การคัดแยก *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ไอโซเลทที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål)

นางสาวญาณิศา วงศ์วานิช

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ISOLATES SURVIVING IN HIGH TEMPERATURE CONDITION WITH BROWN PLANTHOPPER *Nilaparvata lugens* (Stål) CONTROL CAPABILITY

Miss Yanisa Wongwanich

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Botany
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยก *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ไอโซเลทที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูงซึ่งสามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål)
โดย	นางสาวญาณิศา วงศ์วานิช
สาขาวิชา	พฤกษศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.พยอม โคเบลลี่

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร.พยอม โคเบลลี่)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นางวันทนา ศรีรัตนศักดิ์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ญาณิศา วงศ์วานิช : การคัดแยก *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ไอโซเลทที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูงซึ่งสามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) (ISOLATION OF *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ISOLATES SURVIVING IN HIGH TEMPERATURE CONDITION WITH BROWN PLANTHOPPER *Nilaparvata lugens* (Stål) CONTROL CAPABILITY) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.พยอม โคเบลลี่, 69 หน้า.

Beauveria bassiana เป็นราที่ใช้ในการควบคุมแมลงอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้ความสามารถในการควบคุมแมลงของราลดลง การคัดแยก *B. bassiana* ที่มีความสามารถในการเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูงและมีความสามารถในการควบคุมแมลงที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรา เป็นอีกหนทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่อุณหภูมิสูง *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการควบคุมแมลงสูง ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว ถูกเลือกมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร ethyl methanesulfonate (EMS) จากนั้นนำมาคัดแยกที่อุณหภูมิ 31 33 และ 35°C พร้อมกับศึกษาความสามารถในการฟื้นฟูของราหลังจากที่ผ่านอุณหภูมิ 33°C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายไปบ่มที่ 25°C ดูประสิทธิภาพการงอกของสปอร์ที่ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C เป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน) และนำเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จากผลการศึกษาพบไอโซเลท *B. bassiana* สายพันธุ์กลาย 1 ไอโซเลท ที่มีขนาดโคโลนีที่ใหญ่กว่า และสร้างสปอร์ที่มากกว่าราต้นแบบ ที่อุณหภูมิ 33°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงที่สุด เนื่องจากที่อุณหภูมิ 35°C ไม่พบการเจริญเติบโตของราในทุกไอโซเลท ผลทดสอบการฟื้นฟูของรา พบราสายพันธุ์กลายมีขนาดโคโลนีและปริมาณสปอร์ที่มากกว่าราต้นแบบ ผลการทดสอบการงอกของสปอร์ที่อุณหภูมิ 33°C ไม่พบการงอกของสปอร์ราทั้งไอโซเลทสายพันธุ์กลายและต้นแบบ แต่เมื่อย้ายสปอร์ไปเลี้ยงที่ 25°C (หลังจากการเลี้ยงที่ 33°C) ไอโซเลทสายพันธุ์กลายมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่มากกว่าราต้นแบบในทุกชุดการทดลอง และความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล *Nilaparvata lugens* (Stål) ของราสายพันธุ์กลายมีค่ามากกว่าราต้นแบบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาควิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา พฤกษศาสตร์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2560 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5771964723 : MAJOR BOTANY
KEYWORDS: BEAUVERIA BASSIANA / ETHYL METHANESULFONATE (EMS) / HIGH TEMPERATURE / MUTATION

YANISA WONGWANICH: ISOLATION OF *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin ISOLATES SURVIVING IN HIGH TEMPERATURE CONDITION WITH BROWN PLANTHOPPER *Nilaparvata lugens* (Stål) CONTROL CAPABILITY. ADVISOR: ASST. PROF.TEERADA WANGSOMBOONDEE, Ph.D., CO-ADVISOR: PAYORM COBELLI, Ph.D., 69 pp.

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungus that is widely used to insect pest control. However, the increasing temperature has influenced the insect control capability of the fungus. Therefore, determination of thermotolerant isolates of *B. bassiana* that can grow and remain pathogenic at higher temperatures than its current optimum temperature may be a better way to insect pest control in a high temperature environment. Three isolates of *B. bassiana* with high insect control capability obtained from the Rice Department, Thailand were selected for mutagenesis using ethyl methanesulfonate (EMS) with subsequent screening at 31 33 and 35°C. In addition, the recovery of fungal growth after exposure to 33°C for 7 days and then transferring to 25°C was evaluated. Efficiency of spore germination at 25°C after incubating at 33°C for 5 10 and 15 days was assessed. Then, pathogenicity against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) of mutant and its wild type isolates were tested. Results showed that one mutant isolate generated larger colony diameter and greater sporulation than its wild type at 33°C which was the highest temperature because all isolates didn't grow and sporulate at 35°C. Growth and spore production of the mutant isolate were greater than the wild type when incubated at 25°C for 14 days following exposure to 33°C for 7 days. In addition, the spore germination level of the mutant isolate was significantly higher than the wild type during culture at 25°C after prior exposure to 33°C. The pathogenicity against BPH presented that the mutant isolate had higher capability than the wild type to control BPH.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Department:	Botany	Student's Signature	.....
Field of Study:	Botany	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2017	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีรดา หวังสมบูรณ์ดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างยิ่ง ที่ได้มอบความกรุณาในการให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดการทำงานวิจัย และการเรียน เหนือสิ่งอื่นใดคือกำลังใจที่อาจารย์มอบให้กับลูกศิษย์ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.พยอม โคเบลลี่ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่มอบความกรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิตรตรา เพียภูเขียว และคุณวันทนา ศรีรัตนศักดิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาช่วยตรวจแก้และให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ในการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตที่สนับสนุนทุนการศึกษา

ขอขอบคุณกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างรา เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและสถานที่ทำการศึกษา

ขอขอบคุณกรมอุตุนิยมวิทยา กระทรวงดิจิทัลเพื่อเศรษฐกิจและสังคมที่เอื้อเฟื้อข้อมูลอุณหภูมิเฉลี่ยของภาคกลาง

ขอบคุณเพื่อนที่พร้อมจะช่วยเหลือทุกครั้งที่ต้องการความช่วยเหลือ

ขอบคุณพ่อและคุณแม่ที่มอบกำลังใจและช่วยเหลือตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1. ที่มาและความสำคัญ 1
2. วัตถุประสงค์ 3
3. แผนการดำเนินการวิจัย 3
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร 4
1. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper) 4
1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน 4
1.2 ลักษณะทั่วไป 4
1.3 ปัญหาที่เกิดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 5
1.4 การแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 6
1.5 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 8
1.6 การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 8
2. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin 9
2.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน 9
2.2 ลักษณะทั่วไปของรา *B. bassiana* 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.3 การกระจายพันธุ์ของ *B. bassiana* 11
2.4 แมลงเจ้าบ้านของ *B. bassiana* 11
2.5 กลไกการก่อโรคของ *B. bassiana* ต่อแมลงเจ้าบ้าน 11
2.6 ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่อการก่อโรคของ *B. bassiana* ในแมลงเจ้าบ้าน 12
3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา 13
4. เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS) 13
4.1 ลักษณะทั่วไปของสาร EMS 13
4.2 ตัวอย่างการใช้สาร EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา 15
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ 16
การทดลองที่ 1 การแยกราจากแมลง 16
1.1 การเก็บตัวอย่างซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 16
การทดลองที่ 2 การระบุชนิดของรา 16
2.1 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 16
2.2 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 17
การทดลองที่ 3 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของ *B. bassiana* 18
การทดลองที่ 4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา *B. bassiana* 19
4.1 รา และแมลงที่ใช้ในการทดลอง 19
4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา 19
4.3 ระบุชนิดของราที่แยกได้จากแมลงหลังการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา 19
การทดลองที่ 5 การชักนำให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* โดยใช้สารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS) 20
5.1 การหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 20
5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา 3 ไอโซเลท (BCNT001-BCNT003) 21

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

การทดลองที่ 6 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ชักนำการก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS 22
การทดลองที่ 7 การทดสอบคุณสมบัติของ *B. bassiana* ที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง 22
การทดลองที่ 8 ทดสอบความสามารถในการควบคุมแมลงของ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกแล้ว 23
8.1 รา และแมลงที่ใช้ในการทดลอง 23
8.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา 23
8.3 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา 24
8.4 คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์ราที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (Lethal concentration to 50% mortality: LC50) และเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (Lethal time to 50% mortality: LT50) 24
บทที่ 4 ผลการศึกษา 25
1. การแยกราจากแมลง และการระบุชนิดของรา 25
2. การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของ *B. bassiana* 30
3. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของ *B. bassiana* 32
4. การชักนำให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* โดยใช้สารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS) 34
5. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ชักนำการก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS 36
6. การทดสอบคุณสมบัติของ *B. bassiana* ที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง 39
7. ทดสอบความสามารถในการควบคุมแมลงของ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกแล้ว 46
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา 47
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา 53
รายการอ้างอิง 54
ภาคผนวก ก 62

