บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว

3.1.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ Maejo, Chonburi, Suphan, Khon Kaen, BCC4849, BCC4951, BCC1707, BCC4810, BCC2074, BCC1858 (ตารางที่ 2) มาเลี้ยงบนอาหาร PDA จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือจุลินทรีย์อื่นๆ นาน 7 วัน จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักวัย 2 ใส่ใน plate เชื้อราเขียว ประมาณ 30 นาที แล้วเขี่ยหนอนใส่ใน plate ที่มีใบคะน้า ซึ่งแต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากนั้นตรวจนับผลการตาย

ตารางที่ 2 แหล่งที่มาของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ

ลำดับ	รหัส	สายพันธุ์	ตัวอย่างที่เก็บ	สถานที่
1	BCC1707	*M. flavoviride*	Homoptera-nymph	ศูนย์พันธุวิศวกรรม
2	BCC1858	*M. anisopliae*	Coleoptera-Lampyridae	และเทคโนโลยี
3	BCC2074	*M. anisopliae*	Lepidoptera-silkworm	ชีวภาพแห่งชาติ
4	BCC4810	*M. anisopliae*	-	,,
5	BCC4849	*M. anisopliae*	-	,,
6	BCC4951	*M. anisopliae* var. *anisopliae*	-	,,
7	Maejo	*M. anisopliae*	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัย
8	Chonburi	*M. anisopliae*	ตัวอย่างดิน	แห่งชาติ
9	Suphan	*M. anisopliae*	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ
10	Khon Kaen	*M. anisopliae*	ตัวอย่างดิน	สภาวิจัยแห่งชาติ
				สภาวิจัยแห่งชาติ

3.1.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

นำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาเปรียบเทียบผลการเจริญเติบโต ในอาหารชนิดต่าง ๆ จำนวน 8 ชนิด คือ Sabouraud dextrose agar (SDA), Sabouraud dextrose agar with yeast extract (SDAY), Sabouraud maltose agar with yeast extract (SMAY), Potato dextrose agar (PDA), Malt agar (MA),

Mungbean agar (MU), Fungus agar (FA), Latch's medium (L) โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านนศูนย์กลาง 1 ซม. ตัดเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร PDA อายุ 7 วัน นำไปเลี้ยงบนอาหารชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น 8 ชนิด ในจานแก้วเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28± 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ หลังจากบ่มเชื้อได้ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านนศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 10x8x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.1.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA , SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลต โดยวัดเส้นผ่านนศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ แต่ละไอโซเลต ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.1.4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

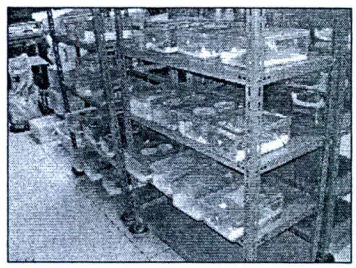
นำเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ซึ่งเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PDA , SDAY และ MU จากนั้นบ่มเชื้อไว้ ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28± 2 องศาเซลเซียส) และ 1) ที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืดอีก 12 ชั่วโมง 2) ที่มีแสงตลอด 24 ชั่วโมง และ 3) ที่มืด 24 ชั่วโมง แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา โดยวัดขนาดของโคโลนีของเชื้อราเขียว ในแต่ละ plate ที่ 7, 11 และ 15 วัน (สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows

3.2 การเพาะเลี้ยงหนอนกระทู้ผัก

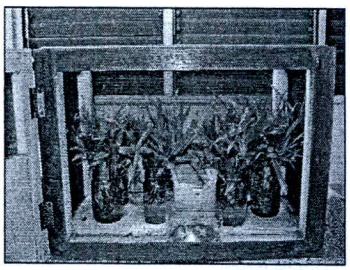
เก็บใบคะน้าที่มีกลุ่มไข่และตัวหนอนขนาดต่างๆ จากแปลงปลูกผักของเกษตรกร ต.สันผีเสื้อ จังหวัดเชียงใหม่ ใส่กล่องพลาสติกขนาด 24.5 x 17 x 9 เซนติเมตร โดยสามารถสังเกตได้จากใบพืชจะมีลักษณะรอยทำลายและโปร่งแสง เมื่อพลิกดูใต้ใบจะพบกลุ่มหนอนรวมอยู่กันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 1) จากนั้นนำหนอนกระทู้ผักที่เก็บมาจากแปลงมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ที่

อุณหภูมิต่ำสุดเฉลี่ย 26.21 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 31.71 องศาเซลเซียส โดยนำหนอนกระทู้ผักเปลี่ยนไปใส่กล่องพลาสติกใหม่ขนาดเดิม พร้อมใบคะน้า (ภาพที่ 2) จนกระทั่งเข้าดักแด้ จึงแยกไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกขนาด 8 x 10 x 8 เซนติเมตร เปิดฝา แล้วนำไปใส่ในกรงที่มีหญ้ามาเลเซีย (ภาพที่ 3) เมื่อดักแด้ออกเป็นตัวเต็มวัย (ภาพที่ 4) จึง ให้อาหารผีเสื้อ ซึ่งเป็นน้ำผึ้งที่มีความเข้มข้น 10 % โดยผีเสื้อผสมพันธุ์และวางไข่บนหญ้า มาเลเซีย (ภาพที่ 5) จึงตัดใบหญ้ามาเลเซียไปใส่กล่องพลาสติกขนาด 17 x 24 x 11 เซนติเมตร แล้วให้อาหารด้วยยอดคะน้า รอจนกระทั่งหนอนที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เจริญ เป็นหนอนวัยที่ 1, 2 และ 3 (ภาพที่ 6) จึงนำหนอนไปทดสอบกับเชื้อราเขียว

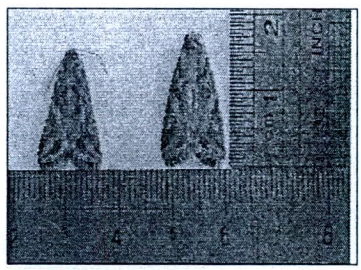
ภาพที่ 1 กลุ่มหนอนกระทู้ผักบนใบคะน้า



ภาพที่ 2 การเลี้ยงหนอนกระทู้ผักในห้องปฏิบัติการ

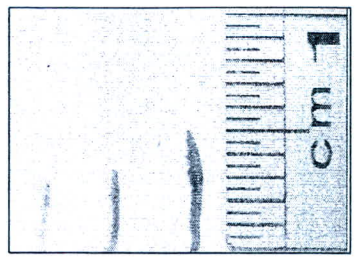


ภาพที่ 3 กล่องดักแด้ เปิดฝาไว้ในกรงที่มีหญ้ามาเลเซีย เพื่อเป็นที่วางไข่ ในระยะที่เจริญเป็นผีเสื้อ (ซ้าย)



ภาพที่ 4 ผีเสื้อหนอนกระทู้ผัก ตัวผู้ ตัวเมีย (ขวา)

