

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญ

เชื้อราที่เป็นสาเหตุ โรคของแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *B. brongniatii* (Saccardo) Petch, *B. amorpha*, *Metarhizium* spp. และ *Hirsutella* spp. ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์ ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในระบบการเกษตรอย่างกว้างขวาง (Lacey, 1997) อีกทั้งเชื้อราเหล่านี้ ยังนับเป็นองค์ประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งของ การบริหารจัดการศัตรูพืชแบบบูรณาการ (Integrated pest management - IPM) โดยมีงานวิจัยหลายงานพยายามศึกษาวิธีการต่างๆ ในการเพิ่มความรุนแรง (virulence) ของเชื้อราเหล่านี้ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (Gerding-Gonzalez *et al.*, 2007, pp. 105-110; Tinzaara *et al.*, 2007, pp. 111-124) แต่ในอีกด้านหนึ่ง เชื้อราเหล่านี้ เป็นเชื้อราชั้นต่ำที่มีโครโมโซมแบบเดี่ยว (haploid imperfect fungi) ซึ่งสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ ทั้งในระยะเวลาที่อยู่แบบอิสระ (endophytic phage) และระยะที่สามารถก่อโรคกับแมลง (entomopathogenic phage) ซึ่งมีความซับซ้อน และความแปรปรวน ภายในชนิดพันธุ์เดียวกันอย่างมาก ทั้งนี้ เป็นผลมาจาก พันธุกรรม ดังเช่นการกล่าวอ้างในรายงานการศึกษาที่พบว่า ความรุนแรงในการก่อโรค ของเชื้อราโรคแมลงขึ้นอยู่กับพื้นที่ซึ่งพบเชื้อราชนิดนั้นๆ (pathogenic ecotype or geographical isolate) รูปแบบของพันธุกรรม และ พืชของแมลงที่เป็นตัวอาศัย (insect host range) ของเชื้อราชนิดนั้น (Brad *et al.*, 2002, pp. 125-132; Devi *et al.*, 2006, pp. 495-504; Neugeglise *et al.*, 1994, pp. 322-328; Viaud *et al.*, 1996, pp. 175-183) นอกจากนี้ มีรายงานว่า เชื้อราโรคของแมลง เป็นเชื้อที่มีการรวมกันของหน่วยพันธุกรรม (genetic recombination) ในระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้ หรือ เป็นการสืบพันธุ์แบบการสืบพันธุ์โดยอาศัยเพศแบบเทียม (parasexual cycle) โดยมีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน พันธุกรรม (genetic material exchange) เกิดเป็นเชื้อราสายพันธุ์ใหม่ ที่อาจมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นหรือลดลง ได้ (Corell *et al.*, 1987, pp.1640-1646) โดยการตรวจสอบการแลกเปลี่ยน พันธุกรรมนี้ เช่น การใช้วิธีการรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) (Couteaudier *et al.*, 1996, pp.175-182) การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) (Couteaudier *et al.*, 1997) และ การวิเคราะห์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers (Muriel *et al.*, 1998, pp. 88-93) สามารถ

ดำเนินการได้ ในห้องปฏิบัติการ แต่ในการตรวจหา ในประชากรตามธรรมชาติ มีความยากมาก (Paccola-Meirelles and Azevedo, 1991, pp.172-176), pp.175-182)

การศึกษาเรื่องการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ส่วนใหญ่จะศึกษาการเข้ากันได้ (compatibility) ในโครงสร้างของประชากร แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าการเกิดขึ้นของการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเกิดขึ้นมากน้อยเพียงใด และ ที่สำคัญ การเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ที่อาจเกิดโดยเชื้อราสายพันธุ์จากต่างประเทศ เป็นสิ่งสำคัญ ที่อาจมีผลกระทบ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ท้องถิ่น จนอาจนำไปสู่ความเปลี่ยนแปลงของความหลากหลายทางชีวภาพในระยะยาวได้ ทั้งนี้ ได้มีตัวอย่างของผลจากการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมของเชื้อรา เช่น รายงานการพบเชื้อโรคพืชสายพันธุ์ใหม่ ที่มีความรุนแรงของเชื้อเปลี่ยนไป เนื่องจากการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมแบบ parasexual คือ เชื้อรา *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคราสนิมของข้าวสาลี (brown rust of wheat) โดยพบว่าการแลกเปลี่ยนพันธุกรรม แบบ parasexual นี้ ทำให้ *P. recondita* f. sp. *tritici* มีพันธุกรรมต่างกันถึงสามแบบ ซึ่งส่งผลกระทบต่อลักษณะ ความรุนแรงของการก่อโรค (pathotype) ที่ต่างกัน (Park et al., 1999, pp.715-723) ดังนั้นผลกระทบของการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อราโดยเฉพาะที่ใช้เป็นยาเชื้อ (microbial insecticides) ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมศัตรูพืช อาจเป็นผลดี ได้แก่ การเพิ่มความรุนแรง (hyper virulence) เช่น การเพิ่มความเร็วในการการก่อโรค เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์เดิม หรือ ผลเสีย ได้แก่ การทำให้เชื้อมีความรุนแรงต่ำลง (hypo virulence) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ นอกจากจะมีความสำคัญต่อการนำเชื้อ รามาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชแล้ว ยังมีผล ต่อความเปลี่ยนแปลงของ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้ง การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของประชากรตามธรรมชาติ ของเชื้อจุลินทรีย์ในพื้นที่ด้วย อีกทั้งเนื่องจากในปัจจุบัน ในระบบนิเวศทางการเกษตรในประเทศไทย ในหลายพื้นที่ เกษตรกรได้นำยาเชื้อในรูปแบบสูตรสำเร็จ (formulations) ที่ส่วนมากเป็นเชื้อที่มี การผลิตเป็นการค้า และเป็นสายพันธุ์ต่างประเทศมาใช้ อย่างกว้างขวาง แม้จะเป็นเชื้อที่ไม่มี อันตราย ก็ตาม แต่ทว่า หากมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเกิดขึ้น อาจมี ผลกระทบ ต่อความรุนแรงของเชื้อจุลินทรีย์ในท้องถิ่นที่มีอยู่แล้ว อีกทั้งในแง่ของความหลากหลาย ทางชีวภาพ เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่เกิดขึ้น อาจมีศักยภาพในการเพิ่มปริมาณ และความสามารถในการดำรง ชีวิตสูงกว่าเชื้อไอโซเลทที่มีอยู่แล้วในท้องถิ่น และอาจครอบครองพื้นที่ จนทำให้ไอโซเลทที่มีอยู่แล้ว ลดลง และลด ด้ชนีความหลากหลายในพื้นที่นั้นๆ ลง ดังนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่:

- 1) ในระบบนิเวศที่มีการนำยาเชื้อจากต่างประเทศมาใช้ จะเกิดการผสม หรือการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม กับเชื้อชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ท้องถิ่นหรือไม่ ?
- 2) หากเกิดการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม หรือ การผสมกัน จะมีผลอย่างไร ต่อความรุนแรงของเชื้อที่ผสมเหล่านั้น
- 3) หากมีการแลกเปลี่ยน นพันธุกรรมเกิดขึ้น จะส่งผลอย่างไร ต่อโครงสร้างของประชากรของเชื้อเหล่านี้ ในระบบนิเวศทางการเกษตร รวมทั้ง มีผลดี หรือผลเสียต่อความหลากหลายทางชีวภาพหรือไม่ และ อย่างไร?

ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ จึงทำการสำรวจ รวบรวม และเก็บตัวอย่างของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ที่พบในสภาพธรรมชาติ รวมทั้ง ที่มีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลง ได้แก่ เชื้อรา *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. ซึ่งมีการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยการใช้นิรูปสูตรสำเร็จ ในระบบนิเวศทางการเกษตร จากนั้นนำเชื้อมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาทั้งที่พบในระดับแปลงเกษตร และระดับห้องปฏิบัติการ การทดสอบ ความรุนแรง กับแมลง ศัตรูพืชในเป้าหมาย (target insect pests) และ ลักษณะพันธุกรรม ก่อนและหลังการผสม รวมทั้งศึกษาระดับความเป็นไปได้ในการเข้ากันได้ทางพันธุกรรม ผ่านวงจรการเกิด parasexual cycle เพื่อเป็นการทดสอบความเป็นไปได้ ของการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมตามธรรมชาติของเชื้อ และหากมีความเป็นไปได้ การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมดังกล่าวจะมีผลต่อความรุนแรงของเชื้อหรือไม่ และ แนวโน้มของการมีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ในอนาคตต่อไป

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิด และลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ซึ่งก่อโรคกับแมลงที่พบในระบบนิเวศแปลงผัก ในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่พบ
3. เพื่อศึกษาลักษณะพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ก่อ นและหลังการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม หากมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเกิดขึ้น
4. เพื่อ ทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ก่อ นและหลังการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม หากมีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมเกิดขึ้น
5. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ ของผลกระทบของการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคของแมลง ต่อความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราโรคของแมลงในท้องถิ่น

## กรอบแนวคิด และสมมุติฐานการวิจัย

เชื้อราสาเหตุโรคของแมลง เป็นเชื้อ ราที่พบได้ตามธรรมชาติ รวมทั้งแหล่งปลูกพืช โดยทั่วไป ทั้งนี้เชื้อราเหล่านี้ โดยมากเป็นเชื้อ ราที่อยู่ในกลุ่ม Deuteromyces ซึ่งหลายชนิดมีการสืบพันธุ์แบบการอาศัยเพศ และแบบอาศัยเพศเทียม (parasexual cycle) ซึ่งคือการที่เส้นใยในระยะ การ เจริญ สามารถผสมกันและเข้ากันได้ เกิด เป็นเชื้อที่ เซลล์มีสองนิวเคลียส (heterokaryons) ที่มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรม (genetic material exchange) ส่งผลให้ได้เชื้อราชนิดใหม่ ที่อาจมีลักษณะพันธุกรรม และคุณสมบัติเฉพาะตัว เปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้มีหลายรายงานชี้ว่า การสืบพันธุ์ในลักษณะดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้ในธรรมชาติ และมีผลต่อความสามารถในการก่อโรคกับแมลง และอาจรวมถึง ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อ ราชนิดนั้นๆ รวมทั้งโครงสร้างของประชากร ของจุลินทรีย์ในระบบนิเวศด้วย ทั้งนี้ ในปัจจุบันได้มีการนำเชื้อราโรคของแมลงหลายชนิดเช่นเชื้อรา *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp. และ *Hirsutella* spp. มาประยุกต์ใช้ในระบบการบริหารจัดการ แมลงศัตรูพืช และ ถึงแม้ว่าเชื้อ ราเหล่านี้จะไม่ใช่พิษต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม แต่ ก็ยังไม่มีการศึกษาถึงผล กระทบต่อระบบนิเวศ และความหลากหลายทางชนิด ของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ในระยะยาว อีกทั้งในแง่ของประสิทธิภาพของการควบคุม ที่อาจเพิ่มขึ้นหรือลดลง และที่สำคัญคือ สายพันธุ์ ที่ใช้เป็นยาเชื้อที่มีจำหน่ายในตลาดผลิตภัณฑ์ป้องกัน

กำจัดแมลงศัตรูพืช ส่วนใหญ่ มีการผลิตและนำเข้ามาจากต่างประเทศ ดังนั้นการศึกษาความเป็นไปได้ของการเกิดการผสมกันของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ของเชื้อราโรคแมลง รวมทั้งผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการลดหรือเพิ่มความรุนแรง หรือ ต่อโครงสร้างประชากรของจุลินทรีย์ท้องถิ่น ล้วนแต่เป็นสิ่งที่อาจจะเกิดขึ้นได้ และอาจมีผลกระทบต่อความเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศในท้องถิ่น ในระยะยาว ซึ่งหลายฝ่ายและภาคส่วน ควร ตระหนัก และ ให้ความสำคัญทั้งในขณะนี้ และต่อไปในอนาคต

### ขอบเขตการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ เป็นโครงการต่อเนื่องรวมสองปี เริ่มดำเนินการตั้งแต่ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553 และ ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554 และในการวิจัยนี้เป็นการวิจัยปีแรก กิจกรรมของการวิจัย มีขอบเขตตั้งแต่การสำรวจชนิดของเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุโรคแมลง ทั้งที่พบตามธรรมชาติ และชนิดที่มีการใช้เป็นยาเชื้อประเภทเชื้อราโรคแมลง ในการควบคุม แมลงศัตรูพืช เช่น ในผักวงศ์กะหล่ำ และ พริกในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง โดยการจำแนกชนิด ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา ทั้งที่พบตามธรรมชาติ และในหี ้องปฏิบัติการ การทดสอบความสามารถในการก่อโรคก่อนการ แลกเปลี่ยนพันธุกรรม การทดสอบความเข้ากันได้ทางพันธุกรรมของเชื้อ (genetic compatibility) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อ เป็นข้อมูลพื้นฐาน เกี่ยวกับโอกาสการเกิดการแลกเปลี่ยนยีน ส่วนพันธุกรรม ซึ่งอาจมีผลต่อความหลากหลายทางชีวภาพ และเพื่อ ประกอบการตัดสินใจ ในการที่จะ นำเชื้อราโรคแมลง ไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช อย่างเหมาะสม และไม่มีผลเสียต่อ ความหลากหลายทางชีวภาพ ของเชื้อราโรคของแมลงในท้องถิ่น รวมทั้งเพื่อ ใช้ทำเป็น “DNA barcode” หรือ “รหัสแถบ ดีเอ็นเอ” ซึ่งเริ่มมีการใช้เป็น มาตรฐานใหม่ในการจำแนกชนิดสิ่งมีชีวิต ทางอนุกรมวิธาน แทนการใช้ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง ในอนาคตต่อไป

## นิยามศัพท์

**แถบรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode)** หมายถึง แถบรหัสซึ่งเกิดจากการใช้ลำดับเบสสั้น ๆ ของยีน (short gene sequence) ซึ่งได้มาจากตำแหน่งหนึ่งที่ถูกใช้เป็นมาตรฐานบนจีโนม (standardized position in the genome) โดยวิธีนี้เป็นการเลียนแบบการใช้แถบสีดำของรหัส Universal Product Code (UPC) ที่นำมาใช้แยกสินค้าต่างๆ ออกจากกัน โดยกำหนดให้ใช้บริเวณที่เรียกว่า "Folmer Region" หรือ 648-bp ของ mitochondrial gene ซึ่งรู้จักกันในชื่อ *ไซโตโครม ซี ออกซิเดส วัน (Cytochrome C Oxidase I - COI)* ซึ่งเป็นส่วนของยีนที่มีการเสนอมาแต่แรก ให้ใช้เป็น "barcode" หรือ "รหัสแถบ" มาตรฐาน ที่จะใช้เป็นลักษณะทางอนุกรมวิธาน แทนลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้

**การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting)** หมายถึง วิธีการสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เช่น การใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หรือ Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งใช้วิเคราะห์หรือศึกษารูปแบบของแถบดีเอ็นเอ ที่แตกต่างกันในสิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วย

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

**การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรม (Genetic material exchange)** หมายถึง การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของหน่วยพันธุกรรม และทำให้เกิดเป็นสิ่งมีชีวิตรุ่นลูกที่อาจมีพันธุกรรมเปลี่ยนไป

**การรวมเข้ากันได้ทางพันธุกรรม (Genetic recombination)** หมายถึง การรวมกันเป็นแบบใหม่ของแอลลีล (allele) ของยีนต่างตำแหน่งเนื่องจากกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ บนโครโมโซมคู่เหมือน (crossing over) ในการแบ่งเซลล์แบบยูแคริโอตส์ (eukaryotes) หรือ บนโครโมโซมของโพรคาริโอตส์ (prokaryotes) ทำให้ได้รูปแบบของยีนหรือจีโนไทป์ที่ต่างไปจากพ่อหรือแม่ เป็นกระบวนการแลกเปลี่ยน และเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต่างสาย

**ไฮเปอร์วิรูเลนซ์ (Hyper virulence)** หมายถึง การที่เชื้อโรคบางสายพันธุ์มีความรุนแรงสูงกว่าประชากรปกติของเชื้อโรคนั้น

**ไฮโปวิรูเลนซ์ (Hypo virulence)** หมายถึง การที่เชื้อโรคบางสายพันธุ์มีความรุนแรงต่ำกว่าประชากรปกติของเชื้อโรคนั้น

**เฮเทอโรคารีรียอนส์ (Heterokaryons)** หมายถึง เซลล์ที่มีนิวคลีไอ (nuclei) ตั้งแต่สองนิวคลีไอขึ้นไป อันเป็นผลมาจากการรวมกันของเซลล์

**พาราเซ็กซวล ไซเคิล (Parasexual cycle)** หมายถึง วงจรการสืบพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม แต่ต่างเวลาและสถานที่จากการใช้การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งในเชื้อราคือการที่เส้นใยในระยะเจริญ (vegetative mycelium) สามารถผสมกัน และเข้ากันได้ กลายเป็น heterokaryons มีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรม (genetic material exchange) และเกิดเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่

**โปรโตพลาสต์ (Protoplast)** หมายถึง เซลล์ของสิ่งมีชีวิต ที่ถูกย่อยหรือ แยกผนังเซลล์ออกโดยเอ็นไซม์ จนเหลือแต่เพียงส่วนของไซโทพลาสซึม ที่ห่อหุ้มด้วยเยื่อ peripheral membrane

**การรวมโปรโตพลาสต์ (Protoplast fusion)** หมายถึง การรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ ตั้งแต่สองโปรโตพลาสต์ขึ้นไป ของสิ่งมีชีวิตชนิดที่มีถิ่นกำเนิดเดียวกัน หรือ ต่างถิ่นกำเนิด ซึ่งโปรโตพลาสต์ ที่รวมกันแล้วสามารถเกิดเป็นสิ่งมีชีวิตใหม่ขึ้น โดยสิ่งมีชีวิตที่เกิดใหม่มีโอกาสมีพันธุกรรมแบบใหม่ได้

**ความหลากหลาย หรือ ภาวะพหุสัณฐาน (Polymorphism หรือ genetic polymorphism)** หมายถึง ความแปรผันทางพันธุกรรมทางธรรมชาติ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งคือ การมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างกัน สองลักษณะ หรือมากกว่าในประชากร ซึ่งเกิดจากแอลลีลที่ต่างกัน จะถือว่า ยีนที่ตำแหน่งหนึ่งมีความหลากหลาย เมื่อความถี่ของแอลลีลที่มีน้อย ไม่ต่ำกว่า 0.01 หรือ 1 เปอร์เซ็นต์

**พาโทไทป์ (Pathotype)** หมายถึง เชื้อโรคสายพันธุ์ ที่ก่อโรคให้กับสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ

**RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA)** หมายถึง เทคนิคการวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซึ่งจีโนมต้นแบบถูกเพิ่มจำนวน (amplified) ด้วยการสุ่มเลือก ไพรมเมอร์เดี่ยวที่สั้น (single, short primer) ซึ่งจะได้ผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนที่มีความยาวถึง 2 คู่เบส ซึ่งจะถูกแยกด้วยการทำ อิเล็กโตรโฟรีซิส

**เส้นใยเจริญ (Vegetative mycelium)** หมายถึง เส้นใยของเชื้อราชนิดที่ไม่มีความเกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หรือไม่ เกี่ยวข้องกับการเกิดไมโทซิส การปฏิสนธิ หรือการใช้หน่วยสืบพันธุ์จากต่างเพศ

**การเข้ากันได้ของส่วนเจริญ (Vegetative compatibility)** หมายถึง ความสามารถในการเข้ากันได้ของหน่วยสืบพันธุ์ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับสำหรับการศึกษาในปีแรก

1. ทราบถึง ชนิดของเชื้อราโรคแมลง ที่พบในแปลงเกษตร ในแปลงผัก ในเขตพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง
2. ทราบถึง ชนิด และลักษณะสัณฐานวิทยา ของเชื้อโรคแมลงที่พบ ทั้งในระดับแปลงเกษตร และที่เพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ
3. ทราบถึง ความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ก่อนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ที่อาจเกิดขึ้น
4. ทราบถึงลักษณะ พันธุกรรม ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง บางชนิด ก่อนการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม ที่อาจเกิดขึ้น
5. ทราบถึงความสามารถ ในการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง ที่พบในระบบนิเวศทางการเกษตรของเชื้อราที่พบ
6. ทราบถึงความเป็นไปได้ และแนวโน้ม ของผลกระทบ ของการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคของแมลง ซึ่งอาจมีผล ต่อ ประชากร และ ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราโรคของแมลง ในท้องถิ่น
7. เป็นข้อมูลพื้นฐาน ของผลของการนำเชื้อจุลินทรีย์จากท้องถิ่นอื่น มาใช้อย่างเหมาะสม โดยไม่ส่งผลเสียต่อความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อจุลินทรีย์ ในท้องถิ่นในระยะยาว

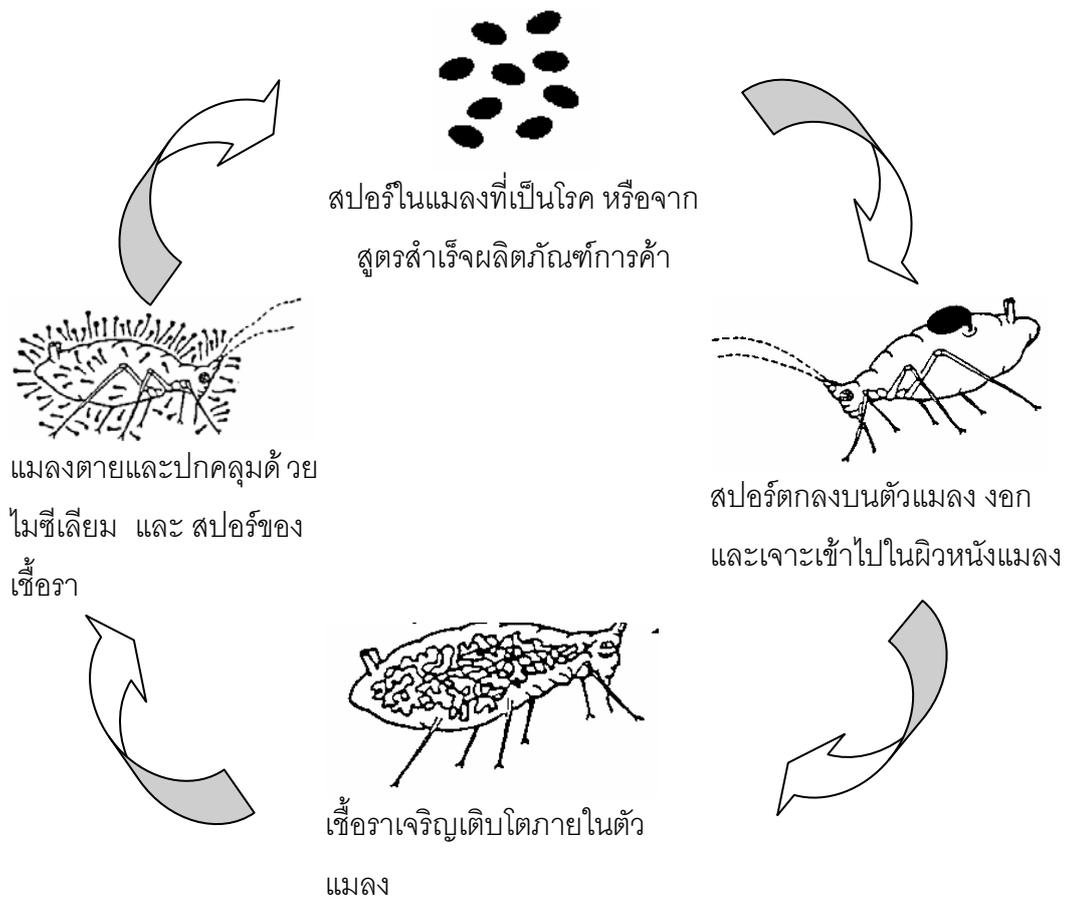
หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้แก่ หน่วยงานต่าง ๆ ที่ทำงานเกี่ยวข้องกับ การควบคุมแมลงศัตรูพืช และ การบริหารจัดการศัตรูพืช เช่น กรมส่งเสริมการเกษตร กรมวิชาการ เกษตร รวมทั้งสถาบัน การศึกษา ที่มีการเรียนการสอน และการฝึกอบรม เกี่ยวกับการควบคุมศัตรูพืช การผลิตอาหารปลอดภัยจากสารพิษ และการทำการเกษตรโดยอาศัยหลักธรรมชาติ เช่น เกษตรอินทรีย์ รวมถึงหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการ บริหารจัดการความหลากหลายทางชีวภาพ และระบบนิเวศของจุลินทรีย์

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎี เอกสาร และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นเชื้อราที่พบได้โดยทั่วไปตามธรรมชาติ เป็นเชื้อราที่ก่อโรคแก่แมลงชนิดต่างๆ โดยการทำให้แมลงติดเชื้อ เข้าทำลายอวัยวะต่างๆ ของแมลง และทำให้แมลงตายในที่สุด โดยกลไกการทำลายแมลงของเชื้อราจะแตกต่างจากจุลินทรีย์อื่นคือ มีผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์ไคติน รวมกันเป็นเส้นใย เรียกว่า ไฮฟี (hyphae) ซึ่งรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ เรียกว่า ไมซีเลียม (mycelium) การขยายพันธุ์ของเชื้อราโรคแมลงส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นโดยการสร้างสปอร์ทั้งแบบมีเพศและไม่มีเพศ ทั้งนี้เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง ส่วนใหญ่ จะอยู่ใน Subdivision Mastigomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina และ Deuteromycotina เชื้อราโรคแมลงเกือบทุกชนิด สามารถเข้าสู่แมลงอาศัย (host insect) โดยตรง ผ่านทางผิวหนังของแมลง (cuticle) โดยมีการปล่อยเอนไซม์หลายชนิด ขณะที่สปอร์งอก โดยสปอร์มักมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างสภาพทางชีวเคมี เพื่อให้สามารถติดแน่นอยู่กับผิวของแมลง เมื่อเข้าไปในช่องว่าง (haemocoel) ในตัวแมลงอาศัย แล้ว เชื้อราจะใช้สารอาหารในร่างกายแมลง ในการดำรงชีวิต และขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว แพร่กระจายไปทั่วตัวแมลง ทำให้แมลงขาดอากาศ หรือ อุดตาย หรือ ตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อรา ผลิตขึ้น จากนั้นไมซีเลียมจะสร้างเส้นใยบนซากแมลง ในขณะที่เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต จะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย ทำให้ซากแมลงแห้ง เชื้อราทำลายแมลงส่วนใหญ่ เส้นใยจะแทงออกมาจากตัวแมลงอาศัย หลังจากแมลงตายแล้ว ยึดซากแมลงให้ติดกับต้นไม้หรือถูกทำให้ยึดติดโดยขบวนการเกิดโรค จากนั้นไมซีเลียมที่อยู่ภายนอกจะสร้างสปอร์ และสปอร์จะค่อยๆ ถูกปล่อยฟุ้งกระจายอย่างรวดเร็วเข้าสู่วงจรการทำลายต่อไป เป็นวงจรชีวิต (ภาพที่ 1.) โดยทั่วไปเชื้อราส่วนใหญ่มีตัวอาศัยหลากหลายทั้งแมลง และสัตว์ที่มีรยางค์ชนิดอื่นๆ แต่บางชนิดมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของความเฉพาะเจาะจง ตัวอาศัย (host specificity) ดังนั้นเชื้อราหลายสายพันธุ์ จะสามารถทำลายตัวอาศัยได้เพียงไม่กี่ชนิด ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น

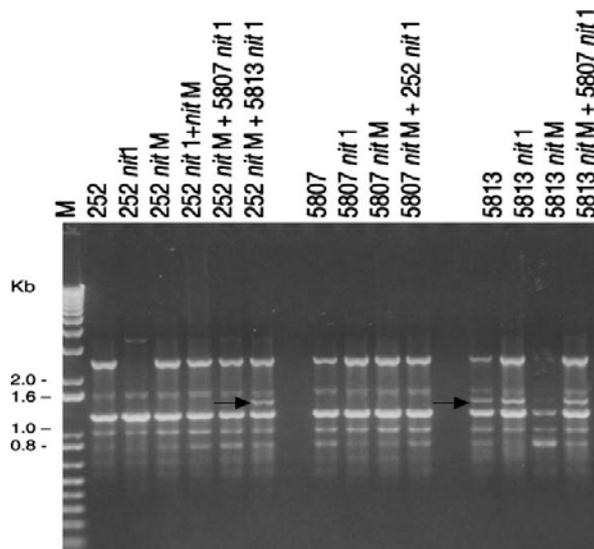


ภาพที่ 1. วงจรชีวิตของเชื้อราโรคแมลง (ที่มา: กรมวิชาการเกษตร, 2550, ม.ป.ป.)