ORN UNIVERSITY

หน้า

ภาคผนวก ข 64

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 69

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีของ *B. bassiana* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 31 33 และ 35°C เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากได้รับสาร EMS 35

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย 5

ภาพที่ 2 ข้าวที่แสดงอาการไหม้จากการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 6

ภาพที่ 3 โคโลนีของ *B. bassiana* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) 10

ภาพที่ 4ก.-ข. ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดีย ของ *B. bassiana* เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 10

ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสาร EMS 14

ภาพที่ 6 ตำแหน่งการเกิด mutagenesis ด้วยสาร EMS 14

ภาพที่ 7 ตัวอย่างราที่แยกได้จากแมลงในแปลงนาในพื้นที่ของจังหวัดชัยนาท 25

ภาพที่ 8 ลักษณะของเส้นใย *B. bassiana* ที่เจริญปกคลุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล: 26

ภาพที่ 9 ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ (โคนิเดีย) ของ *B. bassiana* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 26

ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆบน PDA เมื่อเวลา 7 วัน 27

ภาพที่ 11ก.-ข. ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดีย ของ *B. bassiana* เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 28

ภาพที่ 12 ลักษณะเส้นใย ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดียของรา 28

ภาพที่ 13 การระบุชนิดของ *B. bassiana* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ EFFO และ EFRO ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 307 bp ของ *B. bassiana* 29

ภาพที่ 14ก.-ง. โคโลนีราที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 31 33 และ 35°C ตามลำดับ 30

ภาพที่ 15 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 14 วัน 30

ภาพที่ 16 จำนวนสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 14 วัน 31

ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของรา *B. bassiana* แต่ละไอโซเลท 32

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของรา *B. bassiana* แต่ละไอโซเลท 33

ภาพที่ 19 โคโลนีราหลังทำการเกลี่ยสารแขวนลอยสปอร์ลงบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C 34

ภาพที่ 20 ผลของสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรอดชีวิตของสปอร์ของ *B. bassiana* 35

ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีที่เจริญที่อุณหภูมิ 33°C บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน 36

ภาพที่ 22 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD 37

ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD 38

ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD 38

ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 33°C 40

ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C 41

ภาพที่ 27 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C เป็นเวลา 7 วัน) 42

ภาพที่ 28 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยในวันที่ 7 และ 14 ของราสายพันธุ์ต้นแบบ (BCNT002WT) และราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) หลังจากบ่มที่ 25 33 และ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C) ตามลำดับ 43

ภาพที่ 29 จำนวนสปอร์เฉลี่ยในวันที่ 7 และ 14 ของราสายพันธุ์ต้นแบบ (BCNT002WT) และราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) หลังจากบ่มที่ 25 33 และ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C) ตามลำดับ . 43

ภาพที่ 30 *B. bassiana* แสดงการงอก และไม่งอกของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง 45

ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เมื่อบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 5 วัน (หลังจากบ่มที่ 33°C เป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน) 45

ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร 46

สถาบันวิทยบริการ
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål)) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ระบาดมากในแถบเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (กรมการข้าว, 2557: ออนไลน์; Pilavong et al., 2012: Online; The National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 2013: Online) โดยพบการแพร่ระบาดครั้งแรกในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2517 และพบการแพร่ระบาดที่รุนแรงในช่วงปี พ.ศ. 2532 2541 และ 2553 (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, 2553; วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, สุกัญญา อรัญมิตร และจินตนา ไชยวงศ์, 2554) ซึ่งเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้งตัวอ่อน และตัวเต็มวัยสามารถทำลายข้าวโดยการดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์ท่อลำเลียงบริเวณโคนต้นข้าว ระดับเหนือผิวน้ำ ทำให้ต้นข้าวมีลักษณะ ใบเหลืองแห้งเป็นหย่อม (hopperburn) ซึ่งพบมากในช่วงระยะที่ข้าวแตกกอจนถึงระยะออกรวง นอกจากนี้ยังเป็นพาหะของไวรัสโรคใบหงิก และโรคเขียวเตี้ยได้อีกด้วย (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์ และคณะ, 2554; Kerchev et al., 2012)

การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลส่วนใหญ่ จะควบคุมโดยการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ทำเขตกรรม และใช้ข้าวสายพันธุ์ต้านทาน (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, 2553) นอกจากนี้การใช้ชีววิธียังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ ศัตรูตามธรรมชาติของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีหลายกลุ่ม อาทิ กลุ่มของแมลง เช่น มวนเขียวดูดไข่ (*Cyrtorhinus lividipennis* Reuter) (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, 2553) กลุ่มของรา เช่น ราเขียว *Metarhizium anisopliae* (Shaikh and Mohite, 2015) และราขาว *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Lee et al., 2015) ซึ่งเป็นกลุ่มราที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นในการศึกษา *B. bassiana* โดยกลไกในการควบคุมแมลงของ *B. bassiana* เกิดจากการที่สปอร์ของ *B. bassiana* ที่อยู่บนตัวแมลงงอก และเจริญเข้าไปในตัวแมลงโดยสร้างเส้นใย (vegetative hypha) ขึ้นภายในช่องว่างภายในลำตัวของแมลง (hemocoel) แล้วสร้างสปอร์ (conidia) บนซากของแมลงที่ตายแล้ว (Broome, Sikorowski, and Norment, 1976; Thomas and Read, 2007) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้แมลงตาย เกิดได้ทั้งการที่โครงสร้างของร่างกายแมลงฉีกขาด ขาดสารอาหาร และการได้รับสารพิษบางชนิด (Wan, 2003) สารพิษที่พบ ได้แก่ beauvericin แต่กลไกในการออกฤทธิ์ต่อแมลงยังไม่แน่ชัด (Wang and Xu, 2012) โดยปัจจัยที่ส่งเสริมการก่อโรคในแมลงของรามีได้หลายปัจจัย เช่น แร่ธาตุ น้ำ อุณหภูมิที่เหมาะสม ความสามารถในการทำให้แมลงเกิดโรค ความสามารถในการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

แพร่กระจายเข้าไปในตัวของแมลง และปัจจัยอื่นๆ เป็นต้น (Wan, 2003) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า *B. bassiana* สายพันธุ์ BCC6241 และ BCC2637 มีความสามารถในการทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายได้ประมาณ 60-67% เท่านั้น (28±2°C, ความชื้นสัมพัทธ์ 70–80%) (Krutmuang, 2011: Online) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ และยังพบอีกว่าสภาพแวดล้อมภายในแปลงที่มีอุณหภูมิสูงเกินกว่าค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการเจริญของรา และการที่สปอร์ของราได้รับแสงแดดโดยตรงในช่วงกลางวันที่นานเกินไป ส่งผลต่อความมีชีวิต และการงอกของสปอร์ของ *B. bassiana* ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพในการก่อโรคของราในแมลงลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ทดสอบที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา หรือสปอร์ที่ตกอยู่ในตำแหน่งที่ได้รับร่มเงา ทั้งๆที่ราทั้งสองกลุ่มเป็นราไอโซเลทเดียวกัน (Daoust and Pereirn, 1986; Inglis, Johnson, and Goettel, 1997) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์และเจริญเติบโตของเส้นใยของ *B. bassiana* อยู่ในช่วงประมาณ 25°C (Hywel-Jones and Gillespie, 1990; Hallsworth and Magan, 1999)

สืบเนื่องจากอุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยในช่วง 35 ปี (2524- 2558) เพิ่มขึ้นจาก 26.7 ไปถึง 27.6°C (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2560: ออนไลน์) ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของ *B. bassiana* ลดลงในช่วงฤดูปลูกข้าว โดยอุณหภูมิเฉลี่ยช่วงนาปรังในภาคกลางของประเทศไทย (ธันวาคม-มิถุนายน) ในช่วงปี 2557-2559 เท่ากับ 28.0 28.6 และ 29.4°C ตามลำดับ ในขณะที่ช่วงนาปี (กรกฎาคม-พฤศจิกายน) เท่ากับ 28.4 28.8 และ 28.6°C ตามลำดับ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *B. bassiana* วิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีในสภาพภูมิอากาศที่มีอุณหภูมิที่สูงขึ้นของประเทศไทยได้ คือ การหาไอโซเลทของ *B. bassiana* ที่สามารถรอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิที่สูงกว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา และสามารถสร้างสปอร์ได้ดี