ภาพที่ 5 กลุ่มไข่หนอนกระทู้ผักบนหญ้าตาม
มาเลเซีย



ภาพที่ 6 หนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ลำดับ

3.3 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

นำเชื้อราเขียวจำนวน 3 ไอโซเลต ที่ได้จากการทดลองที่1 มาเลี้ยงบนอาหาร MU จนเจริญเต็มที่ สร้างสปอร์ แล้วไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อรา หรือจุลินทรีย์อื่น ๆ มาทดสอบ หาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการควบคุมหนอนกระทู้ผัก

เตรียม spore suspension ของเชื้อราเขียว 3 ไอโซเลต ที่สร้างสปอร์บนอาหาร แล้วขูดออกจากอาหารมาผสม กับน้ำกลั่น กรองด้วยผ้าขาวบางที่นำมาทบกัน 2 ชั้น (ทำให้ผ้าเปียกก่อนนำมากรอง) การใช้ haemacytometer ในการนับสปอร์ นั้นทำได้โดยการปิด cover slip ให้คลุม scale ทั้งสอง จากนั้นใช้ loop จุ่มลงใน spore suspensions ที่เขย่าจนเข้ากันดีแล้วและย้าย loop ไปแตะตรงบริเวณขอบสไลด์ทั้ง สองด้าน spore suspensions จะซึมเข้าไปจนเต็มบริเวณ scale ทั้งสอง อย่าใช้ dropper ในการย้าย spore suspension มาใส่ haemacytometer เพราะจะได้ spore suspension มากเกินไปและไหลล้นลงช่องข้าง scale ซึ่งจะพาเอาสปอร์ที่นับได้ไม่ตรงตามความเป็นจริง เมื่อใส่ spore suspensions แล้วก็ทิ้งไว้ประมาณ 1-2 นาที เพื่อให้สปอร์นอนก้นก่อนจึงนับจำนวนสปอร์

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer (ภาพที่7)

1. ในกรณีที่สปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็ก การนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนับจำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่บริเวณขอบของตารางทุกช่องด้วย
2. พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ 25 x 16 x 1/400 ตารางมิลลิเมตร
3. หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก 1/10 มิลลิเมตร) จะเท่ากับ 25 x 16 x 1/400 x 1/10 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลบ.มม.

4. สมมุตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลบ.มม.
5. ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลบ.ซม. หรือ 1 มล. ซึ่ง 1 มล. เท่ากับ 1000 ลบ.มม.

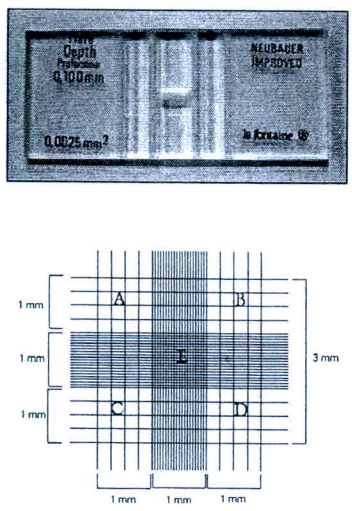
   ดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลบ.มม. นับสปอร์ได้ = Y สปอร์

   ถ้าใน 1000 ลบ.มม. (1 มล.) จะมีสปอร์ = Y x 1000 x 1/0.1 สปอร์

   = Y x 1 x 10^4

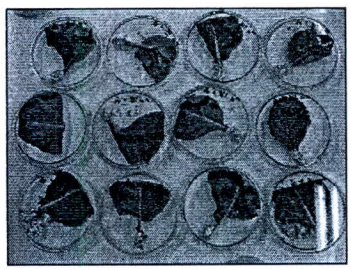
   สปอร์/มล.
6. ในกรณีสปอร์ หรือเซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือสปอร์หรือเซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุตินับจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มล. = Z/5 x 1 x 10^4 สปอร์/มล.
7. การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ Suspension กระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากครั้งขึ้น เช่น 5 – 10 ครั้ง แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรืออาจจำเป็นต้องเติม wetting agent เช่น Tween 20 ลงไปเพื่อช่วยให้สปอร์ หรือเซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้น ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น)
8. นำสไลด์ที่เตรียมได้ไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนสปอร์ หรือเซลล์ของเชื้อแล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีคำนวณข้างต้น

โดยในการทดลองได้ใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ $6x10^7$ สปอร์/มล., $6x10^8$ สปอร์/มล., $6x10^9$ สปอร์/มล. และ $6x10^{10}$ สปอร์/มล.



ภาพที่7 สไลด์นับสปอร์ (haemacytometer)

นำหนอนวัย 1, 2 และ หนอนวัย 3 ใส่ใน plate ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ฉีดพ่นเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ภาพที่8) หลังจากนั้นตรวจนับผลการตายที่ 3, 5 และ 7 วัน



ภาพที่ 8 Plate ที่มีหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ถูกพ่นด้วยเชื้อราเขียวที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล

แปลงค่าจำนวนหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 ที่ตายในทุกกรรมวิธีเป็นเปอร์เซ็นต์การตายตามสูตร

% การตายของหนอนกระทู้ผัก =

(จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว-จำนวนหนอนหลังทดสอบเชื้อราเขียว) x100
จำนวนหนอนก่อนทดสอบเชื้อราเขียว

ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) มากกว่า 5 % ให้ทดลองใหม่ ถ้ามีการตายของกรรมวิธีควบคุม (control) อยู่ในช่วง 0-5 %ให้ปรับค่าเปอร์เซ็นต์ การตายของหนอนกระทู้ผักด้วย Abbott's formula ดังนี้

$$\text{Abbott's formula, } Pt = \frac{Po-Pc}{100-Pc} \times 100$$

Pt = % Corrected mortality

Po = % Observed mortatity

Pc = % Control mortatity

(สำหรับการทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบ factorial experiment, 3x3x3x4) นำค่าที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD โดยใช้ program statistix for windows บันทึก รูปร่างลักษณะ สีของโคโลนี และสปอร์ของเชื้อแต่ละไอโซเลต แล้ว

นำไปวินิจฉัยเพื่อยืนยันข้อมูลเปรียบเทียบกับที่เคยรายงานไว้จากสัณฐานวิทยา และลักษณะการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราเขียว

การค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker)

การค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อ *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์เพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านโมเลกุล โดยใช้วิธี Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP) นั้นประกอบด้วย:

1 สกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างเส้นไยของเชื้อรา *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์

2 การตัด ตัวอย่าง DNA ของเชื้อรา (250 นาโนกรัม) ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Taq* I

3 DNA fragments จะเชื่อมด้วย Eco-adaptor (5′-ctcgtagactgcgtacc -3′, 5′-aattggtacgcagtcta-3′) และ Taq-adaptor (5′-gacgatgagtcctgag-3′, 5′- cgctcaggactcat-3′) สำหรับด้านปลายที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Taq* I ตามลำดับ

