-198.
- Kang, S.W, E. H, K, Lee, J.S. and Kim, S.W. 1999. Overproduction of α -glucosidase by *Aspergillus niger* mutant from lignocellulosic biomass. *Biotechnol.* 21 : 647-650.
- Kim, JS. and Je, YH. 2010. A novel biopesticide production: attagel-mediated precipitation of chitinase from *Beauveria bassiana* SFB-205 supernatant for thermotolerance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 1639-1648.
- Krasnoff, S. B., Gibson, D. M., Belofsky, G. N., Gloer, K. B. and Gloer, J. B. 1996. New destruxins from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. *J. Nat. Prod.* 59 : 485-489.
- Lazgeen, H.A., Raed, A.H. and Samir, K.A. 2011. Association of Entomopathogenic and Other Opportunistic Fungi with Insects in Dormant Locations. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 4(2) : 87-92.

- Lee, T., Yun, S.H., Hodge, K. T., Humber, R.A., Krasnoff, S.B., Turgeon, G.B., Yoder, O.C. and Gibson, D.M. 2005. Polyketide synthase genes in insect and nematode-associate fungi. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 56: 181-187.
- Lorian, V. 1996. *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 3rd ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the
- Lucila, A., Alberto, M., Genoveva, A., José, I. Katiushka Arévalo-Niño, Carlos Sandoval-Coronado and Isela Quintero-Zapata. 2011. Isolation and Characterization of Entomopathogenic Fungi Obtained from Citrus-Growing Areas of Mexico. *Southwestern Entomologist*. 36(4) : 443-449.
- Lydia, C.H., Sunil, V., Renuka, K., Sandhya, V. and Bentur, J.S. 2017. Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents and mode of action agent's insect pests. *Agriculture Update*. 12 : 277 - 283.
- Majid, A.H.A., Zahran, Z., Rahim, A.H.A., Ismail, N.A., Rahman, W.A.R., Zubairi, K.S.M., Dieng, H. and Satho, T. 2015. Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera : Cimicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 5(9) : 707 – 713.
- Maria, S., Mariso, V., Macarena, G., Ricardo, C. and Pia, O. 2016. Molecular, Morphological and pathogenic characterization of six strain of *Metarhizium* spp. (Deuteromycota : Hyphomycetes) for control of *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera : Curculionidae) *Chilean journal of agricultural research*. 76(1) : 77 - 83.
- Methanee, H., Anchanee, K., Mathna, S. and Vipa. 2016. Isolation and characterization of chitinase from soil fungi *Paecilomyces* sp. *Agriculture and Natural Resources*. 50 : 232 - 242.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31 : 426-428.
- Mishra, S, Kumar, P. and Malik, A. 2013. Effect of process parameters on the enzyme activity of a novel *Beauveria bassiana* isolate. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 2(9): 49-56.

- Murthy, N. and Bleakley. 2012. Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase Producing Microorganisms. The internet Journal of Microbiology. 10 (2) : 233 - 245.
- Mustafa, U. and Kaur, G. 2010. Studies on extracellular enzyme production in *Beauveria bassiana* isolates. Int. J. Biotechnol. Biochem. 6 : 701-713.
- Nascimento, C.A. and Martin, M.L.L. 2004. Production and properties of extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazilian J. Microbiology. 35: 91-96.
- Nenghui, W. and Zhiyi, Z. 1992. Relationship between photosensitizing activities and chemical structure of hypocrellin A and B. J. Photochem. Photobiol. Biol. 14 : 207-217.
- Okuno, M., Suji, K.T., Sato, H. and Fujisaki, K.. 2012. Plasticity of grooming behavior against Entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae* in the ant *Lasius japonicas*. J. Ethol. 30 : 23 - 27.
- Pagare, R.S., Ramdasi, A.M., Khandelwal, S.R., Lokhande, M.O. and Aglave, B.A. 2009. Production and enzyme activity of an extracellular protease from *Aspergillus niger* and *Bacillus subtilis*. International Journal of Biotechnology & Biochemistry. 5(3) : 3-8.
- Parker, E.J., 2000. Signalling in plant disease resistance. in: Dickinson, M. and Beynon, J. (ed). Molecular plant pathology. Sheffield Academic Press, Sheffield, U.K. 198-217.
- Pedrini, N. 2018. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. Fungal Biology. 122 : 538-545.
- Qiu, H.L., Lu, L.H., Zalucki, Y.R. and He. M.P. 2016. *Metarrhizium anisopliae* infection alters feeding and trophallactic behavior in the ant *Solenopsis invicta*. J. Invertebr Pathol. 138 : 24 - 29.
- Samson, R.A., Evans H.C. and Latge J.P. 1988. Atlas of Entomopathogenic Fungi. Heidelber: Springer-Verlag.
- Schumacher, T. 1982. Ascomycetes from Northern Thailand. Nordic Journal of botany, 2 :257-263.
- Shimazu, M. and Sato, H. 1996. Media for selective isolation of an entomogenous fungus, *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Appl Entomol Zool. 31 : 291-298.
- Souza, R.F., Coelho, R.R.R., Macrae, A., Soares, R.M.A., Nery, D.C.M., Semêdo, L.T.A.S., Alviano, C.S. & Gomes, R.C. 2008. *Streptomyces lunalinharesii* sp. nov., a