การคัดแยกราที่สามารถรอดชีวิตได้ในอุณหภูมิสูงนั้นทำได้หลายวิธี เช่น การคัดแยกราที่เลี้ยงในอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของรา การใช้สารเคมีก่อการกลายพันธุ์ (chemical mutagen) หรือการใช้แสงอัลตราไวโอเลต เป็นต้น และจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *B. bassiana* ด้วยการใช้ความร้อนชื้น และแสงอัลตราไวโอเลตทำให้ราสายพันธุ์กลายเจริญเติบโต และสร้างสปอร์ (blastospores) ได้ดีกว่าพ่อแม่ที่อุณหภูมิ 35°C (Avanti, Balaraman, and Gopinath, 2014) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ความร้อนชื้นสามารถทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพได้ (Wang et al., 2012) ซึ่งอาจไปกระตุ้นให้เกิดการเสื่อมสภาพในโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการงอก หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการก่อโรคในแมลงของราได้ นอกจากนี้ รังสีอัลตราไวโอเลตสามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Saccharomyces cerevisiae* โดยเปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์ของรามีค่าค่อนข้างต่ำ (Lawrence and Christensen, 1976) เพราะราสามารถปรับเปลี่ยนดีเอ็นเอของตนเองกลับมาได้ ส่วนสารเคมีที่นิยมใช้ในการชักนำให้เกิดการ

กลายพันธุ์ชนิดหนึ่ง คือ Ethyl methanesulfonate (EMS) การกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตที่เกิดจากสาร EMS กระตุ้นให้เกิดการแทนที่ของคู่เบส โดยการเปลี่ยน GC เป็น AT และ AT เป็น CG แต่ในบางครั้ง EMS อาจทำให้เกิดการเพิ่มหรือลดของคู่เบส (based-pair insertion หรือ based- pair deletion) ได้ (Sega, 1984) ตัวอย่างการใช้ EMS ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา เช่น การชักนำให้รา *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์กลายสร้างกรดออกซาลิก (Leger, Nelson, and Screen, 1999) และการชักนำให้รา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์กลายสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านทานแบคทีเรีย (Leonard, Brown, and Hayman, 2013) เป็นต้น

2. วัตถุประสงค์

การคัดแยก *B. bassiana* ไอโซเลทที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูงซึ่งสามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้

3. แผนการดำเนินการวิจัย

3.1 คัดเลือกราเพื่อนำมาชักนำให้เกิดสายพันธุ์กลายของรา *B. bassiana*

3.2 ทำการชักนำให้เกิดราสายพันธุ์กลายของรา *B. bassiana*

3.3 ทำการทดสอบการกลายพันธุ์ของรา

3.4 ทดสอบความสามารถในการเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง

3.5 ทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของราสายพันธุ์กลาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การส่งเสริม *B. bassiana* สายพันธุ์กลายเพื่อนำไปใช้ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในแปลงนาของประเทศไทย

บทที่ 2
การตรวจเอกสาร

1. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper)

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål)) เป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ระบาดมากในแถบเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (กรมการข้าว, 2557: ออนไลน์; Pilavong et al., 2012; The National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 2013: Online)

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Kingdom: Animalia
Phylum: Arthropoda
Class: Insecta
Order: Hemiptera
Family: Delphacidae
Genus: *Nilaparvata*
Species: *N. lugens*

1.2 ลักษณะทั่วไป

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล มีวงชีพ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะไข่ ตัวอ่อน และตัวเต็มวัย (ภาพที่ 1)

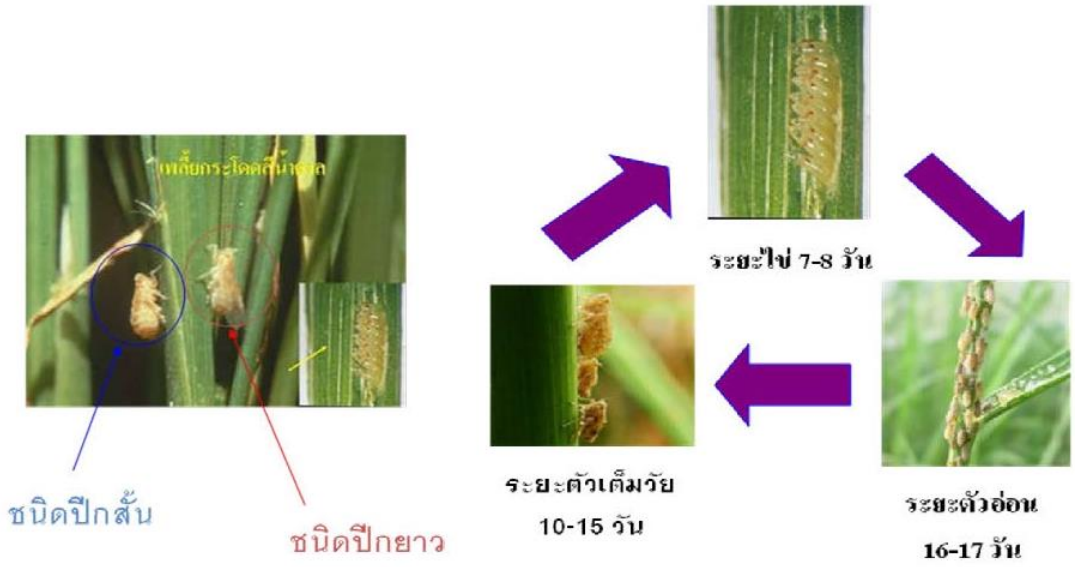
ระยะไข่ ตัวเต็มวัยเพศเมียใช้อวัยวะวางไข่ (ovipositor) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเลื่อย แทงต้นข้าวเพื่อวางไข่ตามกาบใบหรือเส้นกลางใบข้าว วางแบบเดี่ยวและกลุ่มเรียงกันเหมือนหวีกล้วยหอม มีฝาปิด (egg cab) ไข่เมื่อวางใหม่ๆ จะมีสีขาวขุ่น หลังจากนั้น 3-4 วัน จะเกิดตาสีแดง และพัฒนาเป็นตัวอ่อน (nymph) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการฟักไข่อยู่ที่ประมาณ 28°C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 80% (สมคิด นุชปั้น, 2554)

ระยะตัวอ่อน จะมี 5 ระยะ ลอกคราบ 4 ครั้ง ตัวอ่อนระยะที่ 1 เมื่อฟักออกมาจากไข่ ตัวจะมีสีเทา ตาสีแดงปนดำใช้เวลา 3-4 วัน ลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 ตัวมีสีน้ำตาลอ่อน รวมระยะเวลาการลอกคราบ ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนที่ 1-5 ประมาณ 16-18 วัน (สมคิด นุชปั้น, 2554)

ระยะตัวเต็มวัย มี 2 ลักษณะคือ ชนิดปีกยาว (macropterous form) และชนิดปีกสั้น (brachepterous form) ซึ่งปีกจะหดสั้นกว่าส่วนท้อง เพศเมียตัวโตกว่าเพศผู้จะมีสีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลปนดำ ตัวเต็มวัยปีกยาว เพศเมีย (macropterous females) วางไข่ได้ 100 ฟอง และชนิดปีก

สั้น (brachepterous females) วางไข่ได้ 300 ฟอง และสามารถเพิ่มปริมาณ ประชากรได้ 2-3 รุ่น ในช่วงชีวิตที่เป็นตัวเต็มวัย ประมาณ 2 สัปดาห์ (สมคิด นุชปั้น, 2554)

สีของตัวเต็มวัยและตัวอ่อน มีตั้งแต่สีน้ำตาลอ่อนถึงสีน้ำตาลดำ ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากรในขณะนั้น โดยประชากรเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีจำนวนน้อยกว่า 1 ตัว/ต้น สีลำตัวของแมลงจะเป็นสีน้ำตาลอ่อน แต่หากประชากรของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีมากกว่า 100 ตัว/ต้น สีลำตัวของแมลงจะเป็นสีน้ำตาลดำ (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, สุกัญญา อรัญมิตร และจินตนา ไชยวงศ์, 2554)