เชื้อราที่ลงทำลายแมลงนั้น สามารถพบได้ทั่วไปในป่าธรรมชาติ หรือ แม้กระทั่งในสวนผลไม้ และ ไร่ นา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพป่าที่มีความอุดมสมบูรณ์ ความหลากหลายของเชื้อราทำลายแมลงจะเพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกัน ถ้าสภาพป่าที่มีการบุกรุกทำลายหรือถูกรบกวนมาก จะพบเชื้อราทำลายแมลงลดน้อยลงไป เนื่องจากสภาพแวดล้อม ณ แหล่งนั้นได้สูญเสียความสมดุล (มาลี สุวรรณรัตน์, 2543, หน้า 1-5)

จากรายงานที่เกี่ยวข้องชี้ว่าเชื้อราโรคของแมลง เป็นเชื้อที่มีการรวมกันของหน่วยพันธุกรรม (genetic recombination) ในระยะเจริญทางเส้นใย (vegetative growth) หรือระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์ลักษณะนี้จะเกิดในรูปแบบ การสืบพันธุ์ที่เรียกว่าแบบอาศัยเพศ เทียม (parasexual cycle) ซึ่งคือการที่เส้นใยในระยะเจริญ (vegetative mycelium) สามารถผสมกันและเข้ากันได้กลายเป็น เส้นใยที่มีสองนิวเคลียส heterokaryons หรือ

เซลล์ที่มีนิวคลีโอ (nuclei) ตั้งแต่สองนิวคลีโอขึ้นไป อันเป็นผลมาจากการรวมกันของเซลล์ (Zaid *et al.*, p.139) โดยผลจากการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนทางพันธุกรรม (genetic material exchange) จะทำให้เกิดเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่ได้ (Corell *et al.*, 1987, pp. 1640-1646) การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมดังกล่าว สามารถตรวจสอบและดำเนินการได้ อีกทั้งให้ผลชัดเจน เมื่อทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการ แต่ในการตรวจหา ในกลุ่มประชากร ตามธรรมชาติมีความยากมาก (Paccola-Meirelles and Azevedo, 1991, pp. 172-176) การศึกษาการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมอาจใช้วิธีการหลอมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) ซึ่งคือ การรวมตัวตั้งแต่สองโปรโตพลาสต์ขึ้นไป ของสิ่งมีชีวิตชนิดที่มีกำเนิดเดียวกัน หรือต่างถิ่นกำเนิด ซึ่งโปรโตพลาสต์ที่รวมกันแล้ว สามารถเกิดเป็นสิ่งมีชีวิตใหม่ขึ้น โดยสิ่งมีชีวิตที่เกิดใหม่มีโอกาสมีพันธุกรรมแบบใหม่ และมีผลการศึกษาชี้ว่าการหลอม โปรโตพลาสต์ มีส่วนช่วยในการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ด้วย (Couteaudier *et al.*, 1996) จากการศึกษาความสามารถของการเข้ากันได้ทางพันธุกรรมของส่วนเจริญ (vegetative compatibility groups - VCGs) ในโครงสร้างของประชากรของเชื้อราโรคแมลง โดยใช้การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) และ Southern blot hybridization พบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าว มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ของเชื้อ รา และมีรายงานอ้างว่าการแลกเปลี่ยนพันธุ กรรมดังกล่าว มีผลต่อการมีความหลากหลายทางลักษณะทางสั ญฐาน หรือภาวะพหุสัณฐาน ของเชื้อ (polymorphism (ช่อฟ้า ทองไทย และ คณะ , 2549) (ด้วย (Couteaudier *et al.*, 1997, pp. 175-182) ส่วน Castrillo *et al.* (2004, pp. 24-36) ได้ทำการตรวจหา VCG ในกลุ่มของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ท้องถิ่นในอเมริกาเหนือ ด้วยการวิเคราะห์ความเหมือนกันทางพันธุกรรมด้วยวิธี การใช้ตัวชี้วัด Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers และสามารถตรวจพบ VCGs ถึง 23 สายพันธุ์ จากจำนวนทั้งหมดที่ทดสอบ 34 สายพันธุ์ ดังแสดงใน ภาพที่ 2. นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เชื้อราที่มีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมจากการผสม นี้ มีการเปลี่ยนแปลงระดับของความรุนแรงด้วย (Muriel *et al.*, 1998, pp. 88-93)



ภาพที่ 2. ตัวอย่างของผลการวิเคราะห์ด้วยวิธี Random amplified polymorphic DNA(RAPD) ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* สายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่างได้ในแถบอเมริกาเหนือ และสายพันธุ์ที่มีการกลายพันธุ์ และ heterokaryons ที่เกิดจากการผสมระหว่างสายพันธุ์ที่เก็บตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-10 ซึ่งสร้างจากเชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ 5813 ซึ่งมีขนาด 1.45 คู่เบส ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกการเกิด heterokaryons ระหว่างสายพันธุ์ 5813 และ 252 และ 5807 Wild type strains, nit 1 (ที่มา: Castrillo, *et al.* 2004, pp. 26-37)

รายงานเกี่ยวกับการนำเชื้อ อโรคมาเลง มาใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง เช่น การทดสอบการใช้เชื้อราควบคุมปลวก ได้แก่การใช้เชื้อราควบคุมด้วงดีด คือ เชื้อราเขียว (green muscardine) *M. anisopliae* และ เชื้อราขาว (white muscardine) *B. bassiana* ในการกำจัดด้วงดีด *Ctenicera destructor* และ *Hypolithus bicolor* ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กัน พบว่าที่ระดับอุณหภูมิต่ำกว่า 28 °ซ พบการตายในตัวอ่อนของด้วง (Zacharuk and Tinline, 1968, pp. 4-309) การใช้ *Metarhizium* sp. ควบคุมด้วงแรดและเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (มลิวัลย์ ปันยารชุน, 2539, หน้า 183-197; Samuels *et al.*, 1989; Zimmermann, 1992, pp. 113-128) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในการนำไปควบคุมด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) ในประเทศไทยมีการส่งเสริมให้มีการใช้ และ ให้มีการผลิตเชื้อขึ้นมาใช้อย่างแพร่หลายมานานแล้ว (มลิวัลย์ ปันยารชุน, 2523; มลิวัลย์ ปันยารชุน และ สุรพล จตุรยานนท์, 2526) นอกจากนี้ ได้มีรายงานศึกษาวิธีการผลิตมวลชีวภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ที่ทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และด้วงแรดมะพร้าว และปัจจุบันได้มีการนำเชื้อราหลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในการ

ควบคุมแมลงศัตรูพืชในรูปแบบยาเชื้อ (microbial insecticides) เช่น เชื้อรา *Beauveria bassiana* (Rehner, 2005), *B. brongniartii* (Saccardo) Petch และ *Beauveria amorpha* Samson & Evans (Lacey, 1997) และ *Metarhizium* spp. โดยยาเชื้อที่มีจำหน่ายเป็นการค้า ได้แก่ Ostrinil, Naturalis, Boveral, Naturalis-L, Naturalis-O, Naturalis-T, BotaniGard, Ghamycotrol, Mycotrol, Bio-Power, Conidia, Proecol, Beauverin, Boverol, Boverosil และ Racer จาก *Beauveria bassiana* และ Engerligspilz, Betel, Melocont-Pilzgerste และ Schweizer Beauveria จาก *Beauveria brongniartii* เป็นต้น (Copping, 2009)

ข้อดีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการควบคุมศัตรูพืช คือ

1. มีความปลอดภัย และไม่เป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่นนอกเป้าหมาย ไม่เป็นอันตราย ไม่มีพิษตกค้าง
2. ความจำเพาะเจาะจงค่อนข้างสูง ทำให้ปลอดภัยต่อแมลงที่เป็นประโยชน์ชนิดอื่น ๆ
3. สามารถนำไปใช้ร่วมกับสารกำจัดแมลงได้
4. จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตได้ง่าย และมีราคาถูก
5. ศัตรูพืชสร้างความต้านทานช้า
6. ความเข้มข้นในการใช้ต่ำ

การใส่ยาเชื้ออาจจะมีการแบ่งออกเป็น 4 แบบได้แก่

1. โดยการนำเชื้อให้เข้าไปตั้งหลักแหล่งอยู่ในกลุ่มของแมลงศัตรูพืช
2. การฉีดพ่นหรือทำเป็นเหยื่อล่อ
3. ใช้ร่วมกับสารกำจัดศัตรูพืช ที่สามารถใช้ร่วมกันได้ หรือ เมื่อใช้แล้วจะทำให้เกิดผลดีเพิ่มขึ้น
4. ใช้ร่วมกับตัวห้ำ ตัวเบียน และ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้

การเพาะปลูกพืชผักในจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง

จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง เป็นจังหวัดทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย ที่นับเป็นพื้นที่สำคัญในการผลิตผลผลิตทางการเกษตรทั้ง การดำเนินการสืบทอดมาตั้งแต่บรรพบุรุษ ตลอดจนมีการส่งเสริมด้านการเกษตร ทั้งจากภาครัฐและเอกชน โดยในด้านการเกษตร ในพื้นที่ศึกษาเหล่านี้ เป็นพื้นที่หลักของการผลิต ไม้ผล คือลำไย ลิ้นจี่ และส้ม รวมทั้งการปลูก ข้าว ตามฤดูกาล และการปลูกพืชผักชนิดต่าง ๆ เป็นพืชเสริมนอกฤดูปลูก การปลูกแซมตามสวนผลไม้ อื่นๆ ในพื้นที่บางส่วนที่มีการชลประทาน เข้าถึง มีการปลูกพืชผัก เป็นอาชีพ ตลอดทั้งปี โดยเกษตรกรส่วนหนึ่ง มีการปลูกพืชผักเพื่อบริโภคภายในครัวเรือน บางส่วนได้รับการสนับสนุนจาก ภาครัฐและองค์กรที่เกี่ยวข้อง ในการปลูกผักปลอดภัยจากสารพิษ เช่นโครงการในพระราชดำริ ฯ และจากกรมส่งเสริมการเกษตร และส่วนหนึ่งได้รับการส่งเสริมให้ปลูก และรับซื้อโดยบริษัททาง การเกษตร เพื่อการแปรรูปผลผลิตเกษตร หรือการ ส่งออก และ ผลิตเมล็ดพันธุ์ ทั้งนี้พืชผักที่ เพาะปลูกในพื้นที่ดังกล่าว ได้แก่ หอม กระเทียม พืชผักวงศ์กะหล่ำ พริก มะเขือเปราะ มะเขือเทศ กระเจี๊ยบเขียว ถั่วฝักยาว และ พืชวงศ์แตง เป็นต้น (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2552 , ม.ป.ป.) จากรายงานประจำปี พ.ศ. 2551 ของศูนย์ข้อมูลด้านการเกษตรและสหกรณ์ (ศูนย์ข้อมูล ด้านการเกษตรและสหกรณ์ , 2552, ม.ป.ป.) จังหวัด เชียงใหม่มีพื้นที่ถือครอง ทาง การเกษตร จำนวน 1.685 ล้านไร่ (ร้อยละ 13.4 ของพื้นที่จังหวัด) ทั้งนี้เป็นพื้นที่ปลูกผัก จำนวน 367,105 ไร่ จังหวัดลำพูนมีพื้นที่เกษตรรวม จำนวน 613,634 ไร่ โดยเป็นพื้นที่ปลูกผักจำนวน 28,276 ไร่ ส่วน จังหวัดลำปาง มีพื้นที่เกษตรจำนวน 696,035 ไร่ และมีพื้นที่ปลูกผักจำนวน 37,080 ไร่ (ภาพที่ 3.)



ภาพที่ 3. แสดงปริมาณพื้นที่ปลูกผักในจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง

## บทที่ 3 วิธีการศึกษา

### 3.1 สถานที่ และ ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ เป็นการศึกษาในระยะเริ่มต้นในปีแรกของโครงการ ได้เริ่มดำเนินการ ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึง กันยายน พ.ศ. 2553 รวมระยะเวลา 1 ปี โดยมีสถานที่ทำการวิจัยได้แก่ โปรแกรมวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต กรุงเทพฯ และ ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ ภาคเหนือตอนบน มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม และ พื้นที่เกษตรในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง

### 3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ตู้สำหรับเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (Laminar flow)
2. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Tomy autoclave ss-320, Tomy Seiko Co.Ltd., Japan)
3. กล้องจุลทรรศน์แบบ Compound microscope
4. กล้องจุลทรรศน์แบบ Stereo microscope
5. อุปกรณ์พื้นฐานในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
6. กล้องเพาะเลี้ยงแมลง
7. เครื่องพ่นสารเคมีกำจัดแมลงในแปลงแบบหัวฉีด
8. อุปกรณ์พื้นฐานในการเก็บตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในภาคสนาม
9. อุปกรณ์สำหรับฉีดพ่นเชื้อราโรคแมลง
10. อุปกรณ์สำหรับให้ความชื้น (Humidifier)
11. เครื่องวัดอุณหภูมิและความชื้น
12. เครื่องมือสำหรับ centrifuge
13. เครื่อง Thermal cycler สำหรับการทำ PCR

14. วัสดุวิทยาศาสตร์ขนาดเล็กที่จำเป็น สำหรับการสกัด DNA การทำ electrophoresis และ การทำ PCR

#### สารเคมีและอาหารเทียมที่ใช้ในการทดลอง

1. Potato Dextrose Agar (PDA) Hi-Media Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai-400 086, India
2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) BIOMARK Laboratory, Pune 411011, India  
Nutrient agar
3. Yeast Extract (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
4. Malt Extract Agar (MEA) (Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Spain. Made in European Union)
5. Beef Extract (Becton Dickinson Microbiolog Systems Company, Sparks, USA)
6. Peptone (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai 400 086, India )
7. Casein Acid Hydrolysate (Hi-Media Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai 400-086 India
8. Agar (ผงวุ้น)
9. Malt Extract (Fluka biochemika)
10. Magnesium sulphate,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (CARLO ERBA REAGENTI, France)
11.  $K_2HPO_4$  (CARLO ERBA REAGENTI, France)
12. Glycerol
13. Dextrose (DIFCO, BECTON DICKINSON, MD, USA)
14. โปรตีนซีรัมคอกเคอเรต
15. น้ำมันพืช
16. สารจับใบ
17. สูตรสำเร็จของเชื้อรา *Beauveria* sp.
18. สารเคมีพื้นฐานที่ใช้ในการฆ่าเชื้อในห้องปฏิบัติการด้านจุลชีววิทยา
19. Protease K และเอ็นไซม์ที่จำเป็นต่อการสกัด DNA
20. PCR Buffer

21. Iso amyl alcohol
22. Chloroform
23. Tween 20
24. Agarose
25. Ethidium bromide
26. DNA polymerase
27. DNA template
28. Primer POA -3 และ universal primer
29. Ethanol 70 %
30. Tris EDTA
31. สารเคมีอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการสกัด DNA การทำ electrophoresis และ การทำ PCR