- chitinolytic streptomycete isolated from cerrado soil in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58 : 2774-2778.
- Sonawane, A, Mahajan, M. and Renake, S. 2015. Antifungal Activity of a Fungal Isolates against Pomegranate Wilt Pathogen *Fusarium*. *Int. J.Curr. Microbiol. App. Sci.* 2: 48-57.
- Sookkheo, B. Sinchaikul, S. and Phutrakul, S. 2000. Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothersophilus* TLS33, *Prot. Exp. Pur.* 20 : 142-151.
- St.Leger, R.J. Staples, R. C. and Roberts, D.W. 1993. Entomopathogenic isolate of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. *Journal of Invertebrate Pathology.* 61 : 81-84.
- Subhoshmita, M., Sibashish, B., Andras, K. and Gyula, V. 2016. Journey of enzymes in entomopathogenic fungi. *Pacific Science Review A : Natural Science and Engineering.* 18 : 85 - 99.
- Sundararajan, R, Gellon, L., Zunder, R.M. and Freudenreich, C.H. 2010. Double-strand break repair pathways protect against CAG/CTG repeat expansions, contractions and repeat-mediated chromosomal fragility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 184(1) : 65-77.
- Tae-Young, S., Jae-Bang, C., Sung-Min, B., Hyun-Na, K. and Soo-Dong, W. 2010. Study on Selective Media for Isolation of Entomopathogenic Fungi. *International Journal of Industrial Entomology.* 20 : 1 - 12.
- Toledo-Hernandez, R.A., Ruiz-Toledo, J., Toledo, J. and Sanchez, D. 2016. Effect of Three Entomopathogenic Fungi on Three Species of Stingless Bees (Hymenoptera : Apidae) Under Laboratory Conditions. *J. Econ. Entomol.* 4 : 23-34.
- Tuininga, A.R., Miller, J.L., Morath, S.U., Daniels, T.J., Falco, R.C., Marchese, M., Sahabi, S., Rosa, D. and Kirby, C. 2010. Isolation of Entomopathogenic fungi from Soils and *Ixodes scapularis* (Acari : Ixodidea) Ticks : Prevalence and Methods. *J. Med Entomol.* 46 (3) : 557 - 565.
- Urquiza, A.O. and Keyhani, N.O. 2013. Action on the Surface : Entomopathogenic Fungi versus the Insect Cuticle. *Insects.* 4 : 357 – 374.
- Veen KH, Ferron P. 1996. A selective medium for isolation of *Beauveria tenella* and *Metarhizium anisopliae*. *J Invertebr Pathol.* 8 : 268-269.

- Vijayaraghavan, P. and Vincent, S. G. P. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresol green dye. *J. Biochem Tech.* 4(3) : 628 – 630.
- Zimmermann, G. 1986. The *Galleria* bait method for detection of entomopathogenic fungi in soil. *J. Appl. Entomol.* 102 : 213-215.