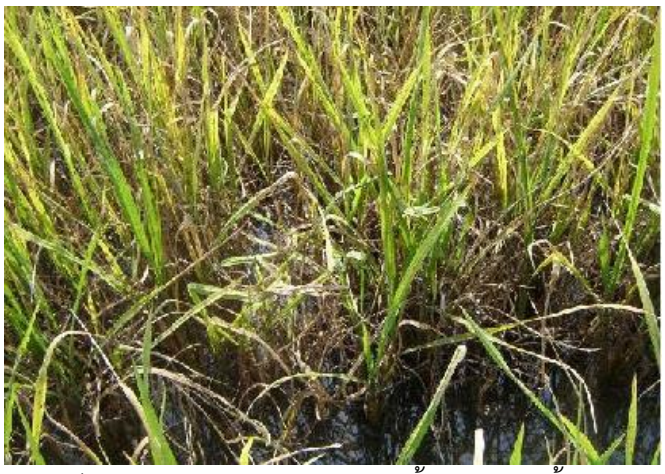


ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย (กรมการข้าว, 2559: ออนไลน์)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.3 ปัญหาที่เกิดจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นศัตรูข้าวที่สำคัญชนิดหนึ่ง เข้าทำลายข้าวได้ในช่วงอายุข้าวตั้งแต่ 20 ไปจนถึง 120 วัน โดยตัวเต็มวัย และตัวอ่อนทุกระยะจะดูดกินน้ำเลี้ยงจากท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของต้นข้าวในระดับโคนต้นข้าวเหนือระดับน้ำ ทำให้ต้นข้าวมีอาการใบแห้งและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ลักษณะอาการเสื่อมสภาพ (senescence) ของข้าวที่เกิดขึ้นเรียกว่า “อาการไหม้” (hopper burnd) (ภาพที่ 2) โดยทั่วไปพบในระยะข้าวแตกกอ-ออกรวง นอกจากนี้ยังเป็นตัวพาหะนำไวรัส มาสู่ต้นข้าวทำให้ข้าวเป็นโรคใบหงิก (ragged stunt) จากไวรัส Oryzavirus และโรคเขียวเตี้ย (grassy stunt) จากไวรัส Tenuivirus อีกด้วย (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์ และคณะ, 2554; Wilson and Claridge, 1991; Kerchev et al., 2012;)



ภาพที่ 2 ข้าวที่แสดงอาการไหม้จากการเข้าทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (กรมการข้าว, 2559: ออนไลน์)

1.4 การแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

พบการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในพื้นที่แถบเอเชีย ออสเตรเลีย และมหาสมุทรแปซิฟิกบางส่วน ในทวีปเอเชียเขตร้อน ก่อนที่จะเข้าสู่ยุคการปฏิวัติเขียวในช่วงปี พ.ศ. 2513 เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเป็นแมลงที่สร้างความเสียหายให้กับข้าวในระดับความรุนแรงที่น้อย แต่หลังจากที่มีการนำสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง มาใช้ในการควบคุมหนอนกอข้าว (rice stemborers) กลับพบการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่เพิ่มมากขึ้นเนื่องมาจากการรบกวนระบบนิเวศระหว่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลกับแมลงศัตรูธรรมชาติ เมื่อแมลงที่สร้างความเสียหายให้กับข้าวเพิ่มจำนวนสูงขึ้น การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงและข้าวพันธุ์ต้านทานจึงเป็นหนทางที่จำเป็นสำหรับการจัดการปัญหาการรุกรานของแมลงศัตรูข้าว (Dyck and Thomas, 1979; Sogawa, 2015)

จากการศึกษาของ (Kenmore, 1980) ที่ศึกษาเกี่ยวกับวงชีพของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และศัตรูตามธรรมชาติ พบว่ากลไกการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของศัตรูตามธรรมชาติได้ถูกรบกวนจากการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ซึ่งสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงอาจเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในนาข้าว จากเหตุการณ์ข้างต้นแสดงให้เห็นว่า สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงชนิดที่ชักนำให้การระบาดของแมลงเพิ่มมากขึ้น เป็นสารที่ชักนำให้เกิดไบโอไทป์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อวิธีการควบคุมแมลงเกิดขึ้น (Aquino and Heinrichs, 1979) ซึ่งการพัฒนาข้าวพันธุ์ที่ต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในการแก้ไขปัญหาสามารถทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากพันธุ์ต้านทานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ประกอบด้วยยีนต้านทานหลายๆ ยีนที่ปล่อยออกมา ไม่สามารถต้านทานต่อไบโอไทป์ใหม่ของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่สามารถเอาชนะยีนต้านทานเหล่านั้นได้ (Sogawa, 1982; Gallagher, Kenmore, and Sogawa, 1994)

การแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย พบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2517 ในพื้นที่ที่ปลูกข้าวพันธุ์อ่อนแอ กข7 (วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, สุกัญญา อรัญมิตร และจินตนา ไชยวงศ์, 2554) ต่อมาในปี พ.ศ. 2521-2522 มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ในปี พ.ศ. 2523-2524 พบการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในแปลงข้าวพันธุ์อ่อนแอ (Kenmore, 1991) หลังจากนั้นในปี พ.ศ. 2525 มีการนำข้าวพันธุ์ต้านทาน เช่น กข21 และ กข23 มาปลูกอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2529 พันธุ์ดังกล่าวได้ถูกเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเข้าทำลายอีกครั้ง ต่อมาในปี พ.ศ. 2530 ข้าวพันธุ์ต้านทานสุพรรณบุรี 60 ได้ถูกนำมาปลูกเพื่อแก้ไข ปัญหาการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพราะปริมาณผลผลิตมากและเมล็ดที่มีคุณภาพส่งผลให้ข้าวสุพรรณบุรี 60 เป็นที่นิยม การระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในครั้งที่ 2 เกิดขึ้นในปี พ.ศ. 2532-2533 หลังจากที่ข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 นำมาปลูกได้ 2 ปี (Braber and Meenakanit, 1992) การแพร่ระบาดมีความเกี่ยวข้องกับการใช้สารสังเคราะห์กลุ่ม pyrethroid และ deltamethrin ในปริมาณมาก ซึ่งเป็นสารในกลุ่มที่ชักนำให้เกิดการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Sogawa, 2015)

ในปี พ.ศ. 2534 หลังจากที่มีการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในครั้งที่ 2 มีการนำสารฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid และ imidacloprid มาใช้ในการควบคุมแมลง โดยสารในกลุ่ม imidacloprid ไม่ชักนำให้เกิดการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพราะเป็นสารที่ออกฤทธิ์ในระยะเวลาที่นาน หรือมากกว่า 40 วัน ซึ่งนานพอที่จะครอบคลุมตลอดช่วงวงชีพของแมลง และไม่ทำให้เกิดการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากไข่ที่ยังรอดชีวิตอยู่ ทำให้สามารถควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีในช่วงปีแรก อย่างไรก็ตาม หลังจากใช้ได้ไม่นานเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้เกิดการปรับตัวให้ต้านทานสารในกลุ่ม imidacloprid (Sogawa, 2015)

ในปี พ.ศ. 2546 พบว่าประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของสาร imidacloprid ลดลง จากนั้นเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่สามารถต้านทานสาร imidacloprid มีการแพร่ระบาดไปทั่วพื้นที่นาในเอเชีย เนื่องมาจากศัตรูตามธรรมชาติของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลไม่สามารถดำรงชีวิตได้เพราะความเป็นพิษของสาร imidacloprid ดังนั้นสาร abamectin cypermethrin และ chlorpyrifos ถูกนำมาใช้แทนสาร imidacloprid เพื่อควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสายพันธุ์กลายที่เกิดขึ้น สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงใหม่ที่นำมาใช้ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ครอบคลุมทั้งวงจรชีวิตของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล จึงทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในเวลาอันรวดเร็ว ในช่วงปี พ.ศ. 2553-2556 พบการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทยครั้งที่ 3 ซึ่งมีความรุนแรงมากกว่าในอดีต ซึ่งการแพร่ระบาดในครั้งนี้เกิดจากการจัดการเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลด้วยสารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ซึ่งเป็นวิธีการแก้ปัญหาที่ไม่ยั่งยืน (Sogawa, 2015)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.5 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1.5.1 การใช้พันธุ์ข้าวที่อ่อนแอต่อการทำลายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (สมคิด นุชปั้น, 2554; Chiu, 1979)

1.5.2 การปลูกพืชหนาแน่น หรือปลูกพืชอย่างต่อเนื่องในพื้นที่เดิม (สมคิด นุชปั้น, 2554; Chiu, 1979)

1.5.3 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง ชนิดที่ชักนำให้เกิดการเพิ่มระบาดของแมลง (resurgence inducing insecticides) และการใช้ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจนปริมาณมาก (สมคิด นุชปั้น, 2554; Chiu, 1979) เนื่องจากปุ๋ยที่มีไนโตรเจนมากจะส่งเสริมการพัฒนาตัวอ่อน ตัวเต็มวัย เซลล์สืบพันธุ์ และการฟักของไข่ (Lu et al., 2005) ในขณะที่ปุ๋ยไนโตรเจนที่มากเกินไปจะส่งผลให้ต้นข้าวมีลักษณะสูง อวบน้ำไม่แข็งแรง ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถดูดน้ำเลี้ยงในข้าวได้ง่ายขึ้น (Prayana, Mudjiono, and Rahardjo, 2013)

1.5.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เช่น ความชื้น ฝน ลม ปริมาณของศัตรูตามธรรมชาติที่ลดลง เป็นต้น (สมคิด นุชปั้น, 2554; Chiu, 1979)