### 3.4 การสำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในระบบนิเวศเกษตรในแปลงเกษตร และ ห้องปฏิบัติการ

สำรวจเชื้อ ราสาเหตุโรคของแมลงในแปลง ปลูกพืชผัก ได้แก่ ผักวงศ์ กะหล่ำ พริก มะเขือเปราะ มะเขือเทศ ถั่วฝักยาว และ พืชวงศ์แตง ในเขตจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง โดยสุ่มเก็บตัวอย่างจำนวน 50 ต้น/จุด บันทึกข้อมูลเป็นจำนวนรวมของแมลงศัตรูพืช และแมลงที่เป็นโรคแต่ละชนิดที่พบ ในการ เก็บตัวอย่างโรคแมลง ที่เกิดจากเชื้อรา พิจารณาจากการที่โรคของแมลงสามารถก่อโรคได้กับแมลงทุกระยะของการเจริญเติบโต และทุกชนิด แมลงที่ตายจะแห้งและแข็ง อาจพบไมซีเลียมหรือสปอร์ เจริญอยู่บนซากเหยื่อ ซึ่งยึดติดกับใบ หรือส่วนต่างๆ ของต้นพืช เมื่อพบตัวอย่างแมลงที่เป็นโรค ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างโดยตัดชิ้นส่วนต้นพืชที่มีแมลงที่ตายอยู่ และเก็บในกล่องพลาสติกใสขนาด 6 x 3 เซนติเมตร ที่จะเป็นช่องระบายความชื้นที่ฝากล่อง ติดกาวด้วยตาข่ายลวดทองแดง รองก้นกล่อง ด้วยกระดาษทิชชูที่แห้ง และผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บกล่องดังกล่าวใส่ภาชนะเก็บความเย็น (cooler) ซึ่งภายในบรรจุน้ำแข็งแห้ง เพื่อนำกลับไปแยกเชื้อ และจำแนกชนิด ในห้องปฏิบัติการ ต่อไป

นำตัวอย่างแมลงที่เป็นโรคตายจากเชื้อราซึ่งเก็บจากแปลงเกษตรกร มาตรวจหาสปอร์ ใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบสปอร์สามารถนำสปอร์ ไปแยกเชื้อในขั้นตอนต่อไป ได้ทันที หากไม่พบสปอร์ นำตัวอย่างมาวางในกล่องขึ้น ที่รองด้วยกระดาษทิชชูอย่างหนาที่หนึ่งฆ่าเชื้อ และพ่นน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้จนกว่าจะพบสปอร์ และเมื่อพบการสร้างสปอร์ แล้ว จึงนำมาทำการแยกเชื้อด้วยวิธี dilution plate technique โดยใช้

ชิ้นส่วนของแมลงที่ตายและมีสปอร์ติดอยู่ มาละลายในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว เจือจางแบบเป็นชุดลดหลั่นตามความเข้มข้น (series) ให้ได้ความเข้มข้น  $10^4$ - $10^6$  ขึ้นอยู่กับปริมาณการสร้างสปอร์ของเชื้อราแต่ละชนิด นำสารละลายสปอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) ที่เตรียมไว้ บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (20-28 องศาเซลเซียส) จากนั้นประมาณ 4-7 วัน เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวของเชื้อราเจริญบนผิวอาหาร ใช้เข็มเขี่ยแยกมาเพาะเลี้ยง (subculture) บนผิวของอาหาร Malt extract agar หรือ PDA (ขึ้นกับชนิดของเชื้อรา) บ่มในสภาพอุณหภูมิห้อง (20-28 องศาเซลเซียส) นาน 5-7 วัน เมื่อพบการสร้างสปอร์ของเชื้อรา นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยวิธี dilution plate technique โดยใช้ loop ที่ปลอดเชื้อแต่ละสปอร์ที่เกิด นำมาละลายในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการเจือจางแบบเป็นชุดลดหลั่นตามความเข้มข้น (series) ให้ได้ความเข้มข้น  $1 \times 10^4$  และ นำมาเกลี่ยลงบนผิวหน้าของอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) หรือ Water Agar (WA) หรือ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) และ Sabouraud Dextrose Agar with Yeast Extract (SDA+Y Nutrient Agar (NA) (ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อรา) บ่มในสภาพอุณหภูมิห้องปฏิบัติการ (20 -28 องศาเซลเซียส) จากนั้น 3-5 วัน เมื่อพบโคโลนีเดี่ยวจึงทำการ subculture เชื้อไปเก็บในอาหารวุ้น Malt extract agar หรือ PDA ที่บรรจุในหลอดทดลองในลักษณะเอียง (slant agar) และ เก็บในเครื่องทำความเย็นที่ 4-5 องศาเซลเซียส เพื่อรอการทดสอบต่อไป พร้อมกันนี้ ได้มีการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนี เส้นใย และสปอร์ ของเชื้อรา เพื่อการจำแนกชนิดที่ถูกต้อง โดย อาศัยเอกสารอ้างอิง (Steinhaus, 1967, p. 207; Poinar and Thomas, 1984, p. 134; Tanada and Kaya, 1993, p. 352 และ Lacey, 1997) รวมทั้งปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ

นอกจากนั้น มีการเก็บตัวอย่างดิน จากแปลงปลูกพืชผัก โดยการสุ่มตัวอย่างในพื้นที่ขนาด 50 x 50 เมตร ที่ระดับความลึก 0-15 เซนติเมตร พื้นที่ละจำนวน 5 จุด ๆ ละ 500 กรัม ต่อจุด รวมเป็น 2,500 กรัมต่อหนึ่ง ตัวอย่าง นำตัวอย่างแยกบรรจุถุงพลาสติกใส ติดฉลากแสดงตำแหน่งที่เก็บ และ รายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะนิเวศวิทยาของพื้นที่ เก็บในที่เย็น และนำไปศึกษารายละเอียดต่อ ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการ แยกเชื้อราที่เจริญอยู่ในดินต่อไป ด้วยวิธีใช้แมลงเป็นเหยื่อ (insect baiting) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Lacey (1997) โดยนำตัวอย่างดินจากแต่ละจุดมาบรรจุในกล่องพลาสติกใสขนาด 19 x 22 x 10 เซนติเมตร กล่องละ 500 กรัม จำนวน 5 กล่องต่อหนึ่ง จุดสำรวจ พ่นน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จนดินมีความชื้นประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ และปล่อยหนอนไหม (*Bombyx mori*) วัย 3-4 จำนวน 20 ตัวต่อกล่อง ให้ไหมหมอนเป็นอาหารตามความเหมาะสม ปิดกล่องด้วยฝา กล่องที่มีตาข่ายระบายอากาศ บ่มกล่องไว้ ณ อุณหภูมิห้อง

(ประมาณ 20-28 องศาเซลเซียส ) โดยมีการ เปลี่ยนอาหาร และฟนละของน้ำตามความจำเป็น จากนั้นตั้งแต่วันที่ 14 หลังการบ่ม เริ่มทำการตรวจหาหนอนที่ตาย โดยมีลักษณะแข็งและแห้ง ลำตัวปกคลุมด้วยเส้นใยและสปอร์สี ของเชื้อรา และนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี dilution plate technique ทำการจำแนกชนิด แลศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

### 3.5 การศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยา ทดสอบความสามารถ ในการก่อโรค และ ตรวจสอบ พันธุกรรมของเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับแมลงเป้าหมาย (pathogenicity test) ของเชื้อราแต่ละชนิดที่พบ โดยการปลูกเชื้อบน หนอนไหมวัยที่ 1-2 และ ประเมินการเกิดโรคเป็น เปอร์เซ็นต์การก่อโรค เพื่อหาค่าความเป็นพิษที่ทำให้ หนอนไหมตาย โดยหนอนไหมที่นำมาทำการ ทดสอบ เป็นหนอนที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยใบหม่อน และให้มีการขยายพันธุ์จนครบวงจรชีวิตจากรุ่น หนึ่งสู่รุ่นหนึ่ง (generation to generation) ประมาณ 2-3 ชั่ว เพื่อให้แน่ใจว่าเป็นแมลงที่ไม่มีการ ติดเชื้อ (ปลอดโรค) และนำมาทดสอบฟนสารละลายสปอร์ของเชื้อที่ความเข้มข้น  $10^8$ - $10^{10}$  สปอร์ ต่อมิลลิลิตร จำนวน 50 ตัว ต่อช้ำ จำนวน 4 ช้ำ (Poinar and Thomas, 1984, p. 145) เปรียบเทียบกับวิธีการที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) จากนั้น นำหนอนไหมที่ได้รับการทดสอบไปเลี้ยง ต่อในกล่องเลี้ยงแมลงขนาด 10 x 15 x 8 เซนติเมตร โดยมีการให้อาหารเป็นใบหม่อนตามความ เหมาะสม วางกล่องในสภาพอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 20-28 องศาเซลเซียส ) สังเกตอาการของ แมลง และนับจำนวนแมลงที่มีอาการป่วยและเป็นโรค ทุก 24 ชั่วโมง หาเปอร์เซ็นต์การตายของ แมลงที่ทดสอบ โดยนำข้อมูลการตาย มาปรับค่าเป็นค่าการตายที่ถูกต้อง (corrected control mortality) กับ การตายในตัวเปรียบเทียบ โดยใช้ สูตร Abbott's Correction (Abbott, 1925) ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ตายของแมลงที่ทดสอบ

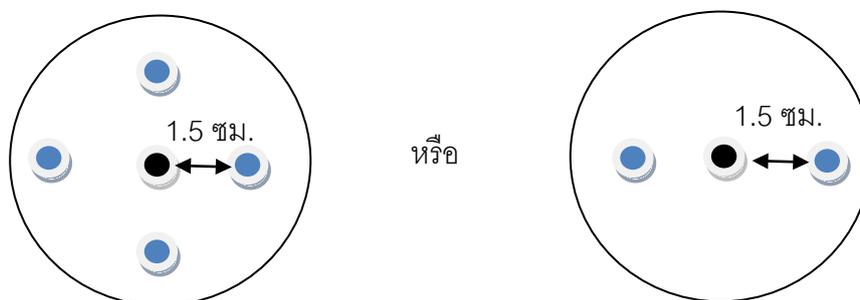
$$= \frac{\% \text{การตายของแมลงที่ได้รับเชื้อ} - \% \text{ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ}}{\% \text{ตายของแมลงที่ไม่ได้รับเชื้อ}} \times 100$$

ศึกษารายละเอียด ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเส้นใย ขนาดและรูปร่าง สปอร์ของ เชื้อที่พบ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDA และ SDA จนเชื้อสร้างโคโคไนด์และสปอร์ นำสปอร์ ไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อศึกษารูปร่างและขนาดสปอร์ ประกอบกับการพิจารณารายละเอียดในเอกสารอ้างอิง รวมทั้งปรึกษาผู้เชี่ยวชาญ เพื่อกำหนด ชนิด และ รวบรวมเป็นข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์

ของเชื้อราแต่ละชนิดไปเตรียมตัวอย่างสปอร์ เพื่อนำไปสกัด DNA โดยนำไปแยกสปอร์เดี่ยวตามวิธีของ Veen's protocol (1967, pp. 276-278) ซึ่งปรับวิธีการโดยเจ็ลจากสารละลายสปอร์เป็น  $10^2$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำมาหยด ลงบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ซึ่งเติมยีสต์สกัด (yeast extract) 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส จากนั้น 2-4 วันนำมาตรวจสอบใ ต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อพบการเจริญของโคโคนี้เดี่ยวซึ่ง เจริญจากสปอร์เดี่ยว ตัดชิ้นวุ้นที่มีโคโคนี้เดี่ยว ดังกล่าว และย้ายไปวางบนผิวอาหาร SDAY โดยมีการแยกไอโซเลท ชลละ 5 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างที่จะนำไปสกัด DNA เพื่อศึกษาลักษณะพันธุกรรมในหลอดที่มีกลีเซอรอล 10 % ตามวิธีของ Humber (1997, pp. 269-279) และ ส่งตัวอย่างเชื้อไปวิเคราะห์ ลักษณะทางพันธุกรรม โดยด้วยวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยวิธี RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNAs) ซึ่งเริ่มจากการแยกโค โคนี้เดี่ยวของเชื้อแต่ละไอโซเลท และเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA และเก็บตัวอย่างสปอร์ของเชื้ออายุ 30 วันมาสกัด genomic DNA ของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ตามวิธีของ Moller *et al.* (1992, pp. 6115-6116) กล่าวคือนำตัวอย่างมาละลายส่วนที่เป็นโปรตีนใน lysis buffer ที่มีเอ็นไซม์ Protease K โดยบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดโดยใช้ chloroform: isoamyl alcohol หรือ isopentyl alcohol ในอัตรา 24:1 โดยทำซ้ำ 3 รอบ นำ DNA ที่ได้ไป centrifuge ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ล้างด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ และปล่อยให้แห้งในสุญญากาศ จากนั้นนำ DNA ที่ได้ไปละลายใน Tris EDTA buffer ปริมาตร 300-500 ไมโครลิตร นำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มจำนวนด้ วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction) เพื่อเพิ่มปริมาณ marker RAPD สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Beauveria* spp. แต่ละไอโซเลทด้วยการใช้ primer OPA3 ตามวิธีของ Castrillo *et al.* (2004 pp. 26-37) และเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ในสภาพ PCR denaturation เริ่มต้น 4 นาที ที่ 95 องศาเซลเซียส โดยใช้สภาพ denaturation 40 วินาที ที่ 94 องศาเซลเซียส annealing 40 นาทีที่ 37 องศาเซลเซียส extension 40 วินาทีที่ 72 องศาเซลเซียส รวมจำนวน 35 cycles และ final extension 4 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส และนำผลผลิต PCR ดำเนินการ electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1.5 % และ ย้อมด้วย ethidium bromide และ ตรวจสอบแถบ DNA ภายใต้แสงอุลตราไวโอเลท