ภาคผนวก

วิธีเตรียมอาหารและ สารละลาย

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 อาหาร อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร PDA (Potato dextrose agar) (นราทร, 2554)

มันฝรั่งปอกเปลือกแล้ว	200	กรัม
Dextrose (D-glucose)	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ปอกเปลือกมันฝรั่ง และล้างให้ได้ 200 กรัม แล้วหั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ คล้ายลูกเต๋า ประมาณ 1 - 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ต้มกับน้ำประมาณ 300 มิลลิลิตร จนสุก (ไม่ถึงกับเละ) กรองเอาเฉพาะส่วนน้ำด้วยผ้าขาวบาง เติมผง Dextrose ลงไปละลายน้ำมันฝรั่ง ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตรคนให้เข้ากัน จากนั้นต้ม และเติมผงวุ้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร CCA (Colloidal chitin agar) (Agrawal and Kotasthane, 2012)

(NH ₄) ₂ SO ₄	3	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3	กรัม
KH ₂ PO ₄	2	กรัม
Citric acid	1	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
Tween-80	200	ไมโครลิตร
Colloidal chitin	4.5	กรัม
Bromocresol purple	0.15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

นำสารข้างต้นละลายในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 4.7 นำไปต้ม เติมผงวุ้น คนให้ผงวุ้นละลาย จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Vijaayaraghavan and Vincent, 2013)

Casein peptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
Skim milk	10	กรัม
Bromocresol green	0.015	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ผสม Casein peptone, Dextrose, Skim milk และ Bromocresol green ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 8.0 จากนั้นนำไปต้ม เติมผงวุ้นและคนให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SDAY (Sabouraud Dextrose Agar plus Yeast) (Toledo *et al.*, 2013)

Casein peptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
Yeast Extract	10	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ผสม Casein peptone, Dextrose และ Yeast extract ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 4.0 จากนั้นนำไปต้ม เติมผงวุ้นและคนให้ละลาย นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร VSM (Veens semiselective medium) (Veen and Ferron, 1966)

Casein peptone	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
Chloramphenicol	0.1	กรัม
Streptomycin	0.05	กรัม
Dodine	0.04	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

ผสม Casein peptone, Dextrose, Chloramphenicol, Streptomycin และ Dodine ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอช เท่ากับ 4.0 จากนั้นนำไปต้ม เติมผงวุ้นและคนให้ละลาย นำไปฆ่า เชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 การเตรียม Colloidal Chitin Agar

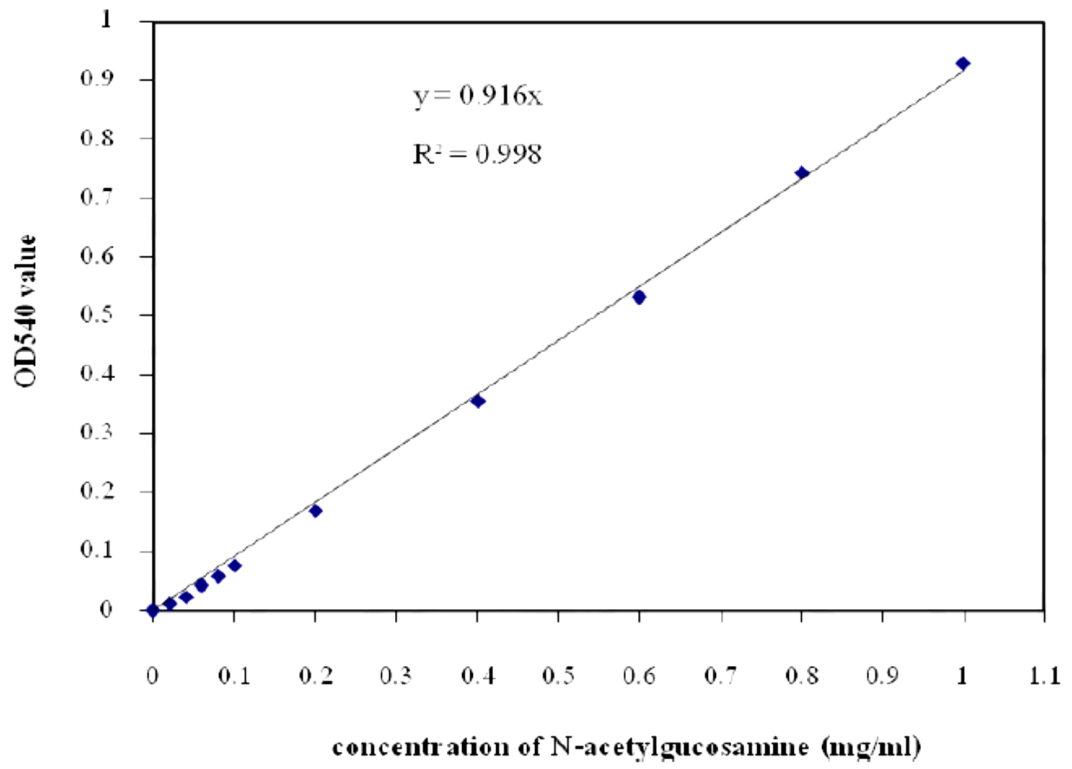
colloidal chitin	150	กรัม
NaCl	0.250	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.375	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.125	กรัม
(NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇	0.625	กรัม
CaCO ₃	0.375	กรัม
glycerol 87%	6.5	มิลลิลิตร
ผงวุ้น	15	กรัม
dH ₂ O added	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งผงไคตินมา 10 กรัม ละลายในกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ค่อย ๆ คนให้ผงไคตินชุ่มไปด้วยกรดในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร) แล้วปิดด้วยกระดาษฟลอยด์ และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นข้ามคืนที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างกรดออกจากไคตินด้วยน้ำประปา และค่อย ๆ คนจนเกิดลักษณะแขวนลอย (คล้ายวุ้นสีขาวขุ่น) แล้วกรองด้วยผ้าขาวบางประมาณ 2 ชั้น ทา เช่นนี้หลาย ๆ รอบจน pH ของน้ำ ที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบาง เท่ากับ 7 และนำ colloidal chitin ที่ได้จากการกรองไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงครึ่ง และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