1.6 การควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

1.6.1 การใช้ข้าวพันธุ์ต้านทาน เช่น พันธุ์ปทุมธานี 1 และพิษณุโลก 2 แต่สามารถใช้ได้ในระยะที่ไม่นาน เพราะเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมีการสร้างไบโอไทป์ใหม่ที่ทำให้สามารถเอาชนะยีนต้านทานเหล่านั้นได้ (Sogawa, 1982; Gallagher, Kenmore, and Sogawa, 1994) เช่น การใช้ข้าวพันธุ์ต้านทานสุพรรณบุรี 60 ในปี พ.ศ. 2530 เพื่อแก้ไขปัญหาการแพร่ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แต่หลังจากปลูกข้าวพันธุ์สุพรรณบุรี 60 ได้ 2 ปี พบการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลเกิดขึ้นอีกครั้ง (Braber and Meenakanit, 1992)

1.6.2 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง สามารถควบคุมการระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ในเวลารวดเร็ว แต่สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงที่ใช้ในการควบคุมบางชนิด สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มการระบาดของแมลงได้ (Aquino and Heinrichs, 1979) นอกจากนี้ตามรายงานในอดีต สาร imidacloprid ที่ใช้ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เป็นพิษต่อศัตรูตามธรรมชาติของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ในขณะที่เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลสามารถปรับตัว และต้านทานต่อสารนั้นได้ (Sogawa, 2015)

1.6.3 การใช้วิธีทางชีวภาพในการควบคุม เช่น การใช้แมลงศัตรูธรรมชาติ โดยตัวเบียน และราก่อโรคของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลรายงานจาก ไต้หวัน ญี่ปุ่น ไทย อินเดีย มาเลเซีย ศรีลังกา ฟิจิ ฟิลิปปินส์ และหมู่เกาะโซโลมอน

การใช้แมลงศัตรูธรรมชาติในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบแมลงในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Eulophidae Mymaridae และ Trichogrammatidae เป็นตัวเบียนไข่ แมลง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในอันดับ Hymenoptera วงศ์ Dryinidae อันดับ Strepsiptera วงศ์ Elenchidae และอันดับ Diptera วงศ์ Pipunculidae เป็นตัวเบียนตัวอ่อนและตัวเต็มวัย (Chiu, 1979) นอกจากนี้ยังพบแมลงตัวห้ำ เช่น มวนเขียวดูดไข่ (*Cyrtorhinus lividipennis* Reuter วงศ์ Miridae อันดับ Hemiptera) ที่หากมีจำนวนมากกว่าเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล 2-3 เท่า สามารถควบคุมปริมาณเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลให้อยู่ในระดับที่ไม่ก่อความเสียหายกับข้าวได้ (วันทนา ศรีรันตศักดิ์ และคณะ, 2554)

การใช้ราก่อโรคในแมลง พบราในวงศ์ Entomophthoraceae และ Stilbaceae แยกได้จากตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Chiu, 1979) นอกจากนี้ยังพบการใช้ราในวงศ์อื่น เช่น *Metarhizium anisopliae Beauveria bassiana* และ *Verticillium lecanii* ในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Shaikh and Mohite, 2015) ถึงแม้ว่าแมลงจะสามารถอยู่ในที่ที่มีสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมที่มีราก่อโรคได้ แต่โดยทั่วไปมักจะถูกฆ่าด้วยราที่มีความจำเพาะกับแมลงชนิดนั้นๆ จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแมลงเจ้าบ้านกับราก่อโรค พบว่าแมลงและราก่อโรคมีการพัฒนาร่วมไปด้วยกัน โดยแมลงเจ้าบ้านจะพยายามฆ่าหรือกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาภายในร่างกาย ขณะที่ราจะมีการพัฒนาเพื่อให้สามารถจัดการกับระบบภูมิคุ้มกันและพยายามหาสารอาหารจากแมลงเจ้าบ้าน (Butt et al., 2016)

2. *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin

B. bassiana เป็นราที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายๆ ชนิด ถูกค้นพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2378 โดย Agostino Bassi di Lodi ที่ประเทศอิตาลี ซึ่งเป็นการค้นพบว่าราสามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงได้ ซากหนอนไหม *Bombyx mori* ที่พบการก่อโรคของ *B. bassiana* มีลักษณะขาว จึงเรียกลักษณะที่เกิดขึ้นว่า white muscardine (Zimmermann, 2007)

2.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Kingdom: Fungi

Division: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Hypocreales

Family: Clavicipitaceae

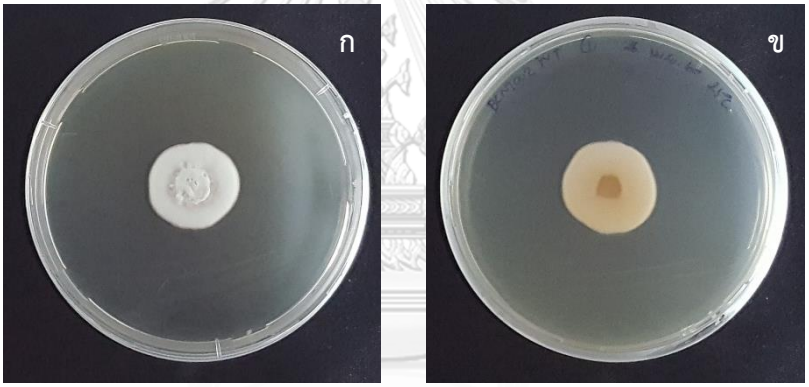
Genus: *Beauveria*

Species: *B. bassiana*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

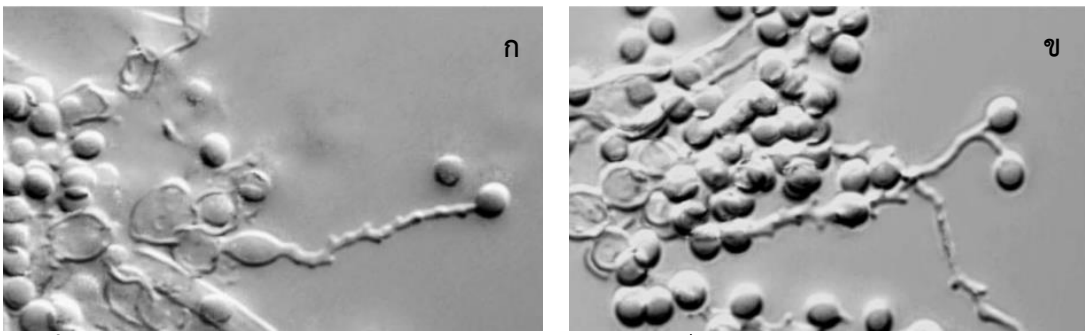
2.2 ลักษณะทั่วไปของรา *B. bassiana*

โคโลนีมีสีขาว จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง อาจพบมีสีแดง (ภาพที่ 3ก.) เมื่อกลับด้านจะพบโคโลนีไม่มีสี สีเหลือง หรือสีชมพู (ภาพที่ 3ข.) ก้านชูโคนิเดีย (conidiophore) (ภาพที่ 4) ประกอบด้วยส่วนฐานที่กลมหรือลักษณะคล้ายฟลาสค์ มีความยาวของก้าน (rachis) 20 ไมโครเมตร ซึ่งจะมีลักษณะเป็นรูปซิกแซก (zigzag) บริเวณปลาย มีการแตกแขนงสั้นๆ แล้วสร้างโคนิเดียที่ปลาย 1 โคนิเดีย (conidia) โคนิเดียไม่มีสี ลักษณะกลมไปจนถึงทรงรีกว้าง โดยทั่วไปมีขนาด 2-3X2-2.5 ไมโครเมตร โดยโคนิเดีย (ภาพที่ 4) จะมีการรวมอยู่เป็นกลุ่มคล้ายกระจุกฝ้าย จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่าสกุล *Beauveria* มีความเกี่ยวข้องกับ Telomorph ของสกุล Cordyceps (ไฟลัม Ascomycota อันดับ Hypocreales วงศ์ Clavicipitaceae) พบลักษณะเป็นเส้นใยสีขาวแน่นปกคลุมอยู่ด้านบนโครงร่างแข็งภายนอก (exoskeleton) ของแมลงเจ้าบ้าน (Humber, 2005): Online; (Zimmermann, 2007)



ภาพที่ 3 โคโลนีของ *B. bassiana* บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)
ก. โคโลนีบนจานเลี้ยงเชื้อ ข. โคโลนีเมื่อคว่ำจานเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4ก.-ข. ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดีย ของ *B. bassiana* เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Rehner et al., 2011)