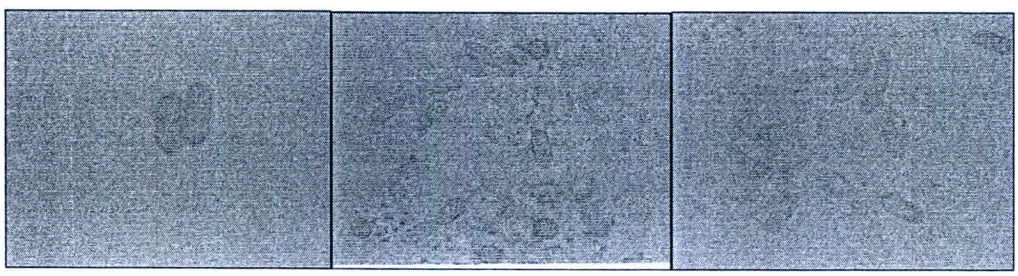
4 preamplification DNA fragments ด้วย pre-*Eco*RI primer (5′-gactgcgtaccaattca-3′) pre-*Taq*I primer (5′-gatgagtcctgagcgaa-3′)

5 เลือก amplify DNA fragment จาก PCR product ในข้อ 4.4ด้วย *Eco*RI-NNN primer (5′-gactgcgtaccaattcNNN-3′) และ *Taq*I-NNN primer (5′-gatgagtcctgagcgaNNN-3′) เมื่อ N คือ นิวคลีโอไทด์ A, C, G หรือ T การเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ชุด primer สำหรับ PCR programm เริ่มต้นด้วยอุณหภูมิ 95 ^{o}C นาน 3 นาที และ denaturation ที่ 95 ^{o}C นาน 30 วินาที annealing ที่ 62 ^{o}C นาน 1 นาที และ elongation ที่ 72 ^{o}C นาน 1 นาที จำนวน 3 รอบ จากนั้น ทำซ้ำอีก 12 รอบ โดยทุกๆ 3รอบ จะลดอุณหภูมิของ annealing ลง 2 ^{o}C จากนั้นใช้อุณหภูมิ denaturation 95 ^{o}C นาน 30 วินาที annealing ที่ 52 ^{o}C นาน 1 นาที และ elongation ที่ 72 ^{o}C นาน 1 นาที ทำซ้ำ จำนวน 20 รอบ และต่อด้วยที่อุณหภูมิ 72 ^{o}C นาน 5 นาที PCR product ที่ได้จะถูกนำไปแยกขนาดด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis) ใน denaturing polyacylamide gel และย้อมแถบ DNA ด้วย silver staining

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

จากการนำเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 10 ไอโซเลท มาทดสอบกับหนอนกระทู้ผักวัย 2 ผลปรากฏว่า เชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ เชื้อราเขียว BCC1858, BCC4849 และ Khon Kaen ซึ่งทำให้หนอนกระทู้ผักวัย 2 มีอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 2 วัน และลักษณะสปอร์ของเชื้อราเขียวทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่า มีรูปทรงกระบอกตรงและรูปทรงค่อนข้างกลม สปอร์มีสีเขียว (ภาพที่ 9)



BCC1858 BCC4849 Khon Kaen

ภาพที่ 9 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* (1000X) 3 ไอโซเลท

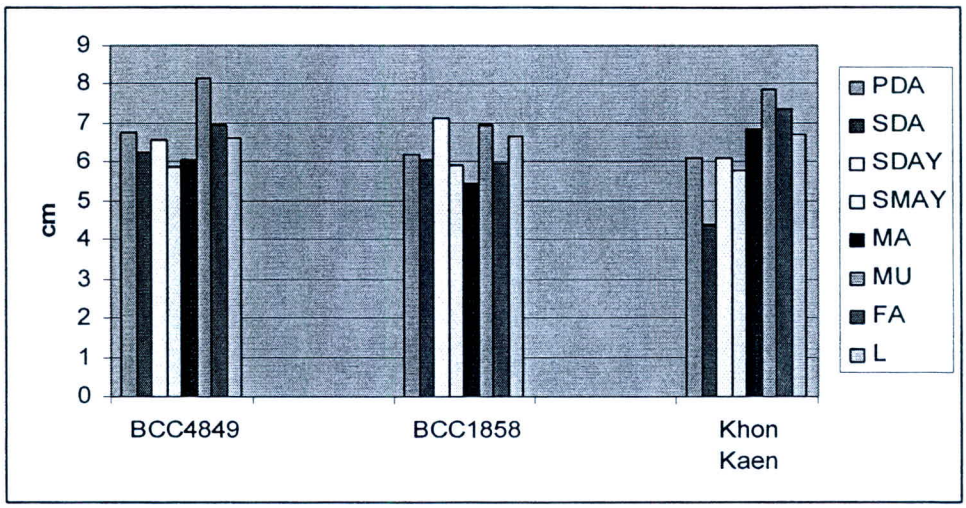
4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 8 ชนิด เพื่อศึกษาการเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นว่า เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทเชื้อราเขียว กับชนิดของอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P =0.01 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ Mungbean agar (MU) ทำให้เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ Khon Kaen เจริญดีที่สุด มีค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ 15 วัน เท่ากับ 8.14 และ 7.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC 1858 เจริญดีที่สุดบนอาหาร L, MU และ SDAY เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีที่ 15 วัน เท่ากับ 6.66, 6.93 และ 7.15 เซนติเมตร รายละเอียดผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 และ ภาพที่ 10

ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเชื้ออายุ 15 วัน คือ เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU มีเส้นใยสีขาว โคโลนีนูนแน่น คล้ายกำมะหยี่ต่อมาบางแห่งยุบลงมีสีเหลือง บริเวณกลางโคโลนีมีการสร้างสปอร์ที่มีสีเขียว เชื้อราเขียวไอโซเลท BCC1858 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY เริ่มต้นโดยการสร้างเส้นใยสีขาว บางๆ โดยแผ่แนบไปผิวอาหารโดยแผ่เป็นวง ๆ ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจากมีการสร้างสปอร์สีเหลือง จากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวบางบริเวณของโคโลนี สปอร์มีสีเขียว และเชื้อราเขียวไอโซเลท Khon Kaen บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU ซึ่งสร้างเส้นใยสีขาว ต่อมาเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ขอบโคโลนีมีสีขาว ลักษณะของสปอร์คล้ายผงมีสีเขียว (ภาพที่ 11-13)

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.05		
Isolate (I)	2	1.11	20.50	0.00
Media (M)	7	4.87	90.06	0.00
I*M	14	1.49	27.52	0.00
Error	69	0.05		
Total	95			
Coefficient of variance	3.61%			



ภาพที่10 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท บนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