### 3.6 การทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญ (Vegetative compatibility) ในกลุ่มตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญ ในกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเกษตร กร ด้วยวิธีการ complementation tests ระหว่างเชื้อที่เป็น nitrate non-utilizing หรือ (nit) mutants ซึ่งสามารถนำมาทำการจับคู่ผสม บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสภาพที่เหมาะสม และสังเกตการเกิด heterokaryons ซึ่งสังเกตได้จากการเห็นเส้นของเส้นใยตรงบริเวณที่มี การสัมผัสกันของโคโลนีของเชื้อ โดยเริ่มจากการ สร้าง nit mutants โดยนำสารละลายสปอร์ของเชื้อ ซึ่งละลายในน้ำกลั่นไว้ประจุซึ่งหนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (sterile deionized water) ที่มี Tween 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิเมตร และนำมาเกลี่ยลงผิวอาหาร minimal medium (MM) (Bayman and Cotty, 1991, pp. 311-316) ที่มีโปตัสเซียมคลอเรต 5 เปอร์เซ็นต์ (MMCA) และบ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส ) 10 วัน จากนั้น เก็บโคโลนีที่ เจริญ บนอาหารซึ่งนับเป็นเชื้อที่ด้านทานโปตัสเซียมคลอเรต จากนั้นย้ายโคโลนีดังกล่าวสู่อาหาร minimal medium และตรวจหาโคโลนีที่สร้างเฉพาะสปอร์แต่ไม่สร้างเส้นใย ซึ่งเป็น (nit) mutants ทั้งนี้ การกลายที่เกิดขึ้นดังกล่าวเป็นการกลายของระบบการใช้ สารไนเตรท ของเชื้อ ซึ่งส่งผลให้เชื้อที่กลายมีความทนทานต่อพิษของ chlorate โดยการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase จากนั้นทำการทดสอบการเข้ากันได้ของส่วนเจริญ ในกลุ่มของเชื้อราแต่ละชนิด โดยการทดสอบแบบ complementation tests ซึ่งใช้ nit mutants เพื่อดูการสร้าง heterokaryons โดยเริ่มจากการจับคู่โดยเจาะโคโลนีของเชื้อ (nit) mutants ทั้งที่เก็บมาจากแปลงที่ทำการศึกษาและที่มี จำหน่ายเป็นการค้า (inter-isolate pairings) โดยวาง nit M mutant ตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ และวาง nit mutant ไอโซเลทซึ่งที่นำมาจับคู่รอบๆ ให้มีระยะห่างกันประมาณ 1.5 เซนติเมตร (ตามภาพที่ 4.) จากนั้นวางจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ในสภาพอุณหภูมิห้องนาน 1-3 สัปดาห์ ขึ้นกับความ สามารถในการเจริญ ของเชื้อแต่ละไอโซเลท โดยมีการดำเนินการจับคู่ซ้ำอย่างน้อยคู่ละ 3 ครั้ง เมื่อสามารถสังเกตเห็นการเข้ากันได้ของเส้นใยโดยการพบ heterokaryons คือ เป็นการที่พบเส้นใยสัมผัสกันระหว่างสองโคโลนีที่วางบนจานอาหาร นับเป็นกลุ่มเชื้อที่ส่วนเจริญสามารถเข้ากันได้ (vegetative compatible group - VCG) strains ส่วนโคโลนีที่มีการแยกเจริญเติบโตในโซนของตน ถือว่าไม่มีการเข้ากันได้ของส่วนเจริญ นำ VCG. strains มาแยกเชื้อบริสุทธิ์ โดยการทำการแยกสปอร์เดี่ยว และเพาะเลี้ยงบนอาหาร MM plates และ อาหาร PDA เพื่อนำไปทำการทดสอบความสามารถในการก่อโรค และศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยาและพันธุกรรมของเชื้อ ที่ได้จากการผสม ตามวิธีในข้อ 3.2 ในการทดลองในปี 2554



ภาพที่ 4. รูปแบบการจับคู่ (nit) mutants เพื่อศึกษาการเข้ากันได้ของส่วนเจริญของเชื้อราโรคแมลง

### 3.7 การรวบรวมข้อมูลจัดทำเอกสารวิชาการ และการเผยแพร่ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลทั้งหมดที่ได้ เพื่อเผยแพร่ให้กับเกษตรกร กรและผู้สนใจ โดยผ่านทางสื่อต่างๆ เช่น วิทยุ และ โทรทัศน์ รวมทั้ง ระบบออนไลน์ ตลอดจน การสาธิต และ การฝึกอบรม และการนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่ศึกษาในการทดลองนี้ เพื่อใช้ในการรวบรวมทำ DNA barcode กับโครงการ *Fungal Barcode Initiative* under the *Barcode of Life Initiative* under the *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), Smithsonian Institute, Washington, D.C. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานต่อการศึกษาที่เกี่ยวข้องต่อไป

## บทที่ 4 ผลการศึกษา

### 4.1 ผลการสำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง ในระบบนิเวศเกษตร ในแปลงเกษตร และห้องปฏิบัติการ

จากการสำรวจเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงในระบบนิเวศเกษตร แปลงปลูกในเขต จังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง ซึ่งพืชผักที่ปลูกโดยทั่วไปได้แก่ ผักวงศ์กะหล่ำ พริก มะเขือยาว และ มะเขือเปราะ มะเขือเทศ และ พืชวงศ์แตง พบเชื้อราโรคแมลงในอันดับ Deuteromycota: Hyphomycet ที่ทำลายแมลงศัตรูผัก ได้แก่ เชื้อรา *Beauveria* sp. ซึ่งก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผัก *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) (Homoptera: Aphididae) แมลงหิวข้าวยาสูบ *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) และ หนอนของแมลงในอันดับ Lepidoptera โดยพบว่าแมลงที่เป็นโรคตายเกาะนิ่งบนใบพืช และปกคลุม มดด้วยเส้นใยและสปอร์สีขาว นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเชื้อราในตัวอย่างดินในสวนผักด้วย (ตารางที่ 1. ภาพที่ 5.) พบเชื้อรา *Hirsutella* sp. ลงทำลายเพลี้ยอ่อนผัก เพลี้ยจักจั่นมะเขือ และ แมลงหิวข้าวยาสูบ แมลงที่เป็นโรคตายเกาะนิ่งบนใบพืชหรือส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ลำต้น ก้านใบ และผล ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยและ สปอร์สีขาวอมเทา (ตารางที่ 1. ภาพที่ 6.) เชื้อรา *Metarhizium* sp. สามารถตรวจพบได้ใน ตัวอย่างดินในแปลงปลูก ซึ่งใช้หนอนไหมเป็นแมลงเหยื่อ (insect baiting) แมลงที่ได้รับเชื้อนี้จะตายเกาะนิ่งบนใบพืช มีอาการแห้งแข็ง และปกคลุมด้วยสปอร์สีเขียวเข้ม (ตารางที่ 1. ภาพที่ 7.) เชื้อรา *Nomuraea rileyi* พบว่าก่อโรคกับหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) และหนอนผีเสื้อขาว (*Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) โดยแมลงที่ถูกทำลาย ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยสีขาวในระยะแรก และสร้างสปอร์สีเขียวหม่นในระยะ ต่อมา (ตารางที่ 1. ภาพที่ 8.) นอกจากนี้ยังพบเชื้อราในอันดับ Zygomycota: Entomophthorales สองชนิดได้แก่ *Zoophthora aphidis* (ตารางที่ 1. ภาพที่ 9.) พบทำลายเพลี้ยอ่อนผัก โดยเพลี้ยอ่อนที่ตายถูกยึดติดกับใบพืชด้านล่างด้วยเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นเชื้อราสร้างเส้นใยสีขาวมีสปอร์ สีส้มปกคลุม และ *Erynia neoaphidis* ลงทำลายเพลี้ยอ่อนผัก โดยเพลี้ยอ่อนที่ตายถูกยึดติดกับ ใบพืชด้านล่างด้วยเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นเชื้อรา สร้างเมือกสีส้มปกคลุมตัวแมลง (ตารางที่ 1. ภาพที่ 10.)

ตารางที่ 1. เชื้อราโรคแมลงซึ่งพบ บดงทำลายแมลงศัตรูพืชในแปลงปลูกผักที่พบ ในจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง

โรคแมลงที่พบในแปลงปลูกพืชผัก	
เชื้อจุลินทรีย์	แหล่งที่พบเชื้อ
เชื้อรา <i>Beauveria</i> sp.	เพลี้ยอ่อนผัก ( <i>Lipaphis erysimi</i> ) แมลงหมีขาว ( <i>Bemisia tabaci</i> ) หนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera จากตัวอย่างดิน
เชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	จากตัวอย่างดินในแปลงปลูก
เชื้อรา <i>Hirsutella</i> sp.	จากเพลี้ยจักจั่น แมลงหมีขาวยาสูบ และ เพลี้ยอ่อน
เชื้อรา <i>Nomuraea rileyi</i>	หนอนคืบกะหล่ำ ( <i>Trichoplusia ni</i> ) และ หนอนกะหล่ำเล็ก ( <i>Pieris rapae</i> )
เชื้อรา <i>Erynia neoaphidis</i>	เพลี้ยอ่อนผัก ( <i>Lipaphis erysimi</i> )
เชื้อรา <i>Erynia neoaphidis</i>	เพลี้ยอ่อนผัก ( <i>Lipaphis erysimi</i> )



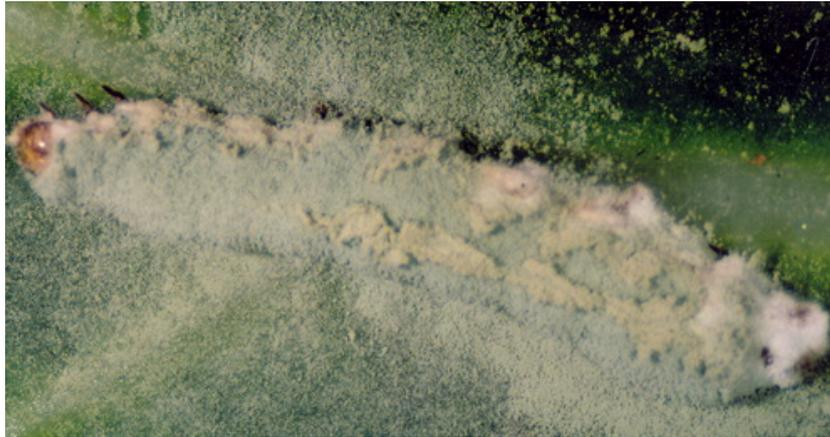
ภาพที่ 5. เพลี้ยอ่อนผัก (ซ้าย) และ แมลงหวี่ขาว (ขวา) ซึ่งถูกเชื้อรา *Beauveria* sp. ลงทำลาย



ภาพที่ 6 เพลี้ยจักจั่นซึ่งถูกเชื้อรา *Hirsutella* sp. ลงทำลาย



ภาพที่ 7. หนอนไหมซึ่งถูกเชื้อรา *Metarhizium* sp. ลงทำลาย



ภาพที่ 8. หนอนกะหล่ำซึ่งถูกเชื้อรา *Nomuraea rileyi* ลงทำลาย



ภาพที่ 9. เพลี้ยอ่อนผักซึ่งถูกเชื้อรา *Erynia neophidis* ลงทำลาย

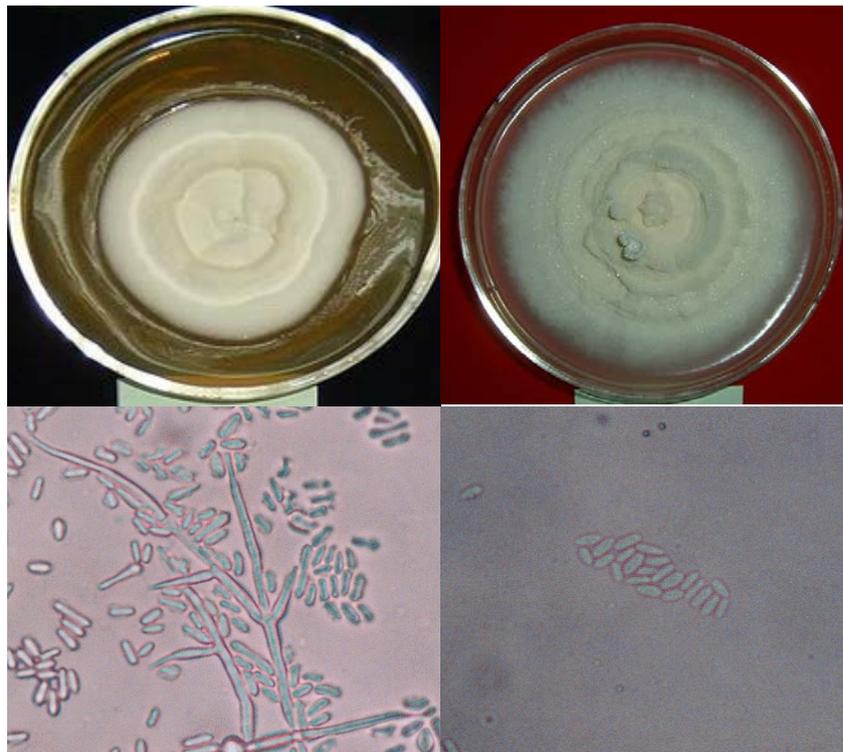


ภาพที่ 10. เพลี้ยอ่อนผักถูกเชื้อรา *Zoophthora aphidis* ลงทำลาย

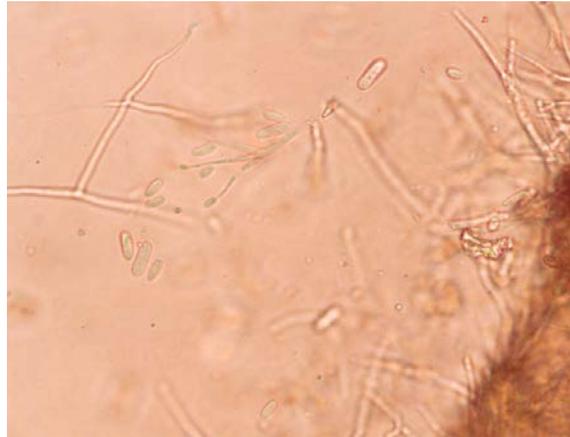
#### 4.2 ผลการศึกษาลักษณะ สันฐานวิทยา ทดสอบความสามารถ ในการก่อโรค และ ตรวจสอบพันธุกรรม ของเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ

จากการศึกษาลักษณะสันฐานวิทยาของเชื้อราโรคแมลงที่พบในแปลงปลูก พืชผัก ซึ่งเก็บได้ในจังหวัดเชียงใหม่ โดยการตรวจสอบจากตัวอย่างแมลงที่ได้รับเชื้อ หากไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียม หรือ ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และนำมาเพาะเลี้ยง หากเชื้อชนิดใดสามารถเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้ เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของโคโค ลินี และ สปอร์ พบว่า เชื้อรา *Beauveria* sp. ซึ่งเก็บตัวอย่างได้จาก เพลี้ยอ่อนผัก แมลงหวี่ขาว และ ตัวอย่างดินในแปลงผัก เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะในเอกสารอ้างอิงที่ใช้แล้ว คือ *B. bassiana* ซึ่งมีลักษณะเส้นใยที่เจริญได้ดีบนอาหาร PDA และ SDA มีโคลินีสีขาว สร้างกลุ่มสปอร์สีขาวในเวลา 7-10 วัน เมื่อนำมาตรวจ ใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน ใส มีการสร้าง ก้านชูออสปอร์บริเวณปลายเส้นใย สร้างสปอร์บนส่วนปลายของก้านชู เป็นกลุ่มหรือแบบเดี่ยว ใส รูปร่างค่อนข้างกลม รูปไข่ ขนาดเล็กมาก ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางกลาง 2.3 -3.4 ไมโครเมตร (ภาพที่ 11.) เชื้อรา *Hirsutella* sp. พบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ในอาหาร PDA แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาลักษณะสปอร์ที่ผลิตขึ้น บนตัวแมลง ซึ่งเก็บ ตัวอย่างจากแปลงใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน ใส มีการสร้างก้านชูออสปอร์ ซึ่งมีฐานกลมปลายแคบตอ ปลายบริเวณปลายเส้นใย สปอร์ใส มีผนังกัน รูปร่างกลมแบบผลส้ม หรือ รีแบบแคบซูล หัวและท้ายมน สร้างเป็นกลุ่ม หรือ เดี่ยวบนก้านชูออสปอร์ โดยสปอร์มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.1- 4.2 ไมโครเมตร (ภาพที่ 12.) เชื้อรา *Metarhizium* sp. เป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โคลินีของเชื้อมีสีขาวในระยะแรก และ เริ่มมีการสร้างกลุ่มสปอร์สีเขียวเข้ม เมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน ใส มีการสร้าง ก้านชูออสปอร์บริเวณปลายเส้นใย สปอร์ของเชื้อใส รูปร่างแบบกระบอก หัวและท้ายมน ขนาดยาว 7.5-8.6 ไมโครเมตร ความกว้างเป็นหนึ่งในสามของความยาว สร้างเป็นกลุ่มเป็นฐานรอง ซึ่งมีลักษณะเป็นช่อ ซึ่งในบางกรณีที่สปอร์ หลุดออกจากก้านชู จะมีการเรียงตัวกันคล้ายโซ่ ซึ่งตรงกับ ลักษณะของเชื้อรา *M. anisopliae* (ภาพที่ 13.) เชื้อรา *Nomuraea* sp. สามารถเจริญ และ สร้าง สปอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แต่มีการเจริญที่ช้ามาก รวมทั้งพบปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อรา ชนิดอื่น ดังนั้นในการศึกษาลักษณะของสปอร์ของเชื้อ ราจึงได้มีการตรวจสอบจากตัวอย่างแมลงที่ ติดเชื้อซึ่งเก็บตัวอย่างได้จากแปลงผัก และพบว่าเส้น ใยเป็นแบบมีผนังกัน ใส มีการสร้างก้านชูออสปอร์ ซึ่งมีรูปร่างค่อนข้าง สั้น สร้างสปอร์หนึ่งสปอร์ต่อก้านบริเวณปลาย สปอร์รูปกลม ใส ไม่มี ผนังกัน ขนาด 3.1-4.5 ไมโครเมตร เส้นใยมีลักษณะ ซึ่งตรงกับลักษณะของ *N. lileyi* (ภาพที่ 14.) ส่วนเชื้อราในอันดับ Zygomycota: Entomophthorales ซึ่งเป็นเชื้อราอันดับสำคัญ ซึ่งก่อโรคกับ