2.3 การกระจายพันธุ์ของ *B. bassiana*

B. bassiana ถูกพบกระจายอยู่ทั่วโลก โดยทั่วไปพบในพื้นที่เขตอบอุ่น และเขตร้อน ถิ่นที่อยู่ของรา สามารถพบได้ตั้งแต่ดินในแถบเทือกเขาสูง พรุ ทุ่งหญ้าสะวันนาที่มีพืชขึ้น ป่า พื้นที่เพาะปลูก เนินทราย ดินทรายที่มีน้ำไหลผ่าน นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากบริเวณรอบๆ รากพืชในป่าพรุ หรือในอากาศ ซึ่งการแยกราจากพืช และดินสามารถทำได้โดยใช้อาหารที่จำเพาะ (Zimmermann, 2007; Jia et al., 2013)

2.4 แมลงเจ้าบ้านของ *B. bassiana*

B. bassiana สามารถก่อโรคในแมลงได้ในหลายอันดับ (Order) อาทิ อันดับ Gastropoda Acari Orthoptera Dermaptera Isoptera Blattaria Thysanoptera Homoptera Heteroptera Diptera Coleoptera Hymenoptera Siphonaptera และ Lepidoptera (Goettel et al., 1990) แต่ยังไม่พบว่า *B. bassiana* มีการก่อโรคในศัตรูตามธรรมชาติ และแมลงในดินที่เป็นประโยชน์ (Thungrabeab and Tongma, 2007)

2.5 กลไกการก่อโรคของ *B. bassiana* ต่อแมลงเจ้าบ้าน

สปอร์ของ *B. bassiana* จะงอกและก่อให้เกิดโรคได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความอ่อนแอของแมลงเจ้าบ้าน ระยะการเจริญเติบโตของแมลงเจ้าบ้าน สภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และความชื้น โดยทั่วไปการงอกของสปอร์ของ *B. bassiana* จะเริ่มหลังจากผ่านไป 10 ชั่วโมง และสมบูรณ์ที่ 20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นสปอร์ที่งอกจะเจริญเข้าไปยังส่วนที่ไม่ได้มี cuticle ปกคลุม เช่น ข้อต่อ ปาก และบริเวณรอยต่อ โดยการสร้าง extracellular protease และ chitinase เพื่อสลายโปรตีนและไคติน หลังจากมีการเจริญเข้าไปภายในตัวของแมลงได้สำเร็จแล้ว ราจะมีการลุกลามไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของแมลงเจ้าบ้าน โดยการเจริญของเส้นใย สร้างสปอร์ (blastospore) และสร้างสารพิษที่ทำให้แมลงเจ้าบ้านตาย โดยระยะเวลาที่ราใช้ในขั้นตอนนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของแมลงเจ้าบ้าน ระยะการเจริญเติบโตของแมลง อุณหภูมิ และความรุนแรงในการก่อโรคของรา โดยเฉลี่ยจะใช้เวลาประมาณ 36-72 ชั่วโมง ส่งผลให้พบแมลงตายภายใน 4-10 วัน หลังจากการเข้ารุกรานของรา เมื่อแมลงตาย ราจะงอกเส้นใยแทงทะลุผ่านผิวของแมลงออกมาและสร้างสปอร์ (conidia) ทำให้มองเห็นเป็นราสีขาวปกคลุมบนซากของแมลง (Zimmermann, 2007; Keswani, Singh, and Singh, 2013)

สารที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึม และสารพิษที่ *B. bassiana* สร้างขึ้น ได้แก่ สาร beauvericin bassianin tenollin และ bassianolide จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า beauvericin มีกลไกการทำงานคล้ายสารเคมีป้องกันกำจัดแมลงและยาปฏิชีวนะ เป็นพิษต่อเซลล์ และ ionophore ซึ่งเป็นสารประกอบที่ทำหน้าที่ให้สารที่มีประจุสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นไขมัน เช่น ผนังเซลล์ ไปได้ ส่วน bassianin และ tenellin เป็น secondary metabolite ที่ไม่ใช่โปรตีน ทำหน้าที่

ยับยั้ง ATPase ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และ bassianolide ทำหน้าที่เป็น ionophore และยาปฏิชีวนะ (Keswani, Singh, and Singh, 2013)

2.6 ปัจจัยของสิ่งแวดล้อมต่อการก่อโรคของ *B. bassiana* ในแมลงเจ้าบ้าน

ปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่สำคัญต่อ *B. bassiana* มีทั้งปัจจัยทางชีวภาพและทางกายภาพ โดยปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงอาทิตย์ อุณหภูมิสามารถส่งผลกระทบต่อราก่อโรคในแมลงได้ในหลายทาง โดยอาจส่งผลต่อการงอก การเจริญเติบโต ความมีชีวิตของราบนและในแมลงเจ้าบ้าน และในสิ่งแวดล้อม โดยอุณหภูมิสูงสามารถทำให้ราตายก่อนที่จะสัมผัสกับแมลงเจ้าบ้าน หรือไปลดการเจริญเติบโตของราภายในตัวแมลงเจ้าบ้าน ในทางตรงกันข้าม อุณหภูมิต่ำจะไปลดหรือยับยั้งการงอก หรือการเจริญเติบโตของรา ทำให้เกิดความบกพร่องหรือยืดเวลาการก่อโรคในแมลงออกไป อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. bassiana* อยู่ในช่วง อุณหภูมิ 23-28°C อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 5-10°C อุณหภูมิที่สูงที่สุดอยู่ในช่วง 30-38°C ขึ้นกับไอโซเลทของรา (Roberts and Campbell, 1977; Zimmermann, 2007)

การงอกของสปอร์ของราบนตัวแมลงก่อนการก่อโรค และการสร้างสปอร์ของราหลังจากที่แมลงตายแล้วต้องการความชื้นสูง โดยทั่วไปความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity; RH) สำหรับการงอกของสปอร์ (conidia) ของราอยู่ที่ประมาณ 92-100% (Walstad, Anderson, and Stambaugh, 1970; Hallsworth and Magan, 1999) การงอกของสปอร์จะลดลงเล็กน้อยเมื่อความชื้นอยู่ที่ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 99% ในขณะที่การงอกของสปอร์ของราและการเจริญเติบโตจะลดลงมากเมื่อความชื้นสัมพัทธ์มีค่า 94% และ 92% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเข้าก่อโรคของราในแมลงสามารถพบได้ที่ความชื้นสัมพัทธ์มีค่าต่ำประมาณ 60-70% (Zimmermann, 2007) จากการศึกษาของ (Clerk and Madelin, 1965) พบว่าในอุณหภูมิสูง ค่าความชื้นสัมพัทธ์ที่ต่ำ จะยิ่งยืดอายุของสปอร์ได้มากขึ้น จากการศึกษาของ (Krutmuang, 2011) ที่ศึกษาความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ของ *B. bassiana* สายพันธุ์ BCC6241 และ BCC2637 ในประเทศไทย (อุณหภูมิ 28±2°C ความชื้นสัมพัทธ์ 70–80%) พบว่าราสามารถทำให้แมลงตายได้ 60–67% แสดงให้เห็นว่าที่ความชื้นสัมพันธ์ประมาณ 70% *B. bassiana* สามารถก่อโรคในแมลงได้ แต่ประสิทธิภาพในการก่อโรคมีค่าไม่สูงมากนัก

จากการศึกษาของ (Krieg et al., 1981) แสง UV-B (290-330 นาโนเมตร) และ UV-A (330-400 นาโนเมตร) เป็นปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อความทนทานของราก่อโรคในแมลง พบว่า 99% ของสปอร์ของ *B. bassiana* ไม่สามารถก่อโรคในแมลงได้หลังจากได้รับแสง UV-C เป็นระยะเวลาประมาณ 16 นาที และแสง UV-A และ UV-B เป็นระยะเวลาประมาณ 31 นาที จากการศึกษาของ Fargues et al. (1997) โดยการให้แสงที่ความยาวคลื่น 295-1,100 นาโนเมตร ใน *B.*

bassiana จำนวน 65 ไอโซเลท พบว่าจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตมีค่าลดลง เมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ให้แสงแก่สปอร์

3. การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา

เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นของประเทศไทย จากข้อมูลของกรมอุตุนิยมวิทยา (2560) รายงานว่าในช่วง 35 ปี (2524-2558) อุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยเพิ่มขึ้นจาก 26.7 ไปถึง 27.6°C ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของ *B. bassiana* ลดลงในช่วงฤดูปลูกข้าว โดยอุณหภูมิเฉลี่ยช่วงนาปรังในภาคกลางของประเทศไทย (ธันวาคม-มิถุนายน) ในช่วงปี 2557-2559 เท่ากับ 28.0 28.6 และ 29.4°C ตามลำดับ ในขณะที่ช่วงนาปี (กรกฎาคม-พฤศจิกายน) เท่ากับ 28.4 28.8 และ 28.6°C ตามลำดับ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *B. bassiana* วิธีการหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงในสภาพภูมิอากาศที่มีอุณหภูมิที่สูงขึ้นของประเทศไทยได้คือ การชักนำ *B. bassiana* ให้เกิดการกลายพันธุ์และทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ ตัวอย่างการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในราสามารถทำได้หลายวิธี เช่น