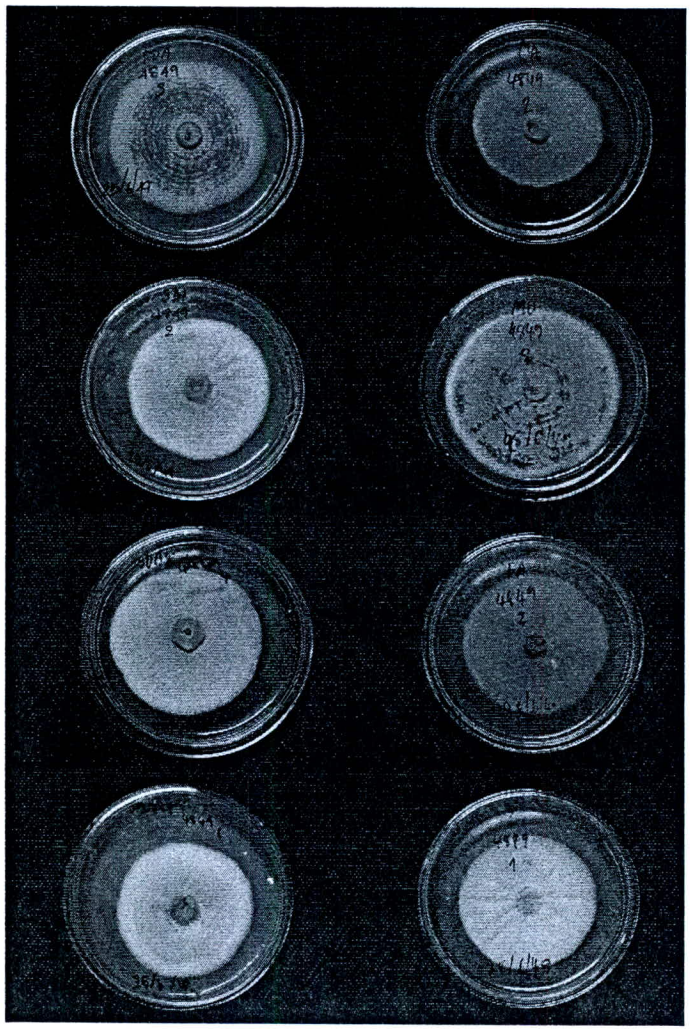
ตารางที่ 4 การเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ กัน โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เมื่ออายุ 15 วัน

เชื้อ	อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่าง ๆ (ซ.ม.)[1]							
	PDA	SDA	SDAY	SMAY	MA	MU	FA	L
BCC4849	6.75	6.26	6.59	5.89	6.04	8.14	6.93	6.61
BCC1858	6.18	6.08	7.15	5.90	5.45	6.93	5.95	6.66
Khon Kaen	6.11	4.40	6.11	5.78	6.85	7.89	7.36	6.71

$LSD_{0.05} = 0.33$

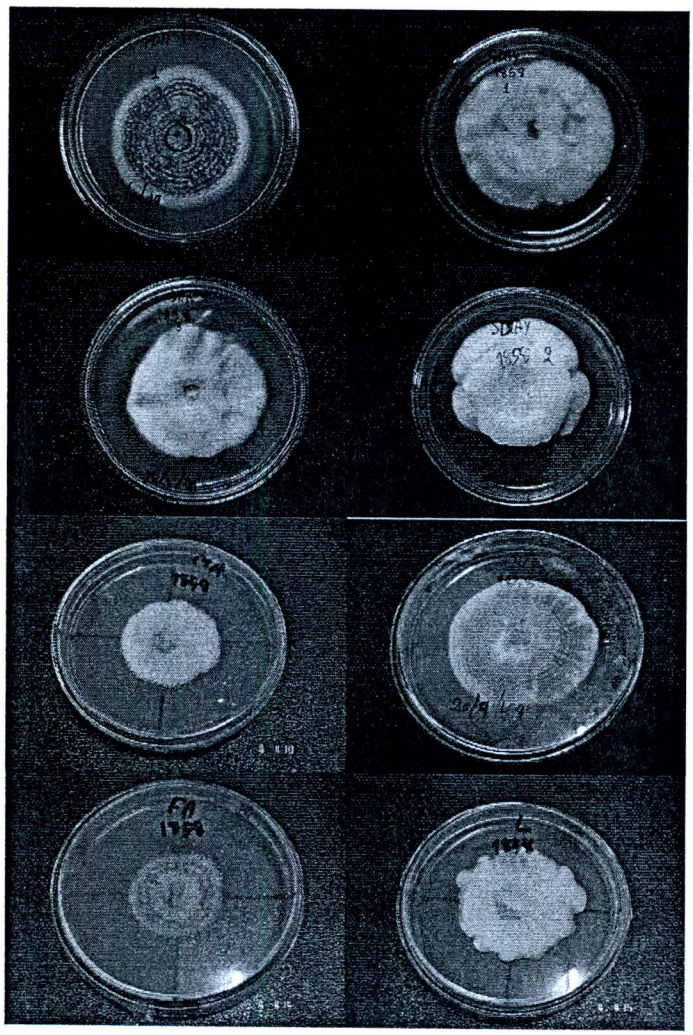
$LSD_{0.01} = 0.44$

[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ



ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC4849 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar
SDA = Sabouraud dextrose agar
SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract
SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract
MA = Malt agar
MU = Mungbean agar
FA = Fungus agar
L = Latch ' s medium



ภาพที่ 12 ลักษณะโคโลนีเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC1858 ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar

SDA = Sabouraud dextrose agar

SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract

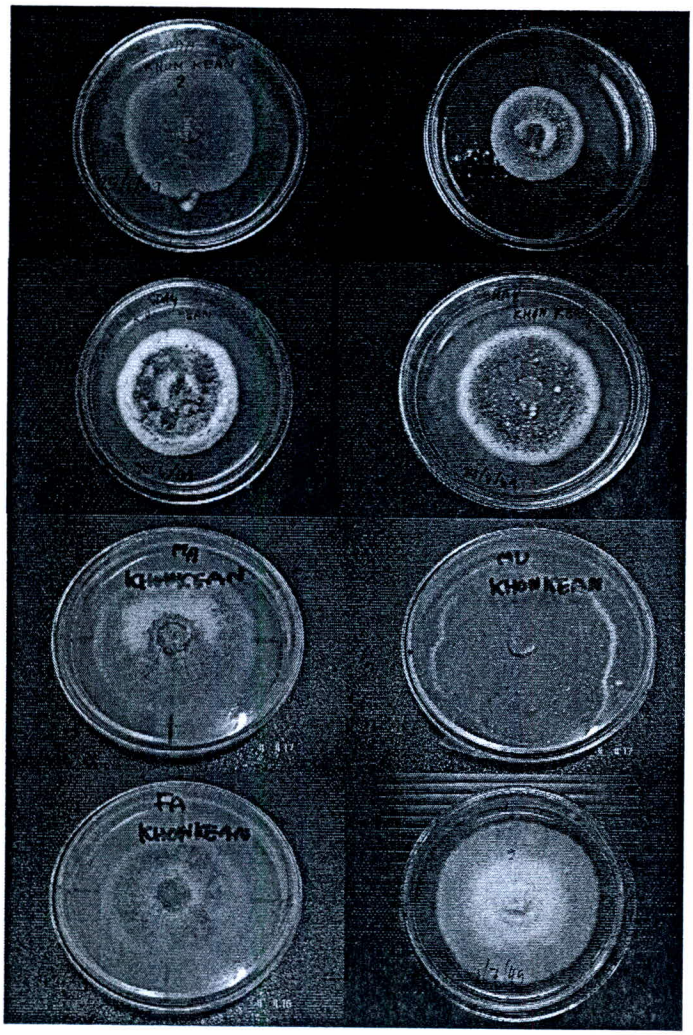
SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract

MA = Malt agar

MU = Mungbean agar

FA = Fungus agar

L = Latch ' s medium



ภาพที่ 13 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท Khon Kaen ที่เจริญบนอาหาร 8 ชนิด หลังการทดสอบ 15 วัน

PDA = Potato dextrose agar
SDA = Sabouraud dextrose agar
SDAY = Sabouraud dextrose agar with yeast extract
SMAY = Sabouraud maltose agar with yeast extract
MA = Malt agar
MU = Mungbean agar
FA = Fungus agar
L = Latch ' s medium

4.3 ผลของอุณหภูมิต่าง ๆ ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MU ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียวกับอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 5 (P =0.01) พบว่า เชื้อราเขียวทั้ง 3 ไอโซเลท เจริญเติบโตได้

ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ BCC 4849 ซึ่งเจริญได้ดีสูงสุด มีค่าเท่ากับ 7.16 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % การสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 สร้างมากที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ เชื้อราเขียว ไอโซเลท Khon Kaen สร้างสปอร์มากที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 14 และตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อรา*เขียว M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.59		
Isolate (I)	2	18.69	116.49	0.00
Media (M)	2	12.78	79.65	0.00
Temperature (T)	2	14.28	89.04	0.00
isolate x media	4	0.45	2.80	0.03
isolate x temperature	4	3.38	21.06	0.00
M*T	4	0.09	0.62	0.65
I*T *M	8	0.25	1.59	0.14
Error	78	0.16		
Total	107			
Coefficient of variance	7.67 %			

ตารางที่ 6 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกันบนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

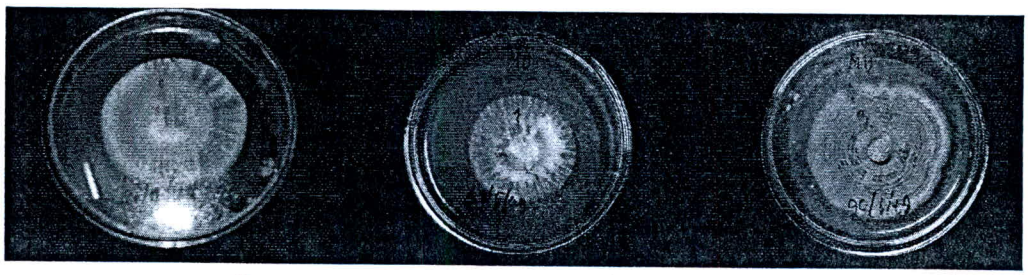
เชื้อ	อุณหภูมิ	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.)[1]
BCC1858	25 องศาเซลเซียส	4.69
	30 องศาเซลเซียส	4.56
	35 องศาเซลเซียส	5.97
BCC4849	25 องศาเซลเซียส	5.25
	30 องศาเซลเซียส	6.19
	35 องศาเซลเซียส	7.16
Khonkean	25 องศาเซลเซียส	6.33
	30 องศาเซลเซียส	5.16
	35 องศาเซลเซียส	6.35

$LSD_{0.05} = 0.56$

$LSD_{0.01} = 0.75$

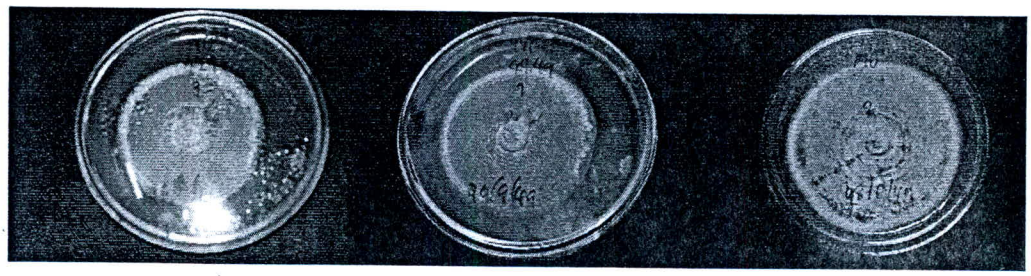
[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ

เชื้อ1858



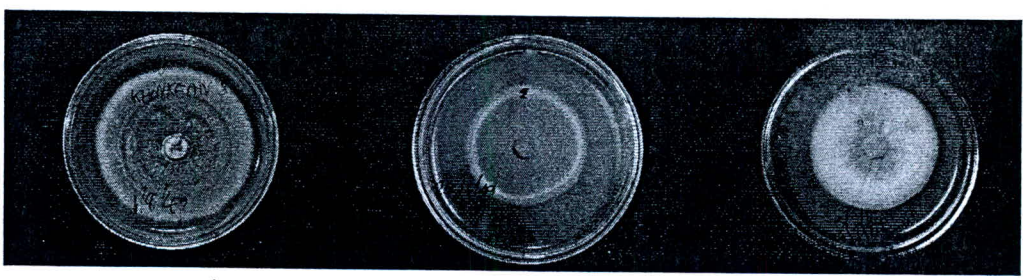
25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 35 องศาเซลเซียส

เชื้อ BCC 4849



25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 35 องศาเซลเซียส

เชื้อ Khon Kaen



25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 35 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 14 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส) บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

4. 4 ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเขียว

ผลการทดสอบสภาพแสงที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียวกับสภาพแสงที่ได้รับ (P = 0.01) ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยที่เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 และ BCC4849 เจริญเติบโตได้ดีที่แสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท Khon Kaen เจริญเติบโตได้ดีในที่มืด 24 ชั่วโมง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 7.03 เซนติเมตร 7.57 เซนติเมตร และ 7.89 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % การสร้างสปอร์ของเชื้อราเขียวไอโซเลท BCC1858 และ Khon Kaen สร้างสปอร์มากใน ที่มีแสง 12 ชั่วโมงสลับกับที่มืด 12 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ BCC4849 สร้างสปอร์มากในที่มีแสง 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 15 และ ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน หลังการทดสอบ 15 วัน

Source	df	MS	F	P
Rep	3	0.25		
Isolate (I)	2	31.70	8.78	0.00
Light (L)	2	14.11	12.86	0.00
Media (M)	2	23.74	58.71	0.00
I*L	4	0.39	0.17	0.15
isolate x media	4	1.74	0.42	0.00
light x media	4	0.99	0.84	0.00
isolate x light x media	8	0.45	0.78	0.06
Error	78	0.23		
Total	107			
Coefficient of variance	8.10 %			

ตารางที่ 8 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่สภาพแสงแตกต่างกัน 3 แบบ บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

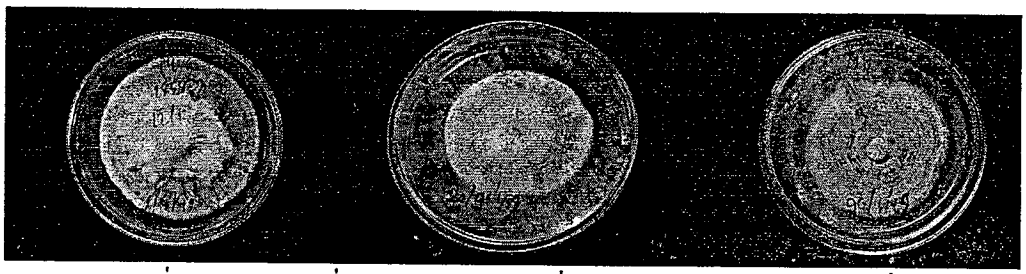
เชื้อ	แสง	เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (ซ.ม.)[1]
BCC1858	แสง12ชั่วโมง/มืด12ชั่วโมง	7.03
	แสง 24 ชั่วโมง	5.07
	มืด 24 ชั่วโมง	6.07
BCC4849	แสง12ชั่วโมง/มืด12ชั่วโมง	7.57
	แสง 24 ชั่วโมง	6.09
	มืด 24 ชั่วโมง	7.03
Khonkean	แสง12ชั่วโมง/มืด12ชั่วโมง	7.69
	แสง 24 ชั่วโมง	5.75
	มืด 24 ชั่วโมง	7.89