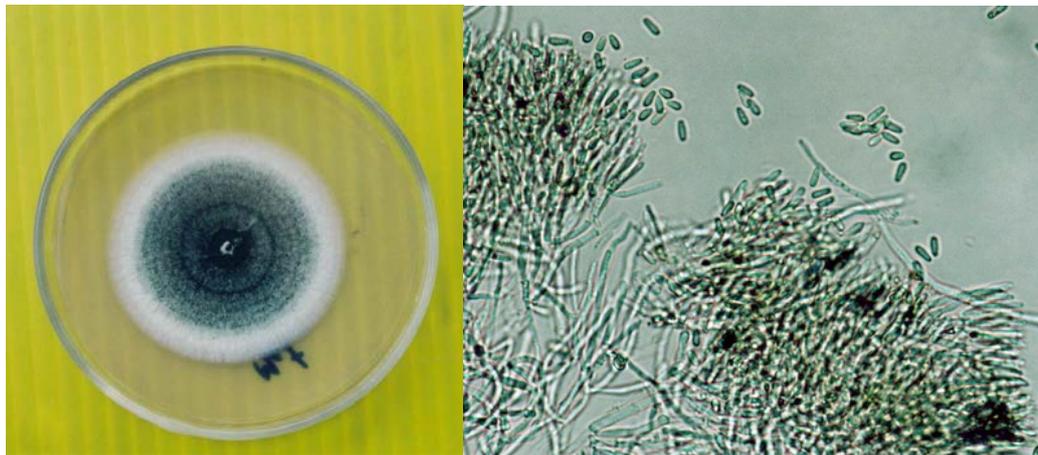
แมลงหลายชนิด โดยในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อครั้งนี้ ไม่สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ หรือ เพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ได้ เนื่องจากในการแยกเชื้อ ราดังกล่าว ต้องมีการใช้วิธีการจำเพาะ ซึ่งอยู่นอกเหนือจากข่างานการศึกษาครั้งนี้ และ จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาได้กล้องจุลทรรศน์ เส้นใยเป็นแบบมีผนังกัน ใส มีการสร้างก้านชูไฮ สปอร์บริเวณปลายเส้นใย ส่วนสปอร์ของเชื้อรา *Erynia neoaphidis* ซึ่งเส้นใยมีรูปร่างเป็นแท่ง หรือแบบเส้น และแตกสาขาเป็นก้านชูไฮสปอร์ สปอร์ใส มีรูปร่างแบบกรวยเหลี่ยมถึงแบบยาวและหัวท้ายมน หรือรูปกลมรี และคล้ายผลมะนาว มีขนาดตั้งแต่ 29-75 x 13-14.5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 15.) ส่วนเชื้อรา *Zoophthora aphidis* เส้นใยมีผนังกัน รูปร่างเป็นแท่งเรียงต่อกัน และ แตกสายเป็นก้านชูไฮ สปอร์ สปอร์ใส มีรูปร่างตั้งแต่แบบก ระบอง หรือ แบบกระบอกหัวท้ายมน มีผนังหนา สามารถมองเห็นนิวเคลียสภายในได้อย่างชัดเจน มีขนาด 3.5-3.8 x 14.5-29.6 ไมโครเมตร (ภาพที่ 16.)



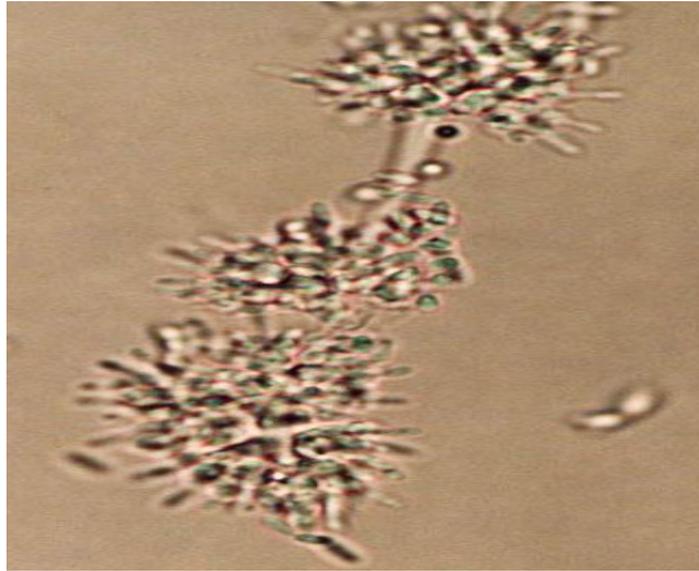
ภาพที่ 11 ลักษณะโคโลนี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (บนซ้าย) PDA (บนขวา) และสปอร์ (ล่าง) ของเชื้อรา *Beauveria bassiana*



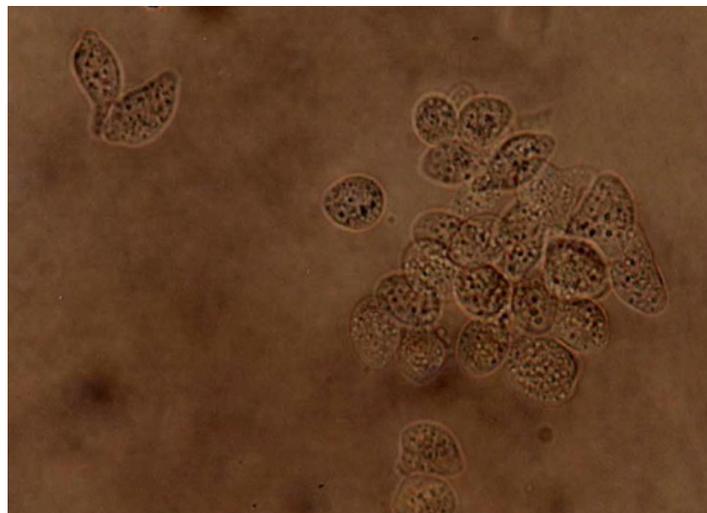
ภาพที่ 12. ลักษณะโคโคไณ (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) ของเชื้อรา *Hirsutella* sp.



ภาพที่ 13. ลักษณะโคโคไณ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (ซ้าย) และสปอร์ (ขวา) ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae*



ภาพที่ 14. ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Nomuraea rileyi* ที่พบบนหนอนคืบกะหล่ำ



ภาพที่ 15. ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Erynia neoaphidis* ซึ่งพบบนตัวเพลี้ยอ่อนผัก



ภาพที่ 16. ลักษณะสปอร์ของเชื้อรา *Zoophthora aphidis* ซึ่งพบบนตัวเพลี้ยอ่อนผัก

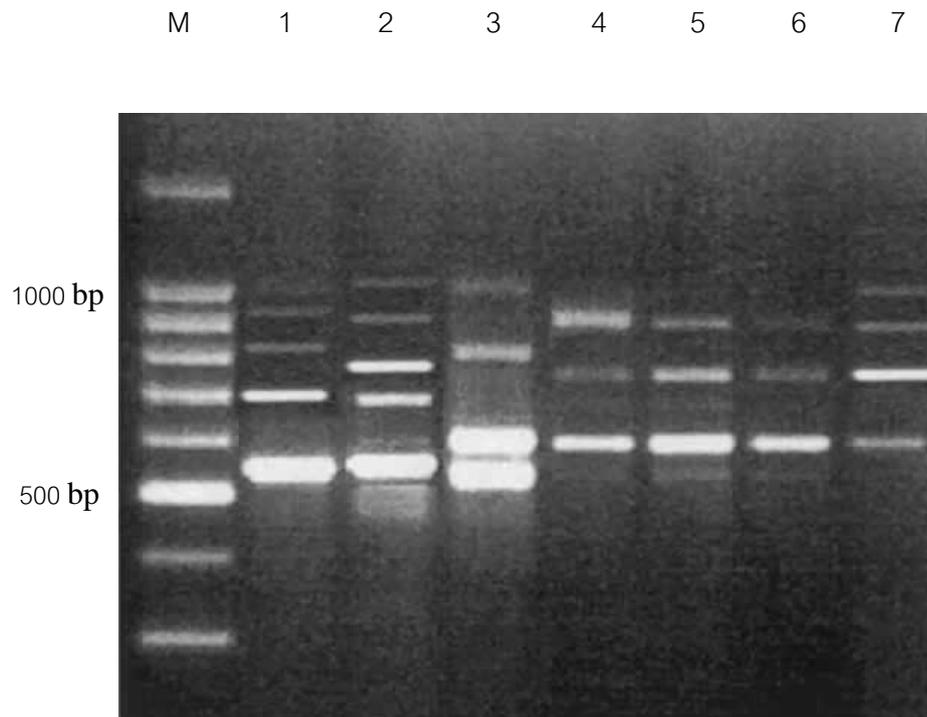
การทดสอบความสามารถของเชื้อราโรคพืชในการก่อโรคกับ แมลงเป้าหมายซึ่งในที่นี้คือ หนอนไหม (*Bombyx mori*) ซึ่งในการศึกษาคั้งนี้ พบว่ามีเพียงเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* เท่านั้น ที่สามารถนำมาเพิ่มปริมาณได้เพียงพอต่อการนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรค ก่อนการนำไปทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญ และ พบว่าหลังได้รับเชื้อนาน 5 วัน *B. bassiana* จากเพลี้ยอ่อน แมลงหวีขาว ตัวอย่างดินในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และ จาก หนอนผีเสื้อ และ สุตรสำเร็จ สามารถก่อโรคแก่หนอนไหมเป็น  $31.12 \pm 2.45$ ,  $43.82 \pm 3.41$ ,  $30.6 \pm 5.89$ ,  $46.75 \pm 3.32$ ,  $38.12 \pm 1.54$ ,  $42.42 \pm 1.77$  และ  $45.40 \pm 4.14$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 7 เปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นเป็น  $62.02 \pm 2.93$ ,  $72.50 \pm 2.46$ ,  $58.17 \pm 4.16$ ,  $71.92 \pm 2.16$ ,  $50.0 \pm 1.77$ ,  $65.42 \pm 1.78$  และ  $66.20 \pm 11.17$  และ ในวันที่ 10 เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไหม เพิ่มขึ้นเป็น  $71.35 \pm 2.62$ ,  $81.45 \pm 2.0$ ,  $68.27 \pm 2.42$ ,  $80.47 \pm 2.43$ ,  $61.3 \pm 2.06$ ,  $74.32 \pm 3.61$  และ  $72.70 \pm 3.42$  ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งแยกได้มาจากตัวอย่าง ดินในจังหวัด เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง และ จากเชียงใหม่จุดที่สอง และ ที่มีการใช้ประโยชน์ในรูปยาเชื้อ มีความสามารถในการก่อโรค กับหนอนไหมหลังได้รับเชื้อ 5 วัน  $39.1 \pm 1.4$ ,  $52.9 \pm 72.22$ ,  $46.70 \pm 1.12$ ,  $51.00 \pm 0.96$  และ  $49.02 \pm 6.33$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในวันที่ 7 การตายของหนอนไหมเพิ่มขึ้นเป็น  $68.82 \pm 0.99$ ,  $77.07 \pm 1.47$ ,  $65.97 \pm 1.43$ ,  $74.92 \pm 1.63$  และ  $70.10 \pm 6.69$  และ ในวันที่ 10 มีเปอร์เซ็นต์การตายเป็น  $80.62 \pm 1.60$ ,  $87.40 \pm 1.56$ ,  $72.72 \pm 1.94$ ,  $81.07 \pm 1.44$  และ  $76.90 \pm 7.50$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2.) จากนั้น เมื่อนำไป วิเคราะห์ลักษณะทาง พันธุกรรมตรวจสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยวิธี RAPD-PCR ด้วยการใส่

primer ที่เหมาะสม พบว่าเชื้อรา *Beauveria* sp. ที่เก็บตัวอย่างและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด ในการศึกษาครั้งนี้ มีลักษณะพันธุกรรมเดียว กันกับเชื้อรา *B. bassiana* โดยพบว่า ผลผลิต RAPD-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *B. bassiana* แสดงให้เห็นว่า *B. bassiana* ที่แยกได้จากเพลี้ยอ่อนผัก มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อ *B. bassiana* ที่แยกได้จากแมลงหิวข้าวยาสูบ และ *B. bassiana* ที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera สูตรสำเร็จ และ ตัวอย่างดินที่แยกได้จากแปลงผักในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง มีลักษณะพันธุกรรมเดียวกัน (ภาพที่ 17.) ส่วนเชื้อรา *Metarhizium* sp. ที่เก็บตัวอย่างและสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ ที่พบมีลักษณะทางพันธุกรรมตรงกับเชื้อรา *M. anisopliae* (ภาพที่ 18.) และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ universal primer ผลชี้ว่ามีลักษณะพันธุกรรมเดียว กันกับยาเชื้อที่ ทดสอบด้วย ส่วนเชื้อราชนิดอื่น ๆ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค และศึกษาพันธุกรรมในระดับโมเลกุลได้ เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ด้วยอาหารเทียมที่มีอยู่ใน การศึกษาครั้งนี้ได้เพียงพอ ถึงระดับที่สามารถนำมาสกัด genomic DNA ตามวิธีการที่ได้มีการกำหนดในการศึกษาครั้งนี้