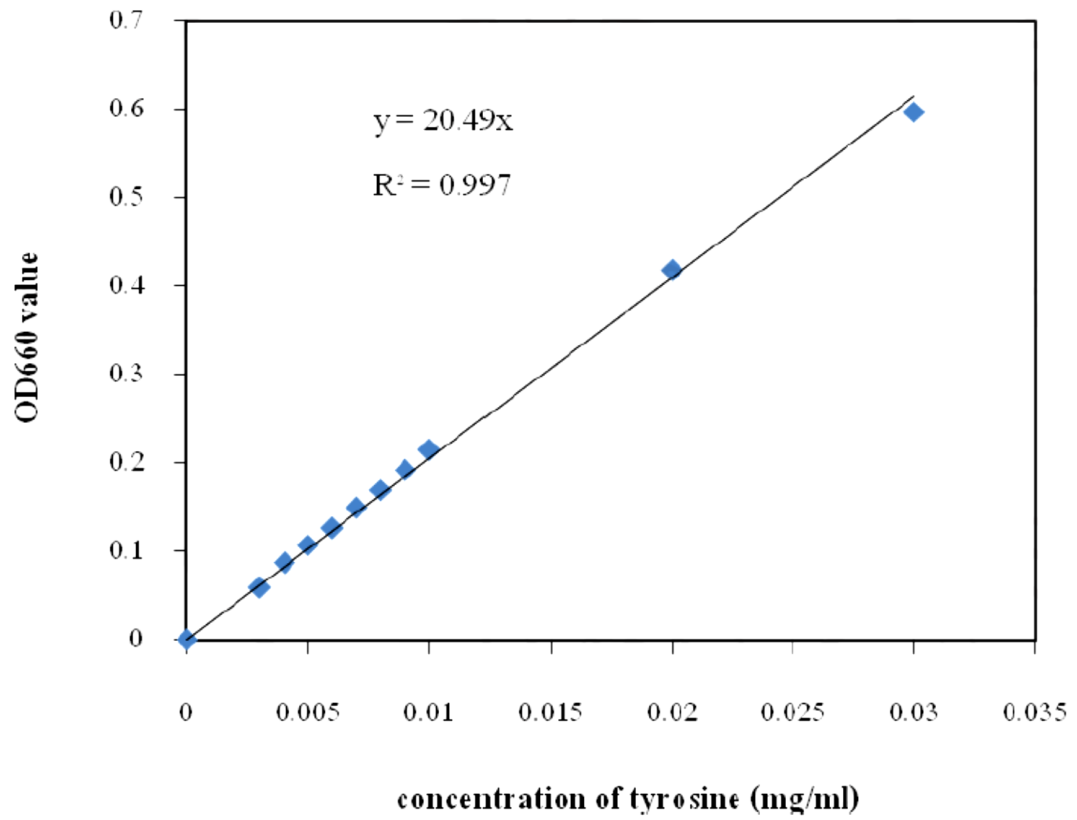
1.6 Enzyme Producing Medium (EPM)

colloidal chitin	50	กรัม
NaCl	0.250	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.375	กรัม
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.125	กรัม
(NH ₄) ₂ C ₆ H ₆ O ₇	0.625	กรัม
CaCO ₃	0.375	กรัม
glycerol 87%	6.5	มิลลิลิตร
dH ₂ O added	1,000	มิลลิลิตร