$LSD_{0.05} = 0.67$

$LSD_{0.01} = 0.89$

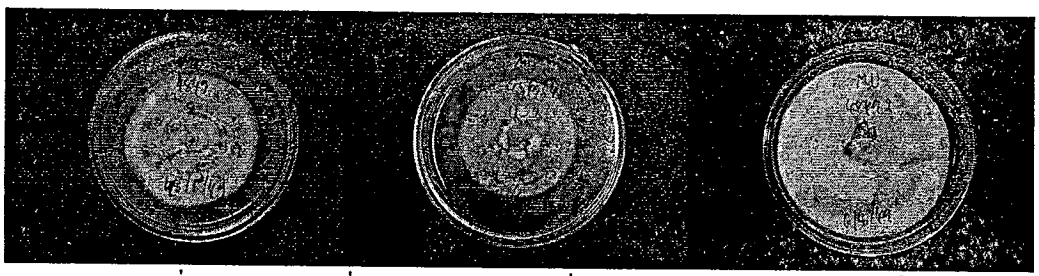
[1] ค่าเฉลี่ยคิดจาก 4 ซ้ำ

เชื้อ BCC1858



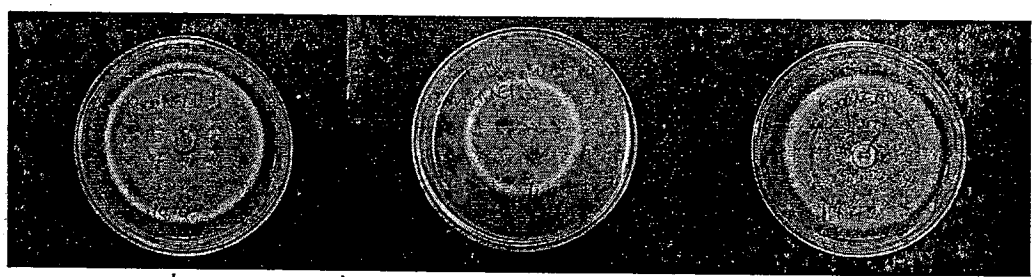
แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง มืด 24 ชั่วโมง

เชื้อ BCC 4849



แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง มืด 24 ชั่วโมง

เชื้อ Khon Kaen



แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง มืด 24 ชั่วโมง

ภาพที่15 การเจริญของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท คือ เชื้อ BCC4849, BCC1858 และเชื้อ Khon Kaen (แสง 12 ชั่วโมง/มืด 12 ชั่วโมง แสง 24 ชั่วโมง และ มืด 24 ชั่วโมง) บนอาหาร Mungbean agar หลังการทดสอบ 15 วัน

4.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผัก

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติในตารางที่ 9 พบว่า ไอโซเลท เชื้อราเขียว กับหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % หลังพ่นเชื้อ 7 วัน ปรากฏว่า เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 คือ 78.95 % ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC4849 และ Khon Kaen มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุดที่หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 คือ 79.49 % และ 59.46 % ตามลำดับ (ภาพที่ 16)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์ความผันแปรทางสถิติสำหรับ factorial treatment effects และ interactions เชื้อราเขียว *M. anisopliae* 3 ไอโซเลท ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ และ เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3 หลังทดสอบ 7 วัน

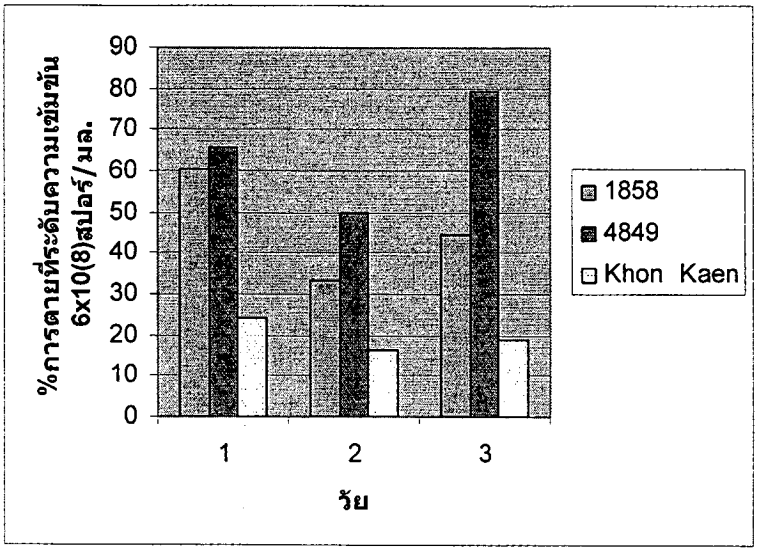
Source	df	MS	F	P
Rep	3	2.53		
Concentration (C)	4	152.92	37.67	0.00
Isolate (I)	2	54.32	13.38	0.00
Lavae (L)	2	6.72	1.65	0.20
concentration x isolate	8	14.89	3.67	0.00
concentration x larve	8	12.46	3.07	0.00
I*L	4	2.63	0.65	0.63
C*I *L	16	2.70	0.66	0.82
Error	132	4.06		
Total	179			
Coefficient of variance	50.80 %			

ตารางที่ 10 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC 4849 ที่ 3, 5 และ 7 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ

ระดับความเข้มข้น	วัย	อัตราการตาย 3วัน	อัตราการตาย 5 วัน	อัตราการตาย 7 วัน
(สปอร์/มล.)		%การตายที่จริง	%การตายที่จริง	%การตายที่จริง
$6x10^7$	1	0.00	13.16	15.79
	2	0.00	5.26	13.16
	3	0.00	20.51	53.85
$6x10^8$	1	2.63	60.53	65.79
	2	10.53	39.47	50.00
	3	2.56	51.28	79.49
$6x10^9$	1	5.26	42.11	47.37
	2	0.00	55.26	57.89
	3	0.00	33.33	48.72
$6x10^{10}$	1	15.79	71.05	76.32
	2	2.63	42.11	44.74
	3	2.56	56.41	61.54
control	1	5.00	5.00	5.00
	2	5.00	5.00	5.00
	3	2.50	2.50	2.50