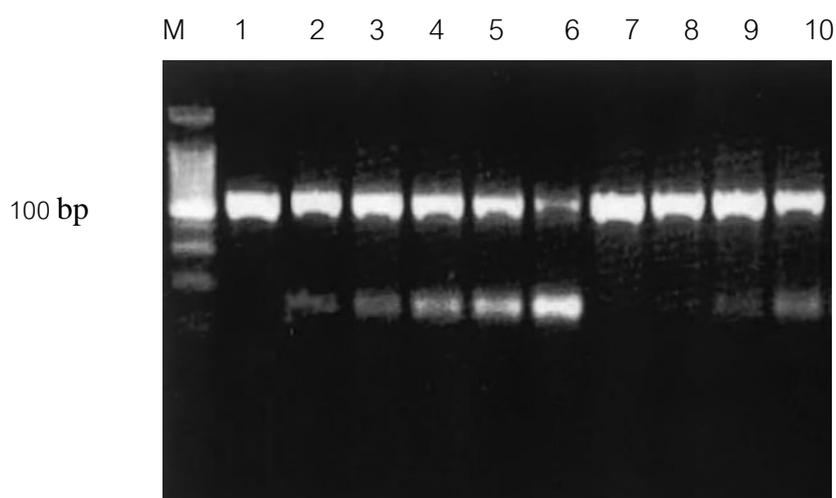
ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับหนอนไหมของเชื้อรา *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* ที่ระดับความเข้มข้น  $10^8$  สปอร์ต่อ มิลลิลิตร ในห้องปฏิบัติการ

ไอโซเลทซ์ของเชื้อราโรค แมลง	ระยะเวลาหลังการได้รับเชื้อ (วัน)		
	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 10
<i>Beauveria</i> sp. จากเพลี้ย อ่อน	31.12 ± 2.45	62.02 ± 2.93	71.35 ± 2.62
<i>Beauveria</i> sp. จากแมลง หิวข้าว	43.82 ± 3.41	72.50 ± 2.46	81.45 ± 2.00
<i>Beauveria</i> sp. จากดินที่ ในจังหวัดเชียงใหม่	30.6 ± 5.89	58.17 ± 4.16	68.27 ± 2.42
<i>Beauveria</i> sp. จากดินใน จังหวัดลำพูน	46.75 ± 3.32	71.92 ± 2.16	80.47 ± 2.43
<i>Beauveria</i> sp. จากดินใน จังหวัดลำปาง	38.12 ± 1.54	50.0 ± 1.77	61.3 ± 2.06
<i>Beauveria</i> sp. จากหนอน ผีเสื้อ	42.42 ± 1.77	65.42 ± 1.78	74.32 ± 3.61
<i>Metarhizium</i> sp. จากดิน ในจังหวัดเชียงใหม่	39.1 ± 1.43	68.82 ± 0.99	80.62 ± 1.60
<i>Metarhizium</i> sp. จากดิน ในจังหวัดลำพูน	52.97 ± 2.22	77.07 ± 1.47	87.40 ± 1.56
<i>Metarhizium</i> sp. จากดิน ในจังหวัดลำปาง	46.70 ± 1.12	65.97 ± 1.43	72.72 ± 1.94
<i>Metarhizium</i> sp. จากดิน ในจังหวัดเชียงใหม่จุดที่ 2	51.00 ± 0.96	74.92 ± 1.63	81.07 ± 1.44
<i>Beauveria</i> sp. สูตรสำเร็จ	45.40 ± 4.14	66.20 ± 11.17	72.70 ± 3.42
<i>Metarhizium</i> sp. ในรูปยา เชื้อที่มีการนำมาใช้	49.02 ± 6.33	70.10 ± 6.69	76.90 ± 7.50

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดสอบ 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)



ภาพที่ 17 ผลผลิต RAPD-PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *Beauveria bassiana* (M) 1 และ พันธุกรรมของ *B. bassiana* ที่แยกได้จากเพลี้ยอ่อน ผัก (1) แมลงหวี่ขาวยาสูบ (2) หนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera (3) สูตรสำเร็จ (4) และ ตัวอย่างดินที่แยกได้จากแปลงผักในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง ตามลำดับ (5-7)



ภาพที่ 18. ผลผลิต PCR จากการใช้ universal primer ในการตรวจสอบพันธุกรรม ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เลนที่ 1-2, 3-4, 5-6, 7-8 และ 9-10 คือตัวอย่างที่เก็บจากดินจุดที่ 1, 2, 3, 4 และ สูตรสำเร็จ ตามลำดับ

#### 4.3 การทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญ (Vegetative compatibility) ในกลุ่มตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญในกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเกษตร ด้วยวิธีการ complementation tests ระหว่างเชื้อราที่เป็น nitrate non-utilizing (nit) mutants และการจับคู่ผสม บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เหมาะสม และ คัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะการเข้ากันได้คือเกิด heterokaryons ซึ่งสังเกตได้จากการเห็นเส้นของเส้นใย ตรงบริเวณที่มีการสัมผัสกันของโคโลนีของเชื้อพบว่า *B. bassiana* เป็น VCG จำนวน 3 จาก 9 ไอโซเลทส์ โดยจากการ จับคู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Minimum Medium เชื้อราที่มีการเจริญผสมเส้นใยดังแสดงในภาพที่ 19 ข. และส่วนที่ไม่สามารถผสมได้ โคโลนีของเชื้อจะเจริญแยกกันดังแสดงใน ภาพที่ 19 ค. หรือบางเชื้อไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ดังแสดงใน ภาพที่ 19 ก. ส่วนเชื้อรา *M. anisopliae* ยังไม่พบไอโซเลทส์ที่ส่วนเจริญสามารถผสมรวมกันได้ ซึ่งจะมีการดำเนินการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ เพื่อการทดสอบความสามารถของการก่อโรค และการศึกษาลักษณะพันธุกรรมที่อาจเปลี่ยนแปลงไป รวมทั้งความคงที่ของลักษณะพันธุกรรม ที่อาจเปลี่ยนแปลงต่อไป



ก.

ข.

ค.

ภาพที่ 19. โคโลนีของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เจริญบนอาหาร MM ซึ่งไม่สามารถเจริญบนอาหารได้ เมื่อนำมาผสม (ก.) ที่มีการผสมกันของหน่วยเส้นใย หรือ เส้นใยที่เข้ากันได้ (VCG) (ข.) และ ที่หน่วยเส้นใยที่เข้ากันไม่ได้ (ค.)

## บทที่ 5

### สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ผลการสำรวจ และจำแนกชนิดของเชื้อราสาเหตุโรคของ แมลง ในระบบนิเวศเกษตรในแปลงเกษตรกร ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง และ ห้องปฏิบัติการ โดยเน้นการศึกษาในแปลงพืชผักที่ปลูกโดยทั่วไปได้แก่ ผักวงศ์กะหล่ำ พริก มะเขือยาว และ มะเขือเปราะ มะเขือเทศ และ พืชวงศ์แตง พบเชื้อราโรคแมลงหลายชนิดคอยควบคุมปริมาณประชากรของแมลงศัตรูพืชผักได้แก่ เชื้อรา *Beauveria* sp. ซึ่งก่อโรคกับเพลี้ยอ่อนผัก (*Lipaphis erysimi* (Kaltenbach) (Homoptera: Aphididae) แมลงหิวข้าวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) และหนอนของแมลงในอันดับ Lepidoptera เชื้อรา *Hirsutella* sp. พบทำลายเพลี้ยอ่อนผัก เพลี้ยจักจั่นมะเขือ และ แมลงหิวข้าวยาสูบ เชื้อรา *Metarhizium* sp. สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างดินในแปลงปลูก เชื้อรา *Nomurea rileyi* พบว่าก่อโรคกับหนอนคืบกะหล่ำ (*Trichoplusia ni* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) และหนอนผีเสื้อขาว (*Pieris rapae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) อีกทั้งยังพบเชื้อราในอันดับ Zygomycota: Entomophthorales สองชนิดได้แก่ *Zoophthora aphidis* และ *Erynia neoaphidis* ทำลายเพลี้ยอ่อนศัตรูผักหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในแปลงที่มีการปลูกพืชผักแบบผสมผสาน ซึ่งผลการศึกษานี้ ชี้ให้เห็นว่าในสภาพแปลงปลูกพืชผักในจังหวัด ทางภาคเหนือของประเทศไทย มีความหลากหลายทางชนิดของเชื้อราโรคแมลงในระดับสูง และมีหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้อย่างปลอดภัยในรูปแบบยาเชื้อ (Stephen, 2005; Copping, 2009) และ จากการศึกษาลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา การทดสอบความสามารถ ในการก่อโรคและ การตรวจสอบพันธุกรรม ของเชื้อราโรคแมลงในห้องปฏิบัติการ พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* และ *Metarhizium* sp. เป็นเชื้อราโรคแมลงที่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ ในอาหารเทียมพื้นฐานที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งได้แก่ PDA และ SDA ในปริมาณที่เพียงพอต่อการนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค และการนำมาสกัด DNA จึงทำให้สามารถศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อดังกล่าวได้อย่างละเอียด ทั้งในกรณีที่พบบนตัวแมลงและที่เพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ส่วน เชื้อรา *Hirsutella* sp. ถึงแม้จะพบว่าเส้นใยสามารถเจริญได้ในอาหาร PDA แต่ไม่พบการสร้างสปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นจึงสามารถศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อได้ จากส่วนที่เจริญบนแมลงตัวอาศัย เช่นเดียวกับเชื้อราโรคแมลง เชื้อรา *Nomurea* sp. และ เชื้อราในอันดับ Zygomycota: Entomophthorales ซึ่ง

ได้แก่เชื้อรา *Erynia neopahidis* และ *Zoophthora aphidis* โดยในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* เป็นเชื้อราที่มีความถี่ของการพบในธรรมชาติสูงที่สุด ส่วนเชื้อรา *Metarhizium* sp. นับเป็นเชื้อราอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ง่าย โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานได้แก่ PDA แต่อย่างไรก็ตาม ความถี่ในการพบเชื้อดังกล่าวมีน้อยกว่า *B. bassiana* ทั้งนี้ *Metarhizium* sp. ที่เก็บตัวอย่าง และสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมตรงกับเชื้อรา *M. anisopliae* (ภาพที่ 18.) และเมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA โดยใช้ universal primer ผลชี้ว่ามีลักษณะพันธุกรรมเดียวกันกับยาเชื้อที่ทดสอบด้วย ส่วนเชื้อราชนิดอื่นๆ ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถนำมาทดสอบความสามารถในการก่อโรค และศึกษาพันธุกรรมในระดับโมเลกุลได้ เนื่องจากในการศึกษา ไม่สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้เพียงพอ ถึงระดับที่สามารถนำมาสกัด genomic DNA ได้ ส่วนการทดสอบความเข้ากันได้ของส่วนเจริญ (Vegetative compatibility) ในกลุ่มตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ ในกลุ่มตัวอย่างที่เก็บจากแปลงเกษตร ด้วยวิธีการ complementation tests ระหว่างเชื้อราที่เป็น nitrate non-utilizing (nit) mutants และการจับคู่ผสม บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เหมาะสม และคัดเลือกเชื้อราที่มีลักษณะการเข้ากันได้ คือ เกิด heterokaryons ซึ่งสังเกตได้จากการเห็นเส้นของเส้นใย ตรงบริเวณที่มีการสัมผัสกันของโคโลนีของเชื้อ พบว่า *B. bassiana* เป็นเชื้อราโรคแมลงที่มีแนวโน้มการเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมหรือ เป็น VCG จำนวน 3 จาก 9 ไอโซเลทส์ ทั้งนี้เชื้อรา *M. anisopliae* ยังไม่พบไอโซเลท ที่ส่วนเจริญสามารถผสมรวมกันได้

การทดสอบความสามารถของเชื้อราโรคพืชในการก่อโรคกับแมลงเป้าหมาย ซึ่งในที่นี้คือ หนอนไหม (*Bombyx mori*) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีเพียงเชื้อรา *B. bassiana* และ *M. anisopliae* หลังได้รับเชื่อนาน 5, 7 และ 10 วัน เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนไหมที่ทดสอบ มีการเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ และ ระดับเปอร์เซ็นต์การทำลาย ไม่มีความแตกต่างกันมาก (ตารางที่ .) เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลักษณะทางพันธุกรรมตรวจสอบลายพิมพ์ ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) ด้วยวิธี RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA-3 ของเชื้อรา *B. bassiana* แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่แยกได้จากเพลี้ยอ่อนฝัก มีพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อ *B. bassiana* ที่แยกได้จากแมลงหวี่ขาวยาสูบ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อดังกล่าวเป็นเชื้อราสายพันธุ์เดียวกัน และในอีกด้านหนึ่งคือแมลงทั้งสองชนิดเป็นแมลงในอันดับเดียวกันคืออันดับ Homoptera ในเรื่องนี้ ได้มีรายงานการศึกษาชี้ว่า ความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อราโรคแมลงขึ้นอยู่กับพื้นที่ซึ่งพบเชื้อราชนิดนั้นๆ (pathogenic ecotype หรือ geographical isolate) รูปแบบของพันธุกรรม และ พิสัยของแมลงที่เป็นตัวอาศัย (insect host range) ของเชื้อ (Brad *et al.*, 2002, pp. 125-132; Devi *et al.*, 2006, pp. 495-504;

