

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยในโครงการ “สารออกฤทธิ์ฆ่าแมลงจากราเอนโดไฟท์ที่อยู่ร่วมกับพืชในวงศ์ Stemonaceae (Insecticidal compounds from endophytic fungi of Stemonaceae)” จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ในปีงบประมาณ พ.ศ.2552 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณสายวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี และสถาบันพัฒนาและฝึกอบรม โรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรีที่เอื้อเพื่อสถานที่และเครื่องมือสำหรับงานวิจัย รวมทั้ง โรงงานต้นแบบผลิตไวรัสเอ็นพีวีเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีแห่งชาติ ในการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งหนอนกระทู้หอมของสารชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ ในโครงการนี้

ดร. ทวีรัตน์ วิจิตรสุนทรกุล

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

การใช้สารเคมีในการเกษตรแม้ว่าจะสามารถลดการเข้าทำลายของแมลง แต่อาจทำให้เกิดอันตรายแก่คนและสัตว์ได้ การใช้ชีววิธีในการควบคุมแมลงเช่นการใช้สารที่เป็นพิษเฉพาะแมลงจากราเอนโดไฟต์เป็นทางเลือกที่ช่วยลดการใช้สารเคมีในการเกษตรลงได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการคัดเลือกเชื้อราเอนโดไฟต์ในต้นหนอนตายหยากที่ผลิตเมตาโบไลต์ที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ ราเอนโดไฟต์จำนวน 174 ไอโซเลท ซึ่งแยกจากพืชสกุลหนอนตายหยาก (Stemonaceae family) ชนิด (species) ต่าง ๆ (ได้แก่ *Stemona burkillii* *S. colinsae* *S. tuberosa* และ *S. kerrii*) ที่เก็บจาก จังหวัดลำพูน เชียงใหม่ นครราชสีมา ระยอง เลย และชลบุรี เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว modified MID ที่ 28 องศาเซลเซียส, 150 รอบต่อนาที (rpm) นาน 14 วัน แล้วนำมาทดสอบการฆ่าหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) พบว่ามีราเอนโดไฟต์จำนวน 173 ไอโซเลท สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ฆ่าหนอนกระทู้หอม ในจำนวนนี้ 141 ไอโซเลท สามารถยับยั้งหนอนกระทู้หอมต่ำกว่า 50% ภายใน 14 วันของการทดสอบและ 32 ไอโซเลทสามารถยับยั้งหนอนกระทู้หอมสูงกว่า 50% เมื่อนำสารชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟต์ 4 ไอโซเลทในกลุ่มที่สองที่สามารถทำให้หนอนกระทู้หอมตาย 26-30% ภายใน 7 วัน ซึ่งสูงกว่าราเอนโดไฟต์อื่นในกลุ่มเดียวกัน ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดและวิธีระเหิดแห้งพบว่า มีเพียงราเอนโดไฟต์เพียงไอโซเลทเดียวคือ NHL1/16-L1 ที่มีฤทธิ์ในการฆ่าหนอนกระทู้หอม โดยมีร้อยละของการตายของหนอนกระทู้หอมเป็น 67.50 และ 52.5 เมื่อใช้สารสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (Ethyl acetate) เพิ่มมากขึ้น 20 เท่า และสารระเหิดแห้งเพิ่มมากขึ้น 10 เท่า ตามลำดับ เมื่อสกัดเส้นใยของ NHL1/16-L1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง MID นาน 7 และ 14 วันด้วยเอทิลอะซิเตทแล้วนำไปทดสอบ พบว่า สารสกัดสามารถยับยั้งหนอนกระทู้หอม 5 และ 25% ตามลำดับ

คำสำคัญ : ราเอนโดไฟต์, ต้นหนอนตายหยาก, หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*), สารควบคุมแมลง