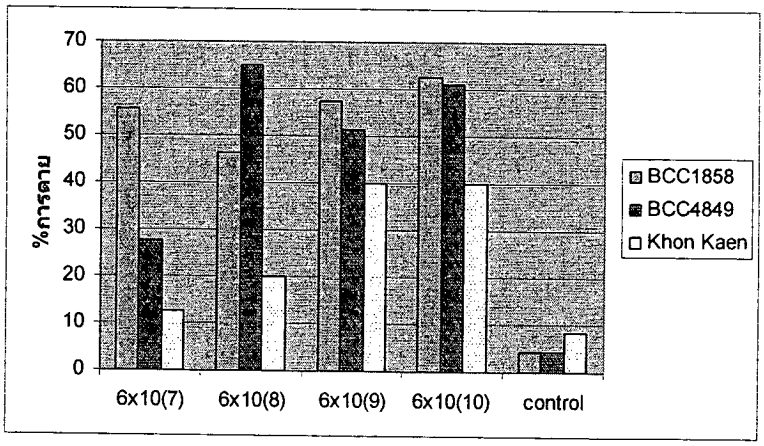
$LSD_{0.05} = 2.82$

$LSD_{0.01} = 3.72$



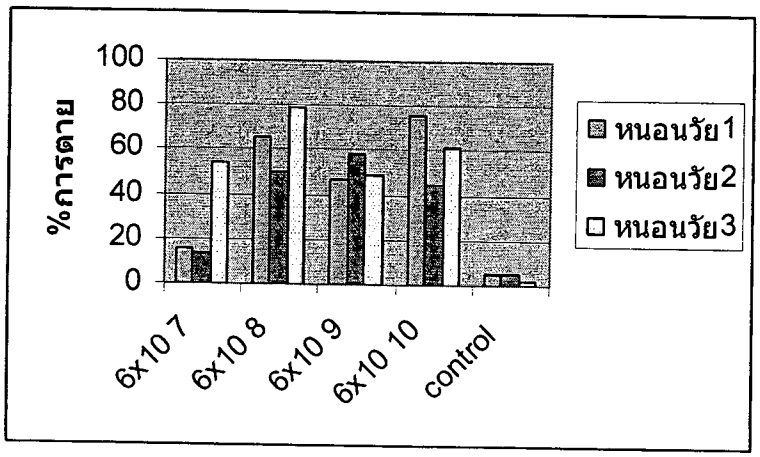
ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก วัยที่ 1, 2 และ 3

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท พบว่า เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียว กับ ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % หลังพ่นเชื้อ 7 วัน พบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุด ทำให้เชื้อราเขียว ไอโซเลท BCC1858 และ Khon Kaen มีเปอร์เซ็นต์การตาย คือ 62.58 % และ 40.02 % ตามลำดับ ส่วนเชื้อราเขียว ไอโซเลทBCC4849 ที่ระดับความเข้มข้น $6x10^8$ สปอร์/มล. มีเปอร์เซ็นต์การตาย เป็น 65.09 % (ภาพที่17)



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผัก (ปฏิกิริยาร่วมระหว่างไอโซเลทของเชื้อราเขียวกับระดับความเข้มข้น 4 ระดับ)

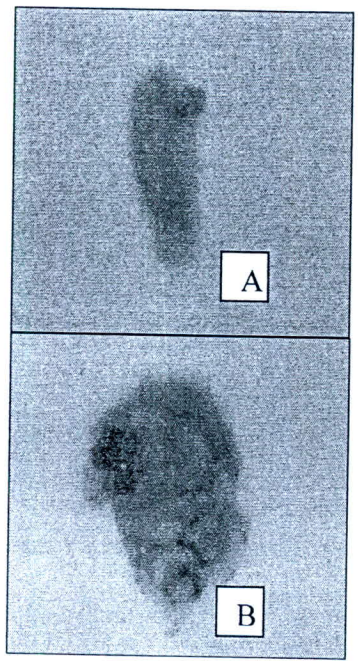
ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลท พบว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่าง ระดับความเข้มข้น 4 ระดับ กับ หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 99 % ปรากฏว่า เชื้อราเขียวไอโซเลท BCC 4849 ที่ระดับความเข้มข้น 6×10^{8} สปอร์/มล. มีประสิทธิภาพในการทำให้เกิดโรคกับหนอนกระทู้ผักมากที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสูงสุด ในช่วง 7 วัน หลังการทดสอบ พบว่า หนอนกระทู้ผักวัยที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 65.79 %, หนอนกระทู้ผักวัยที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 50.00 % และ หนอนกระทู้ผักวัยที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การตาย 79.49 % (ภาพที่ 18 และตารางที่ 10)



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3 ของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* ไอโซเลท BCC 4849 (ที่เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างระดับ ความเข้มข้น 4 ระดับกับหนอนกระทู้ผักวัยที่ 1, 2 และ 3)

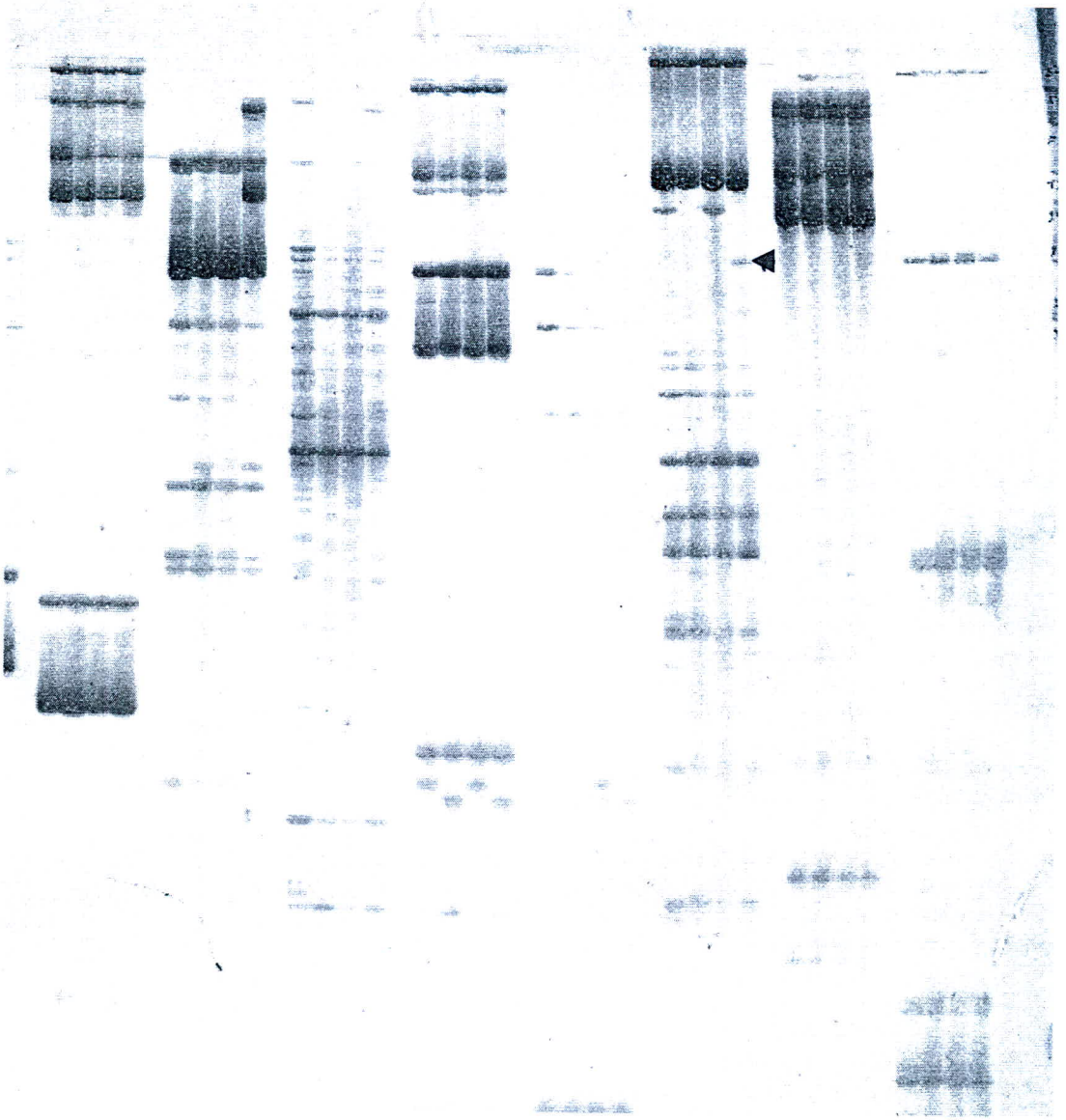
ลักษณะอาการของหนอนกระทู้ผักที่ถูกเชื้อราเขียวเข้าทำลาย