กราฟมาตรฐานของสารละลาย N-acetylglucosamine (NAG)



กราฟมาตรฐานของสารละลาย Tyrosine



รูปวิธานในการจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (Humber, 1998)

- | | | | |
|---|---------------------|---|---------------------|
| 1. Spores and hyphae or other fungal structures visible on exterior of host or host body is obscured by fungus; few or no spores form inside host cadaver | 2 | 6. Conidiogenous cells clustered on more or less swollen vesicle on short to long, conidiophores projecting laterally from synnemata and/or the hyphal mat covering the host; conidia pale to yellow or violet in mass; affecting spiders | <i>Gibellula</i> |
| 1a. Fungal growth and sporulation wholly (or nearly wholly) confined to interior of host body | 30 | 6a. Conidiogenous cells borne at apices of broadly branched, densely intertwined conidiophores that form a compact hymenium; conidia borne in parallel chains and usually green in mass | <i>Metarhizium</i> |
| 2. Elongated macroscopic structures (synnemata or club-like to columnar stromata) project from host | 3 | 7. Conidiogenous cell with swollen base and elongated, narrow to spine-like neck; conidia formed singly (usually with a distinct slime coating) or small groups in a slime droplet | <i>Hirsutella</i> |
| 2a. Fungal growth may cover all or part of the host and may spread onto the substrate but large, projecting structures are absent | 10 | 7a. Conidiogenous cells producing several to many conidia, each formed singly on separate denticles | 8 |
| 3. Conidia form on synnemata and/or on mycelium on the host body | 4 | 8. Conidiogenous cell with an extended, denticulate apex (growing apex repeatedly forms a conidium and regrows [rebranches] just below the new conidium) | <i>Beauveria</i> |
| 3a. Flask-like to laterally flattened fruiting structures (perithecia) present whether on or submersed in an erect, dense to fleshy, club-like to columnar stroma or on body of host; if mature, containing elongated asci with thickened apical caps | 9 | 8a. Conidiogenous cell short and compact, cylindrical to broadly clavate, with apex studded by many denticles, each of which bears a single conidium | <i>Hymenostilbe</i> |
| 4. Conidia formed in short to long chains | 5 | 9. Erect stroma bears perithecia superficial to partially or fully immersed (with only small circular opening raised above stromatic surface); perithecia scattered or aggregated into more or less differentiated, apical or lateral fertile part; asci (if present) with thickened apical cap perforated by narrow canal and filiform ascospores (that usually dissociate into one-celled part spores); conidia, if simultaneously present, being formed on host body, on lower portion of stroma, or on separate synnemata | <i>Cordyceps</i> |
| 4a. Conidia produced singly on many separate denticles on each conidiogenous cell or, if in some sort of slime, singly (slime sometimes not evident) or in small groups in a slime droplet | 7 | | |
| 5. Conidiogenous cells flask-like, with swollen base and a distinct neck, borne singly or in loose clusters; chains of conidia often long and divergent (when borne on clusters of conidiogenous cells) | <i>Paecilomyces</i> | | |
| 5a. Conidiogenous cells short, with rounded to broadly conical apices (not having a distinctly narrowed and extended neck) | 6 | | |