3.1 การใช้ความร้อนชื้น (Moist heat treatment) ในการชักนำ *B. bassiana* ให้สร้าง blastospore ในปริมาณมากที่อุณหภูมิ 35°C (Avanti, Balaraman, and Gopinath, 2014)

3.2 การใช้แสงอัลตร้าไวโอเลต ในการชักนำ *B. bassiana* ให้สร้าง blastospore ในปริมาณมากที่อุณหภูมิ 35°C (Avanti, Balaraman, and Gopinath, 2014)

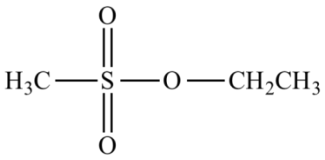
3.3 การใช้สารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ โดยการชักนำ *Saccharomyces cerevisiae* ให้ไวต่อการตอบสนองต่ออุณหภูมิ ด้วยสาร EMS (Momose and Gregory, 1998)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS)

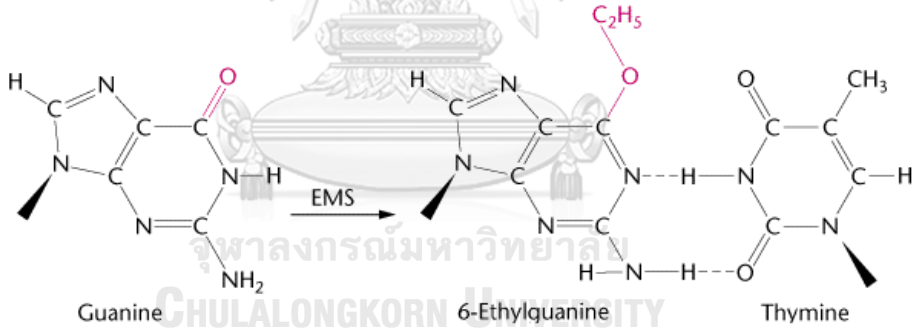
4.1 ลักษณะทั่วไปของสาร EMS

สาร EMS มีสูตรโครงสร้างทางเคมี $C_3H_8SO_3$ (ภาพที่ 4) เป็นสารในกลุ่ม ethylating agent หรือสารที่ทำหน้าที่เติมหมู่เอธิลให้กับเบส เป็นของเหลวใสไม่มีสี ที่อุณหภูมิห้อง มีจุดเดือดที่ 213-213.5°C ความหนาแน่นเท่ากับ 1.1452 ที่ 22°C มวลโมเลกุลเท่ากับ 124.2 ค่าดัชนีหักเหเท่ากับ 1.4180 ที่ 20°C สาร EMS ถูกสังเคราะห์ได้จากสาร methanesulfonic anhydride กับ ethylalcohol สาร EMS ถูกนำไปใช้ในการก่อการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตอย่างกว้างขวาง ตั้งแต่ไวรัสจนกระทั่งถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งสาร EMS เป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Sega, 1984)



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของสาร EMS (UCLA Department of Chemistry and Biochemistry, 2017)

กลไกการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตของ EMS เกิดจากการเติมหมู่เมธิล หรือเอธิล (alkylation) ให้กับเซลล์ จากการทำงานร่วมกันของกลไก S_N1/S_N2 โดยปฏิกิริยาการเติมหมู่เอธิล (ethylation) ของดีเอ็นเอ จะเกิดที่ตำแหน่งของไนโตรเจนของเบสเสมอ แต่ปฏิกิริยาของ S_N1 ของสาร EMS มีความสามารถในการเติมหมู่เอธิลที่ออกซิเจน ส่งผลให้สาร EMS สามารถเติมหมู่เอธิลให้ได้ทั้งตำแหน่งที่มีไนโตรเจน และออกซิเจน โดยบริเวณ reactive site ที่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อชักนำด้วยสาร EMS ได้แก่ ตำแหน่ง *N-7* ตำแหน่ง O^6 (ภาพที่ 5) และตำแหน่ง *N-3* ของเบส guanine ตำแหน่ง *N-1* ตำแหน่ง *N-3* และตำแหน่ง *N-7* ของเบส adenine ตำแหน่ง O^2 ตำแหน่ง O^4 และตำแหน่ง *N-3* ของเบส thymine ตำแหน่ง O^2 และตำแหน่ง *N-3* ของเบส cytosine และหมู่ฟอสเฟตของ DNA backbone (Sega, 1984)



ภาพที่ 6 ตำแหน่งการเกิด mutagenesis ด้วยสาร EMS (Klug and Cummings, 1997)

จากข้อมูลทางด้านพันธุศาสตร์ที่ศึกษาในจุลินทรีย์ (microorganisms) พบว่า สาร EMS สามารถเปลี่ยนลำดับเบสจาก GC ไปเป็น AT และเปลี่ยน AT ไปเป็น GC ได้ ในบางกรณีสาร EMS สามารถทำให้เกิดการเพิ่ม (insertion) หรือลด (deletion) จำนวนเบสได้ดีมากกว่าการเกิดการลดของเบสบางตัวภายในยีน (intragenic deletions) ในสิ่งมีชีวิตที่สูงกว่าจุลินทรีย์พบว่าสาร EMS สามารถที่จะตัดโครโมโซมผ่านกระบวนการบางอย่างได้ แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าคือกระบวนการใด ทฤษฎีโดยทั่วไปอธิบายว่าดีเอ็นเอถูกเติมหมู่เอธิลที่ตำแหน่งของเบสโดยสาร EMS ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นตำแหน่ง *N-7* ของเบส guanine เกิดปฏิกิริยา hydrolysis เพิ่มขึ้นอย่างช้า จากเอนไซม์ deoxyribose บนโครงสร้าง DNA backbone เหลือโครงสร้างของ apurinic หรืออาจเป็น

apyrimidinic site ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่เสถียร และทำให้เกิดการหลุดออกของสายคู่ดีเอ็นเอ (Sega, 1984)

4.2 ตัวอย่างการใช้สาร EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา

การใช้สาร EMS ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในราพบได้อย่างแพร่หลาย เช่น การชักนำให้รา *Metarhizium anisopliae* ผลิตกรดออกซาลิก (Leger, Nelson, and Screen, 1999) หรือการชักนำให้รา *Saccharomyces cerevisiae* ไวต่อการตอบสนองต่ออุณหภูมิ (Momose and Gregory, 1998) การชักนำให้รา *Volvariella volvacea* ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35°C สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 16°C (Liu et al., 2011) การชักนำให้รา *Volvariella volvacea* ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง สามารถสร้าง fruiting body ได้ที่อุณหภูมิ 10°C (Zhu et al., 2016) การชักนำให้ *Aspergillus oryzae* สร้างสารที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ Methicillin ได้ (Leonard, Brown, and Hayman, 2013) ชักนำให้ *Aspergillus brasiliensis* สายพันธุ์กลายมีการผลิตเอนไซม์ xylanase ได้ในปริมาณที่มากขึ้น (Ho and Ho, 2015) และชักนำให้ *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์กลายมีการผลิตเอนไซม์ amylase ในปริมาณสูง (Abdullah et al., 2013) เป็นต้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 การแยกราจากแมลง

1.1 การเก็บตัวอย่างซากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

เก็บซากตัวอย่างเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลที่ตาย และพบเส้นใยราสีขาวปกคลุมอยู่ จากแปลงข้าวของเกษตรกรและศูนย์วิจัยข้าวในจังหวัดชัยนาท อย่างน้อยจำนวน 100 ตัว ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้แมลงแห้งโดยการใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชูนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 1 ชั้น ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1-2 วัน จนกว่าแมลงจะแห้ง

1.2 การแยกราให้บริสุทธิ์จากซากแมลง

แยกราจากซากแมลง ดัดแปลงวิธีของ (Goettlel and Inglis, 1997) โดยนำซากแมลงที่แห้งแล้วในจานเลี้ยงเชื้อ ฆ่าเชื้อด้วย 0.025% โซเดียมไฮเปอร์คลอไรด์ เป็นเวลา 1 นาที และ 70% เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับบนกระดาษกรองที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำกระดาษกรองที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ พรมด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วพอหมาด นำซากแมลงไปวางบนกระดาษกรองที่เตรียมไว้ ปิดจานเพาะเชื้อและบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3-5 วัน หมั่นพรมน้ำ หากพบว่ากระดาษกรองเริ่มแห้ง สังเกตลักษณะของเส้นใยของราที่เกิดขึ้นบนตัวของแมลง ทำการย้ายแมลงที่แสดงเส้นใยของราสีขาว ลงในอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่ผสม 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของ dodine (SDA-D50) ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 25°C สังเกตการเจริญเติบโตของโคโลนีรา ลักษณะเส้นใย และสปอร์ที่ได้ทุกวัน หากพบว่าราที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำการย้ายโคโลนีของราไปเลี้ยงในอาหาร SDA-D50 บนจานเลี้ยงเชื้อใหม่จนกว่าจะได้ราบริสุทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลองที่ 2 การระบุชนิดของรา