Neuveglise *et al.*, 1994, pp. 322-328) ส่วนกลุ่มที่สองคือ *B. bassiana* ที่แยกได้จากหนอนผีเสื้อในอันดับ Lepidoptera สูตรสำเร็จ และ ตัวอย่างดินที่แยกได้จากแปลงผักในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และ ลำปาง มีลักษณะพันธุกรรม ใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 17.) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ น่าจะยังให้ผลไม่ชัดเจนนัก เนื่องจาก มีการใช้ไพรเมอร์เพียงหนึ่งชนิด คือ POA-3 เท่านั้น ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอในการยืนยันความเกี่ยวข้องทางพันธุกรรมของเชื้อ ราตัวอย่าง ได้อย่างหนักแน่น เนื่องจากในระยะเริ่มต้นของการศึกษาได้มุ่งเน้นศึกษาชนิดของเชื้อราโรคแมลง ที่พบในระบบนิเวศแปลงผัก เพื่อทราบชนิด และความหลากหลายของเชื้อราโรคแมลง ในสภาพธรรมชาติ อีกทั้งเป็นการคัดเลือกเชื้อราที่เหมาะสม และมีความเป็นไปได้ ในการนำมาวิเคราะห์การแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรม นอกจากนั้น ข้อมูลจากผลการศึกษาล่าสุดนี้ น่าจะเป็นประโยชน์อย่างมาก ในการศึกษาต่อยอด ในการนำเชื้อราเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืชอย่างยั่งยืน รวมทั้งการพิจารณาวิธีการอนุรักษ์ให้เชื้อ ราที่มีประโยชน์เหล่านี้ คงอยู่ในธรรมชาติในระดับประชากรที่เหมาะสมได้ ดังนั้นจากผลการศึกษาล่าสุดนี้ ทำให้คณะผู้วิจัยมีข้อมูลสนับสนุนการตัดสินใจคัดเลือกศึกษารายการแลกเปลี่ยนทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* เนื่องจากมีความถี่ของการพบสูง และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ ในระดับที่เพียงพอต่อการนำไปขยายผลการศึกษา ทั้งด้านการทดสอบความสามารถในการก่อโรค และ การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังมีรายงานชี้ว่า เชื้อราดังกล่าวมีความหลากหลาย และ มีความแปรปรวนทางพันธุกรรมในระดับสูง (Corell *et al.*, 1987, pp.1640-1646; Devi *et al.*, 2006, pp. 495-504; Hadapad *et al.*, 2006, pp. 71-76) จึงควรมีการศึกษาแนวโน้มการเกิดกา รแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของเชื้อ ราชนิดนี้ โดยเฉพาะในประเทศไทย ซึ่งอาจมีผลต่อ ความหลากหลายทางชีวภาพ รวมทั้ง การนำสายพันธุ์ท้องถิ่นมาใช้ประโยชน์ในอนาคต โดยในการศึกษาในปีที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยได้ใช้ตัวชี้วัดทางโมเลกุล (Molecular marker) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD – PCR) ซึ่งเป็นการตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอซึ่ง มีการทำให้เพิ่มปริมาณโดยปฏิกิริยา PCR แบบสุ่ม โดยทำให้สารพันธุกรรมจำลองตัวเองได้ในหลอดทดลอง ที่มีองค์ประกอบสำคัญคือ เอนไซม์จำลองตัวชนิดทนความร้อน (Taq DNA polymerase) สารพันธุกรรมต้นแบบ (DNA template) ไพรเมอร์ และ องค์ประกอบย่อยของดีเอ็นเอ (deoxynucleotide; dNTPs) โดยอาศัยหลักการ ที่ชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้ เป็นรหัสเริ่มต้นมีขนาดที่สั้น (ประมาณ 10 เบส) สามารถเข้าคู่กับสารพันธุกรรมต้นแบบ ได้หลายตำแหน่งแบบสุ่ม หากการเข้าคู่นั้น เกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสม จะทำให้เกิดการจำลองตัวของชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ ได้ก่อให้เกิดความแตกต่าง ในความสามารถของการเกิดการจำลองตัว และ ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกจำลองตัว ดังนั้นในการศึกษา

ต่อๆไปในปีต่อไป คณะผู้ศึกษาจะมีการใช้ไพรเมอร์อื่นๆเพิ่มเติม สำหรับ RAPD-DNA เพิ่มเติมโดยขึ้นอยู่กับงบประมาณ และ ความสามารถในการจัดหาไพรเมอร์ที่เกี่ยวข้อง ดังในรายงานของ Castrillo *et al.* (2004 pp. 26-37) เช่น POA-8, POA-10, POA-1, POB-07, POC-9 และ POC-10 เป็นต้น ในอีกทางหนึ่ง อาจมีการสังเคราะห์ไพรเมอร์จากตัวอย่างเชื้อที่รวบรวมได้ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อการจำแนกชนิดของเชื้อรา *B. bassiana* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย หนึ่งในส่วนของวิธีการ หรือ marker ที่ใช้ศึกษาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* คณะผู้ศึกษาพบว่า นอกจาก RAPD-PCR แล้ว marker ที่สามารถใช้จำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราโรคมะเร็ง ได้ดี อีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ และ คณะผู้วิจัยคาดว่า อาจนำมาใช้ในการจำแนกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ในการศึกษาครั้งนี้ได้ซึ่งได้แก่ วิธีการ RFLP (restriction fragment length polymorphism - RFLP) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ตัวตรวจสอบ (probe) ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบส และมีความสามารถในการเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็น คู่สม ร่วมกับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยอาศัยหลักการการเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ คู่สม (DNA hybridization) ความแตกต่างที่ตรวจพบแสดงถึงความหลากหลายของตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบนจีโนมนั้นๆ ทั้งนี้ RFLP เป็นวิธีที่คณะผู้เชี่ยวชาญทางด้านดีเอ็นเอเทคโนโลยี ซึ่งให้ความอนุเคราะห์ให้คำแนะนำในการวิจัยครั้งนี้ จากห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี ให้ความเห็นว่าเป็น molecular marker ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูง มากกว่า RAPD อีกทั้งผลจากการใช้ RFLP มีความสะดวกต่อการนำไป แสดงผลเป็นความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (Genetic distance) และ แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) ตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการวัดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของ *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่เก็บรวบรวมตัวอย่างได้จากแมลงอาศัย และ สถานที่ซึ่งแตกต่างกัน รวมทั้งมีระดับความรุนแรงต่างกัน และพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อตัวอย่างได้อย่างชัดเจน (Hadapad *et al.*, 2006, pp. 71-76) ส่วน Devi *et al.*, (2006, pp. 495-504) ได้ใช้ RFLP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมชีววิทยาการขยายพันธุ์ และ ความจำเพาะเจาะจงของเชื้อรา *B. bassiana* และพบว่า molecular marker RFLP ให้ผลชัดเจน ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเห็นว่านอกจากการศึกษาแนวโน้มการเกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมของเชื้อนี้แล้ว หากมีงบประมาณและปัจจัยจำเป็นเพียงพอ อาจมีการศึกษาเปรียบเทียบ ผลการวัดความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อรา

*B. bassiana* สายพันธุ์ในประเทศไทยของ molecular marker ทั้งสองวิธีนี้ โดยพิจารณาข้อดีและข้อเสียทั้งสองชนิดดังที่กล่าวมาข้างต้น เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจศึกษาที่เกี่ยวข้องในอนาคต

## เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

- ข้อมูลด้านการเกษตรและสหกรณ์, ศูนย์. (2552). **สถิติการเกษตร**. [Online].  
Available: <http://www.moac-info.net>, [มกราคม, 2552, 20]
- ข้อฟ้า ทองไทย และ คณะ. (2549). **Biotechnology English-Thai.TSB Dictionary พจนานุกรมเทคโนโลยีชีวภาพ อังกฤษ-ไทย**. กรุงเทพฯ: สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. 107 หน้า.
- มลิวัลย์ บันยารชุน. (2539). การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยเชื้อรา. ใน: **เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, หน้า183 – 197.
- มลิวัลย์ บันยารชุน และ สุรพล จตุรยานนท์. (2526). การศึกษาการพัฒนารผลิตเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* เพื่อใช้ควบคุมด้วงแรดมะพร้าว. **รายงานสรุปผลการค้นคว้าวิจัย**. กรุงเทพฯ: กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- มาลี สุวรรณอัถ์. (2543). ทรัพยากรจุลินทรีย์กับความหลากหลายทางชีวภาพ. **จดหมายข่าวศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ**. 2(1): 5 หน้า.
- วิชาการเกษตร, กรม. (2547). **คำแนะนำการป้องกันกำจัดแมงและสัตว์ศัตรูพืช ปี 2547**. กรุงเทพฯ: ผู้แต่ง.
- วิชาการเกษตร, กรม. (2550). **วงจรชีวิตของเชื้อราโรคแมลง**. [Online].  
Available: <http://www.doa.go.th>. [ตุลาคม, 2550, 28]
- เศรษฐกิจการเกษตร, สำนักงาน.(2552). **การผลิตสินค้าเกษตรที่สำคัญ**. [Online].  
Available: <http://122.154.14.16/main.php?filename=index>, [มกราคม, 2552, 20]
- Bayman, P., Cotty, P.J., (1991). Improved media for selecting nitrate non-utilizing mutants in *Aspergillus flavus*. **Mycologia** 83: 311–316.
- Brad, S., R.L. Hellmich and L.C. Lewis. (2002). Allelic variation of *Beauveria bassiana* (Ascomyota: Hypocreales) minisatellite is dependent of host range and geographic origin. **Genome** 45:125-132.
- Butt, T.M., C.W. Jackson and N. Magan. eds. (2001). **Fungi as biocontrol agent: Progress, problems and potential**. Wallingford: CABI Publishing. 390 pp.

- Castrillo, L.A., M.H. Griggs and J.D. Vandenberg. (2004). Vegetative compatibility groups in indigenous and mass-released strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Likelihood of recombination in the field. **Journal of Invertebrate Pathology** **86**: 26–37.
- Corell, J.C., Klittich, C.J.R. and J.f. Leslie. (1987). Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. **Phytopathology** **77**: 1640–1646.
- Copping, L.G. (2009). 4<sup>th</sup> ed. **The manual of biocontrol agents**. London: British Crop Protection Council (BCPC). 702 pp.
- Couteaudier, Y., M. Viaud, and G. Riba. (1996). Genetic nature, stability and improved virulence of hybrids from protoplast fusion in *Beauveria*. **Microbial Ecology** **3**: 1–10.
- Devi, K. U., A. Reineke, N. N. R. Reddy, C.U.M. Rao and J. Padmavathi. (2006). Genetic diversity, reproductive biology and speciation in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. **Genome** **45**: 495-504.
- Feng, M.G., T.J. Poprawski and G.G. Khachatourians. (1994). Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria brassiana* for insect control: Current status. **Biocontrol Science and Technology** **4**(1): 3-34.
- Gerding-Gonzalez, M., A. France, M.E. Sepulveda and J. Campos. (2007). Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formation. **Biocontrol Science and Technology**, **17**(1/2): 105-110.
- Hadapad A., A. Reineke and C.P.W. Zebitz. (2006). Genetic variability among *Beauveria brongiarthii* (Saccardo) Petch isolates from various geographical and host origins based on AFLP analysis. **Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angw. Ent** **15**: 71-76.
- Humber, R.A. (1997). Fungi: Preservation of cultures p. 269-279. In: **Manual of techniques in insect pathology**. L.A. Lacey, ed.). San Diego: Academic Press.
- Lacey, L.A. ed. (1997). **Manual of techniques in insect pathology**. San Diego: Academic Press.

- McLeod, P. J., D. C. Steinkraus, J. C. Correll and T. E. Morelock. (1998). Prevalence of *Erynia neoaphidis* (Entomophthorales: Entomophthoraceae) infections of green peach aphid (Homoptera: Aphididae) on spinach in Arkansas River Valley. *Environmental Entomology* 27(3): 796-800.
- Moller, E.M. Bahnweg, G. Sandermenn, H., Geiger, H.H. (1992). A simple and efficient protocol for the isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic acids Research* 20: 6115-6116.
- Muehleisen, D.P. (2007). Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* alone and in combination with entomopathogenic nematodes against the larval stage of the carrots rust fly *Psila rosae*. *Organic cropping research for the northwest*. [Online]. Available. <http://www.wsu.edu>. [2 May, 2007].
- Muriel, V., V. Couteaudier and G. Riba. (1998). Molecular analysis of hypervirulent somatic hybrids of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria sulfurescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1): 88-93.
- Neueglise, C., Y. Brygoo, Y., B. Vercambre and G. Riba. (1994). Comparative analysis of molecular and biological characteristics of *Beauveria brongniartii* isolated from insect. *Mycology Records* 98: 322-328.
- Paccola-Meirelles, L. D. and J.L. Azevedo. (1991). Parasexuality in *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 172-176.
- Poinar, G.O. Jr. and G.M. Thomas. (1984). *Laboratory guide to insect pathogens and parasites*. New York: Plenum Press.
- Rehner, S.A. (2005). Phylogenetics of the insect pathogenic genus *Beauveria*. In *Insect-fungal associations: Ecology and evolution*. F.A. Vega and M. Blackwell (eds.). Oxford: Oxford University Press.
- Steinhaus, E. A. (1967). *Principle of insect pathology*. New York : Hafner Publishing.
- Samules, K.D.Z. (1986). *Genetical studies and strain selection in Metarhizium anisopliae* (Metschnikof) Sorokin for the control of *Nilaparvata lugens* (Stal), the brownplanthopper of rice. Unpublished doctoral dissertation. London: London University.

- Tanada, Y. and H.K. Kaya. (1993). **Insect pathology**. San Diego: Academic Press. 666 pp.
- Tinzaara, W., C.S. Gold, M. Dicke, A. V. Huis, C.M. Nankinga, G. H. Kagezi and P.E. Ragama. (2007). The use of aggregation pheromone to enhance dissemination of *Beauveria bassiana* for the control of the banana weevil in Uganda. **Biocontrol Science and Technology** 17(1/2): 111-124.
- Viaud, M., Y. Couteaudier, C. Levis and G. Roba. (1996). Genome organization in *Beauveria bassiana*: electrophoretic karyotype, genemapping, and telomeric fingerprint. **Fungal Genetical Biology** 20:175-183.
- Veen, K.H. (1967). Monospore culture and determination of nucleus numbers. **Journal of Insect Pathology** 9: 276-278.
- Zimmermann, G. (1992). *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer** 45(63): 113-128.
- Zacharuk, R.Y. and R.D. Tinline. (1968). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* and other fungi for five Elaterids (Coleoptera) in Saskatchewan. **Journal of Invertebrate Pathology** 12(2): 304-309.
- Zaid, A., H.G. Hughes, E. Porceddu and F. Nicholas. (2001). **Glossary of biotechnology for food and agriculture**. FAO Research and Technology Paper 9. Rome: FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 305 pp.

**ภาคผนวก**  
**สูตรอาหารเทียมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา**

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

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

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่ น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

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

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

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่ น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

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

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ  
นึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

## 4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB)

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีเตรียมอาหาร ผสมส่วนผสมที่แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อ  
นึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minnimum Medium (MM) แบบเหลว

NaNO	6.0	กรัม
KC1	0.52	กรัม
MgSO4. 7H20	0.25	กรัม
KH2PO4	1.25	กรัม
glucose (dextrose)	10	กรัม
Hutner's trace elements	2	มิลลิลิตร

วิธีเตรียมอาหาร เติม 1 ml of 1 N NaOH เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 6 ผสมส่วนผสมที่  
แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15  
นาที

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Minnimum Medium (MM) แบบแข็ง

NaNO <sub>3</sub>	6.0	กรัม
KC <sub>1</sub>	0.52	กรัม
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> 0	0.25	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25	กรัม
glucose (dextrose)	10	กรัม
Hutner's trace elements	2	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียมอาหาร เติม 1 ml of 1 N NaOH เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เป็น 6 ผสมส่วนผสมที่  
แห้งเข้าด้วยกัน ใส่น้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 221 องศาเซลเซียส นาน 15  
นาที