- 9a. Perithecia occur *only* on or partially immersed in a cottony to woolly hyphal layer covering host *Torrubiella*
10. Fungus covering host is a stroma (fleshy to hard mass of intertwined hyphae); sporulation occurs in cavities below the stromatic surface 11
- 10a. Host partially to completely covered by wispy, cottony, woolly, or felt-like growth or by a dark-coloured, extensive patch having columns and chambers below its surface but not forming a dense stroma 12
11. Spores are fusoid, one-celled conidia discharged in a slime mass from fertile chambers immersed in the stroma but not set off by a differentiated wall *Aschersonia*
- 11a. Globose to flask-like perithecia delimited by a distinct wall are immersed in stroma and contain elongated asci with thickened apices or, at maturity, a (non-slimy) mass of globose, ovoid or rod-like spores formed by dissociation of multi-septate ascospores; *Aschersonia* conidial state often present on same stroma *Hypocrella*
12. Fungus a dark brown to black, sometimes extensive patch on woody plant parts; upper surface dense to felt-like, with elongated or clavate thick-walled cells (teleutospores) remaining attached; open chambers and vertical fungal columns underlie the more or less solid upper surface and shelter living scale insects, some of which contain prominently coiled haustorial hyphae *Septobasidium* (see Couch, 1938; not treated here)
- 12a. Fungal hyphae emerging from or covering host are colourless to light coloured, wispy to cottony, woolly, felt-like or waxy-looking mat 13
13. Flask-like to laterally compressed perithecia present, superficial to partially immersed in fungus covering the host; asci elongate, with thickened apex; when mature, filiform multiseptate ascospores tend to dissociate into 1-celled part-spores; conidial state(s) may occur simultaneously on host body or synnemata; especially on spiders or homopterans *Torrubiella*
- 13a. Spores form on external surfaces of the fungus; no sexual structures (perithecia) are present 14
14. Conidia form on cells with elongated denticulate necks bearing multiple conidia on awl- to flask-shaped or short blocky conidiogenous cells; conidia form singly or successively in dry chains or slime drops (Hyphomycetes) 15
- 14a. Conidia forcibly discharged and may rapidly form forcibly or passively dispersed secondary conidia (Entomophthorales) 22
15. Conidiogenous cell with an extended, denticulate apex (growing apex repeatedly forms a conidium and regrows (rebranches) just below the new conidium) *Beauveria*
- 15a. Conidiogenous cells are awl- to flask-shaped, with or without an obvious neck; conidia borne singly, in chains, or in slime drops 16
16. Conidia single or in chains on apices of conidiogenous cells 17
- 16a. Conidia aggregate in slime drops at apices of conidiogenous cells 20
17. Conidia borne singly on conidiogenous cell with swollen base and one or more narrow, elongated necks; conidia globose or, if not, usually having an obvious slime coat; especially on mites *Hirsutiella*
- 17a. Conidia borne in chains, not covered by any obvious slime 18

18. Conidiophores much branched in a candelabrum-like manner but very densely intertwined, and forming nearly wax-like fertile areas; conidiogenous cells short, blocky, without apical necks; conidial chains long and, usually, laterally adherent in prismatic columns or continuous plates *Metarhizium*
- 18a. Conidiophores individually distinct and unbranched or with a main axis and short side branches bearing single or clustered conidiogenous cells 19
19. Conidiogenous cells flask-like, with swollen base and a distinct neck, borne singly or in loose clusters; chains of conidia often long and divergent (when borne on clusters of conidiogenous cells) *Paecilomyces*
- 19a. Conidiogenous cells short and blocky with little obvious neck, borne in small clusters on short branches grouped in dense whorls on (otherwise unbranched) conidiophores; conidial chains short; especially on Noctuidae (Lepidoptera) *Nomuraea*
20. Conidia aggregating in slime droplets with morphology either (1) macroconidia, elongated, gently to strongly curved with somewhat pointed ends, one or more transverse septa and usually a short (basal) bulge or bend ('foot') and/or (2) microconidia aseptate, with variable morphology; conidiogenous cells often distinctly thicker than vegetative hyphae; hyphae often with terminal or intercalary chlamydospores (thick-walled spore-like swellings of vegetative cells; surface smooth or decorated) *Fusarium*
- 20a. Conidiogenous cells little thicker than hyphae, occurring singly or grouped into regular clusters and/or whorls; conidia one-celled; mycelium highly uniform in diameter 21
21. Conidiogenous cells usually tapering uniformly from base to truncate apex, usually without a swollen base or distinct neck; occurring singly, in pairs or whorled along hyphae or in terminal clusters *Verticillium*
- 21a. Conidiogenous cells with a swollen to flask-like base and a (usually short) neck often bent out of axis of the conidiogenous cell; conidiogenous cells borne singly, clustered, or in whorls aggregating in loose 'heads' on erect apically branching conidiophores poorly differentiated from vegetative hyphae *Tolyposcladium*
22. In aceto-orcein, primary conidia obviously uninucleate and sometimes seen to be bitunicate (with outer wall layer lifting partially off of spores in liquid mounts) 23
- 22a. In aceto-orcein, primary conidia obviously multinucleate or nuclei not readily seen 26
23. Conidia long clavate to obviously elongated (length/width ratio usually ≥ 2.5), papilla broadly conical, often with a slight flaring or ridge at junction with basal papilla 24
- 23a. Conidia ovoid to clavate; papilla rounded and frequently laterally displaced from axis of conidium ... 25
24. Conidia readily forming elongate secondary capilliconidia attached laterally to and passively dispersed from capillary conidiophores; rhizoids and cystidia not thicker than hyphae; rhizoids numerous, often fasciculate or in columns *Zoophthora*