เมื่อฉีดพ่นเชื้อราเขียวจำนวน 3 ไอโซเลท บนตัวหนอนกระทู้ผักวัย 1, 2 และ 3 หลังจากฉีดพ่น 7 วัน พบว่าหนอนที่ตายมีเส้นใยสีขาว (mycelium) บนตัวหนอน หลังจากนั้นประมาณ 14-15 วัน จะเริ่มเปลี่ยนเป็นสปอร์สีเขียว (ภาพที่ 19)

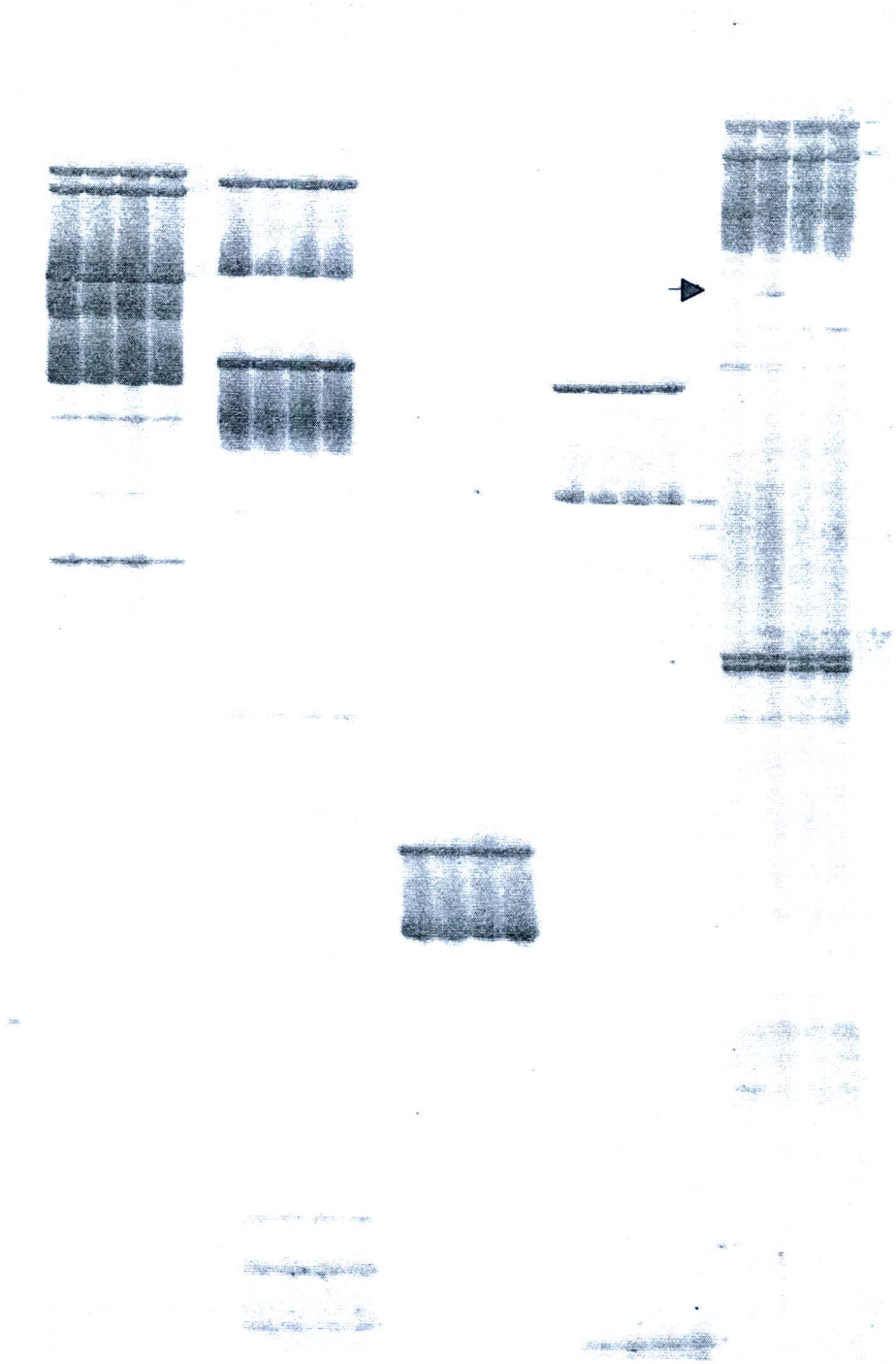


ภาพที่ 19 หลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว 7 วัน หนอนที่ตายมีเส้นใยสีขาว (mycelium) ปกคลุม (A) และหลังฉีดพ่นเชื้อราเขียว 14-15 วัน หนอนที่ตายมีสปอร์สีเขียว (B)

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล AFLP สำหรับการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อ *M. anisopliae* แต่ละสายพันธุ์เพื่อศึกษาข้อมูลทางด้านโมเลกุล โดยใช้วิธี Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP) นั้น ลายพิมพ์ของเครื่องหมายโมเลกุล AFLP แสดงดังภาพที่ 14-15



ภาพที่ 20 ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ *M. anisopliae* ที่ได้จาก ตัวอย่างดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI/TaqI โดยตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ทั้งนี้เครื่องหมาย ◀ แสดงตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ปรากฏเฉพาะ



ภาพที่ 21 ตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ของ *M. anisopliae* ที่ได้จาก ตัวอย่างดีเอ็นเอในแต่ละสายพันธุ์และตัดสายดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI/TaqI โดยตัวอย่างลายพิมพ์ AFLP ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยชุดไพรเมอร์จำนวน 5 คู่ ทั้งนี้เครื่องหมาย ◀ แสดงตำแหน่งเครื่องหมายโมเลกุล AFLP ที่ปรากฏเฉพาะ