Abstract

Agrochemicals, although decreasing the attack of insect, could lead to a high risk of human and animal. The use of potential biological processes for insect control (e.g. insect toxin from endophytic fungi) is an alternative that may contribute to reduce chemical products in agriculture. The aim of this work was to isolate and screening for endophytic fungi associated with *Stemonaceae* producing metabolites to control insect-pest. A total of 174 fungal endophytes were isolated from four species of family *Stemonaceae* (i.e. *Stemona burkillii*, *S. collinsae*, *S. tuberos.* and *S. kerrii*), collected from six provinces (i.e. Lumphun, Chiang Mai, Nakornratchasima, Rayong, Loei and Chonburi) in Thailand. Their anti-insect potential was assessed by feeding 2nd-instar *Spodoptera exigua* larva (beet armyworm) in artificial diet amended with culture broth filtrate of endophytic fungi grown in modified MID medium at 28°C, 150 rpm for 14 days. Fermentation broth of 173 endophytic fungi isolates showed insecticidal activity. Bioactive compounds from 141 fungal isolates caused less than 50% mortality in *S. exigua* larva while the other 32 isolates showed percent mortality in a range of 50-80% in 14 days relative to control (0% mortality). To increase efficiency of insecticidal activity, culture filtrates of four fungi in the later group that could give best mortality (26-30%) of *S. exigua* larva in 7 days of assay were concentrated by two methods (i.e. organic solvent extraction and lyophilization). Mortality of *S. exigua* fed by ethyl acetate extract (20 folds higher than culture filtrate) and lyophilized culture broth (10 folds higher than culture filtrate) of only one isolate, namely NHL1/16-L1, could be increased by 67.5 and 52%, respectively, in 7 days of assay. Seven and fourteen day old mycelium of NHL1/16-L1 grown on solid modified MID medium was also extracted by organic solvents and then tested for insect control. The results revealed that percent mortality of *S. exigua* was 5 and 20% by 7 and 14 day old mycelium extract, respectively.

Keywords : fungal endophyte, *Stemona* spp., Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*), insecticidal activity

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	ข.
Abstract	ค.
บทนำ	1
วิธีการดำเนินการวิจัย	9
ผลการทดลองและวิจารณ์	11
สรุปผลการทดลอง	30
บรรณานุกรม	32
ภาคผนวก	34

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	มูลค่าการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชระหว่างปีพ.ศ. 2548-2553	2
2	พืชใน genus <i>Stemona</i>	6
3	ลักษณะหนอนกระพุ่มหอมในวัยต่างๆ	7

สารบัญญัตินี้

ตารางที่		หน้า
1	สถานที่เก็บตัวอย่าง ชนิด (species) และจำนวนของตัวอย่างต้นหนอนตายหยาก	12
2	จำนวนราเอนโคไฟท์แยกได้จากใบ ต้น และ ราก	13
3	ผลการทดสอบสารชีวภาพจากราเอนโคไฟท์ที่มีผลทำให้หนอนกระทู้หอมตายน้อยกว่า 10 % ภายใน 7 วัน และน้อยกว่า 50 % ภายใน 14 วัน	15
4	ผลการทดสอบสารชีวภาพจากราเอนโคไฟท์ที่มีผลทำให้หนอนกระทู้หอมตายน้อยกว่า 20 % ภายใน 7 วันของการทดสอบ และอย่างน้อย 50 % ภายใน 14 วันของการทดสอบ	22
5	ผลการทดสอบสารชีวภาพจากราเอนโคไฟท์ที่มีผลทำให้หนอนกระทู้หอมตายมากกว่า 20 % ใน 7 วัน และอย่างน้อย 50 % ภายใน 14 วัน	23
6	ผลการทดสอบสารสกัดชีวภาพที่ได้จากเชื้อราเอนโคไฟท์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MID แล้วสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อการควบคุมหนอนกระทู้หอมภายใน 7 วัน	27
7	ประสิทธิภาพของสารชีวภาพจากเชื้อราเอนโคไฟท์ที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหิดแห้ง (lyophilization) ต่อการควบคุมหนอนกระทู้หอม	29
8	ประสิทธิภาพสารสกัดชีวภาพที่ได้จากเชื้อราเอนโคไฟท์รหัส NHL 1/16-L1 ที่เจริญบนอาหารแข็ง (MID agar) ต่อการควบคุมหนอนกระทู้หอมภายใน 7 วัน	30