- 24a. Conidia never forming secondary capilliconidia; conidia often strongly curved and/or markedly elongated; rhizoids and/or cystidia 2–3× thicker than hyphae; especially on dipterans (or other insects) in wet habitats (on wetted rocks, in or near streams, etc.) *Erynia*
25. Conidia never producing secondary capilliconidia; rhizoids 2–3× thicker than hyphae, terminating with prominent discoid holdfast; cystidia at base 2–3× thicker than hyphae, tapering towards apex *Pandora*
- 25a. Conidia never producing secondary capilliconidia; rhizoids not thicker than hyphae, numerous, solitary to fasciculate, with weak terminal branching system or sucker-like holdfasts; cystidia as thick as hyphae, often only weakly tapered *Furia*
26. In aceto-orcein, nuclei staining readily, with obviously granular contents 27
- 26a. In aceto-orcein, nuclei not readily visible or not staining 29
27. Conidia with apical point and broad flat papilla; discharged by cannon-like expulsion of fluid from conidiogenous cell forming halo-like zone around conidia after discharge *Entomophthora*
- 27a. Conidia without apical projection and discharged by evulsion of a rounded (not flat) papilla 28
28. Conidia pyriform with papilla merging smoothly into spore outline; formed by direct expansion of tip of conidiogenous cell (with no narrower connection between conidiogenous cell and conidium); rhizoids never formed *Entomophaga*
- 28a. Conidia globose with papilla emerging abruptly from spore outline; formed on conidiogenous cells with a narrowed neck below the conidium; if present, rhizoids 2–3× thicker than hyphae, with discoid terminal holdfast *Batkoa*
29. Conidia globose to pyriform, papilla rounded, with many (inconspicuous) nuclei; secondary conidia: (a) single, forcibly discharged and resembling primaries; (b) single, passively dispersed capilliconidia formed in axis of capillary conidiophore or (c) numerous on a primary conidium, small, forcibly discharged (microconidia) *Conidiobolus*
- 29a. Conidia globose to pyriform, papilla flattened, usually 4–nucleate; secondary conidia (a) forcibly discharged, resembling primary or (b) almond- to drop-shaped, laterally attached to a capillary conidiophore with a sharp subapical bend; especially on aphids or mites *Neozygites*
30. Affecting larval bees (Apidae and Megachilidae), causing chalkbrood; fungus in cadavers is white or black, organized as large spheres (spore cysts) containing smaller-walled spherical groups (asci) of (asco)spores *Ascospheera*
- 30a. Affecting insects other than bees; spores formed individually rather than in spherical groups of inside larger spheres 31
31. Spores formed inside a fungal cell, in a more or less loosely fitted outer (sporangial) wall 32
- 31a. Spores forming directly at apices of hyphae or hyphal bodies by budding or intercalary (thick-walled but not confined loosely inside remnant of another cell) 33
- Spores (oospores) thick-walled, smooth walled, colourless; formed inside irregularly shaped cell (oogonia); some cells in thick mycelium producing narrow tube through cuticle with evanescent terminal vesicle from which motile, biflagellate zoospores are released; affecting mosquitoes *Lagenidium*

- 32a. Spores (resistant sporangia) globose or subglobose, golden-brown with hexagonally reticulated surface; formed inside close fitting thin (but evanescent) outer wall *Myiophagus*
33. Affecting gregarious cicadas (Homoptera: Cicadidae); terminal segments of abdominal exoskeleton drop off to expose loose to compact, colourless to coloured fungal mass; spores thin-walled or, if thick-walled, with strongly sculptured surface *Massospora*
- 33a. Not affecting cicadas, with spores occurring throughout body (not confined to terminal abdominal segments) 34
34. Spores (zygospores or azygospores) with outer surfaces smooth or with surface irregularly roughened, warty, or spinose; colourless to pale or deeply coloured (various colours possible), brown, grey, or black 35
- 34a. Spores (thick-walled resistant sporangia) with surface regularly decorated with ridges, pits, punctations, striations, reticulations; yellow-brown to golden-brown 37
35. Resting spores grey, brown or black (outer wall is coloured; inner wall is hyaline), with smooth or rough surface; binucleate but nuclei often not staining strongly in aceto-orcein if spore wall is cracked; infected hosts from which conidia were discharged and then produced almond- to drop-shaped secondary capilliconidia should be evident in the infected population; affecting aphids, scales, or mites *Neozygites*
- 35a. Resting spores colourless, coloured, or dark, surfaces smooth or rough; infected host population may or may not include cadavers producing conidia but, if present, conidia not as above 36
36. When spores are gently crushed in aceto-orcein (to crack walls and partially extrude cytoplasm), nuclei are poorly stained (or unstained) and, if seen, do not have obviously granular contents (Ancylistaceae) *Conidiobolus*
- 36a. When spores are gently crushed in aceto-orcein (to crack walls and partially extrude cytoplasm), nuclei stain well and have obviously granular contents *Entomophthoraceae* (genus undetermined)
37. Sporangia ellipsoid (not globose); with a preformed dehiscence slit (may not be obvious); wall very thick, golden-brown, pitted to elaborately sculptured; affecting larvae/pupae of mosquitoes (or midges) *Coelomomyces*
- 37a. Sporangia globose or subglobose, with no visible dehiscence slit; wall relatively thin; surface with low (hexagonally) reticulated ridges; affecting terrestrial insects *Myiophagus*



เอกสารรับรองให้ดำเนินการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยทางชีวภาพ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ID# IBC 05-01-61

ชื่อข้อเสนอการวิจัย

(ภาษาไทย) ...การแยกและคัดเลือกเชื้อราก่อโรคในแมลงเพื่อประเมินการสร้างเอนไซม์ไคตินเนส โปรตีเนส และฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

(ภาษาอังกฤษ) ...Isolation and Screening of Entomopathogenic Fungi to Evaluation of Chitinase and Proteinase Producing and Antimicrobial Activity

ชื่อ-สกุล ผู้วิจัยหลัก ...นางจรินทร์ พุดงาม

หน่วยงานที่สังกัด (คณะ/สถาบัน) ...คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(มหาวิทยาลัย) ...มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

(กระทรวง) ...ศึกษาธิการ

ข้อเสนอการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการควบคุมความปลอดภัยทางชีวภาพ (IBC) เห็นว่า มีความสอดคล้องกับแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพ สมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการวิจัยตามข้อเสนอการวิจัยนี้ได้

ประเภทการรับรอง ...ประเภทที่ 1

วันที่รับรอง ... 11 เม.ย 2561

วันที่หมดอายุ ... 30 ก.ย 2561

ลงนาม

(รองศาสตราจารย์วรุฒิ . เกิดปรากฏ)

ประธานคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วัน/เดือน/ปี ... 11 เม.ย 2561

ลงนาม

(ดร.จเร สุวรรณชาติ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี

วัน/เดือน/ปี ... 12 เม.ย 2561

*หมายเหตุ ID# ออกโดย คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย



เอกสารรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ID#IAC.05-01-61.....

ชื่อโครงการวิจัย

(ภาษาไทย) ...การแยกและคัดเลือกเชื้อราก่อโรคในแมลงเพื่อประเมินการสร้างเอนไซม์ไคตินเอส โปรตีนเอสและ
ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์.....

(ภาษาอังกฤษ) ..Isolation and Screening of Entomopathogenic Fungi to Evaluation of
Chitinase and Proteinase Producing and Antimicrobial Activity.....

ชื่อ-สกุล ผู้เสนอโครงการวิจัยนางจรินทร์ พุดงาม.....

เลขที่คำขอรับใบอนุญาตใช้สัตว์ว่า.....U1-06484-2560 (ผู้ร่วมวิจัย).....

หน่วยงานที่สังกัด (คณะ/สถาบัน)คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.....

(มหาวิทยาลัย)มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.....

(กระทรวง)ศึกษาธิการ.....

สถานที่ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์

.....ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.....

โครงการที่ขอใช้สัตว์ (Animal Protocol) นี้ ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการ
ต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถานที่ดำเนินการ (คกส.) แล้ว เห็นว่ามีความสอดคล้องกับจรรยาบรรณการใช้
สัตว์เพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ จึงเห็นสมควรให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์ ตามโครงการที่ขอใช้
สัตว์นี้ได้

ลงนาม*W JIM*.....

(ดร.จเร สุวรรณชาติ)

ประธานคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์ว่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

วัน/เดือน/ปี 29 พค 2561.....

ลงนาม*W JIM*.....

(ดร.จเร สุวรรณชาติ)

รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและบริการวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี

วัน/เดือน/ปี 29 พค 2561.....