2.1 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เลี้ยงราบริสุทธิ์ที่แยกได้จากซากแมลงในขั้นตอนก่อนหน้าลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ 25°C เป็นระยะเวลา 7-14 วัน ศึกษาลักษณะ และสีของโคโลนีราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำการเขี่ยเส้นใย และสปอร์ของรามาส่องใต้กล้องแบบใช้แสง วัดขนาดของเส้นใย โครงสร้างที่สร้างสปอร์ และสปอร์ ทำการระบุชนิดของราที่แยกได้โดยใช้ identification keys ของ Humber (2005: Online) และ Rehner et al. (2011) เนื่องจากไม่ประสบความสำเร็จในการ

แยก *B. bassiana* ในการทดลองนี้ (คำอธิบายอยู่ในผลการทดลอง) จึงขอความอนุเคราะห์ *B. bassiana* จากกรมการข้าว 6 ไอโซเลท และทำการระบุชนิดของราเพื่อยืนยันอีกครั้ง

2.2 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

ผลจากการระบุชนิดของราที่แยกได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็น *B. bassiana* จำนวน 6 ไอโซเลท (ภาคผนวก ข) ทำการระบุชนิดของ *B. bassiana* ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชนิดของรา โดยใช้ *B. bassiana* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จำนวน 1 ไอโซเลท จากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ จำนวน 1 ไอโซเลท และจากกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จำนวน 1 ไอโซเลท เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และ รา *Metarhizium* spp. และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* และ *X. oryzae* pv. *oryzicola* ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นตัวควบคุมเชิงลบ เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่เลือกจำเพาะกับ *B. bassiana* และไม่พบในราชนิดอื่นหรือในแบคทีเรีย

นำราที่ระบุชนิดว่าเป็น *B. bassiana* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา มาเลี้ยงเพื่อสกัดดีเอ็นเอ โดยดัดแปลงวิธีของ Carneiro et at. (2008) และ Safavi (2010) ด้วยการเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Agar + Yeast extract (SDAY) เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหาร Sabouraud Dextrose Broth ผสม Yeast extract (SDBY) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 27°C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าจำนวน 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4-7 วัน นำสารแขวนลอยราที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 เพื่อแยกเส้นใยกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเส้นใยรามาบดในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียด จากนั้นย้ายผงเส้นใยราที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอต่อไป เติมสารละลาย TES ปริมาตร 450 ไมโครลิตร 20% cethyl trimethylammonium bromide (CTAB) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่ใส่ผงเส้นใยรา นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 1 เท่าของ supernatant ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของ supernatant ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของ supernatant แล้วล้างดีเอ็นเอด้วย 70% (v/v) ethanol 2 รอบ ทำการตากผลึกดีเอ็นเอให้แห้ง และละลายผลึกดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย Nanodrop spectrophotometer รุ่น ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc., USA)

ระบุลักษณะทางชีววิทยาโมเลกุลด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งของยีน translation elongation factor 1 alpha (EF1-**α**) ตามวิธีของ (Johny and Kyei-Poku, 2014) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์แต่ละชนิด (EFFO; 5'-TCG ACC TCG ACG AGC AAT ACA TAC TG-3' และ EFRO; 5'-GAT ACG ACG AAA AAA AAT TTG CGC AG-3') 1X PCR Master mix (Promega Corporation, USA) และ 20 นาโนกรัมของดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกที่ 94°C เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที 60°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72°C เป็นเวลา 10 นาที ผลของปฏิกิริยาจะทำให้เห็นภาพด้วยวิธี อิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) (Gel Doc 2000, Bio-Rad, USA) ใน 1.5% วุ้นอะกาโรส โดยมี low molecular weight เป็นตัวเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอ ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ และทำการหาลำดับนิวคลิโอไทด์โดยบริษัท Bio basic Inc. ประเทศแคนาดา เปรียบเทียบลำดับของนิวคลิโอไทด์กับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank โดยใช้โปรแกรม the BLASTn algorithm

การทดลองที่ 3 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของ *B. bassiana*

วางแผนการทดลองแบบการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) 3 ซ้ำ ทำการเลี้ยงราทั้ง 6 ไอโซเลท (BCNT001-BCNT006) บนอาหาร PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 31 33 และ 35°C แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 24 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1-6 ราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ตามลำดับ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 7-12 ราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 บ่มที่อุณหภูมิ 31°C ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 13-18 ราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 บ่มที่อุณหภูมิ 33°C ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 19-24 ราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 บ่มที่อุณหภูมิ 35°C ตามลำดับ

เปรียบเทียบขนาดของโคโลนีและปริมาณสปอร์ของราแต่ละไอโซเลทที่เลี้ยงในอุณหภูมิต่าง ๆ โดยเก็บข้อมูลในวันที่ 7 และ 14 หลังจากการบ่ม (ดัดแปลงจาก Fargues et al., 1997)) โดยวัดขนาดโคโลนีของราด้วยไม้บรรทัด และนับปริมาณสปอร์จากสารแขวนลอยสปอร์ของราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วย hemocytometer เพื่อคัดเลือกไอโซเลทของราที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง นำไปพัฒนาประสิทธิภาพโดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมีในขั้นถัดไป เพื่อให้ได้ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิสูงยิ่งขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

การทดลองที่ 4 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา *B. bassiana*

4.1 รา และแมลงที่ใช้ในการทดลอง

ราที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ *B. bassiana* ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจำนวน 6 ไอโซเลท (BCNT001-BCNT006) และจากกรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นจำนวน 1 ไอโซเลท (BDOAE001) และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ภาคผนวก ข)

4.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา

วางแผนการทดลองแบบการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) 3 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของราที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร ตามวิธีของเอกรัฐ ปั่นกำจร, สมเกียรติ ปั้นแตง และกฤษณา บุญศิริ (2555) ทำการผสมสปอร์ของราในสารละลาย 0.05% (v/v) Tween 80 ของราทั้ง 6 ไอโซเลท แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 8 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT001

ชุดการทดลองที่ 2 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT002

ชุดการทดลองที่ 3 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT003

ชุดการทดลองที่ 4 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT004

ชุดการทดลองที่ 5 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT005

ชุดการทดลองที่ 6 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT006

ชุดการทดลองที่ 7 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BDOAE001

ชุดการทดลองที่ 8 สารละลาย 0.05% (v/v) Tween 80 (ชุดควบคุม)

จากนั้นฉีดพ่นสารแขวนลอยสปอร์ลงบนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะตัวอ่อน วัย 4-5 จำนวน 60 ตัว แล้วปล่อยแมลงลงไปในกรงที่มีข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 อายุประมาณ 15 วัน (ดัดแปลงจาก Li et al. (2014)) เก็บซากแมลงและบันทึกการตายของแมลงทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน เพื่อคำนวณประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงของราแต่ละไอโซเลท ด้วยการหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Schneider-Orelli's formula (Valk, 2007)

เปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงที่พบรา

$$= \frac{\%\ \text{การตายของแมลงจากชุดทดลองสารแขวนลอยสปอร์รา} - \%\ \text{การตายจากชุดควบคุม}}{100 - \%\ \text{การตายจากชุดควบคุม}} \times 100$$

4.3 ระบุชนิดของราที่แยกได้จากแมลงหลังการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา

การระบุชนิดของราที่แยกได้จากซากแมลงที่ตาย เพื่อยืนยันว่าแมลงที่ตายนั้น ตายเพราะราที่ฉีดพ่นไป เริ่มจากทำการ re-isolation ราจากซากแมลงที่เก็บ ตามวิธีที่ 1.2 และตรวจสอบราที่ก่อ

โรคจากซากของแมลงจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะโครงสร้างที่สร้างสปอร์ และสปอร์ โดยใช้ identification keys ของ Humber (2005: Online) และ Rehner et al. (2011)

การทดลองที่ 5 การชักนำให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* โดยใช้สารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS) (ดัดแปลงวิธีของ Ho and Ho (2015))

เนื่องจากความสามารถในการเจริญเติบโตของราแต่ละไอโซเลทที่แยกได้ (BCNT001-BCNT006) มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อุณหภูมิสูงจากผลการทดลองที่ 3 จึงทำการเลือกราที่นำมาชักนำให้ก่อการกลายพันธุ์จากผลของประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้ดีที่สุด จำนวน 3 ไอโซเลท จากผลการทดลองที่ 4 เนื่องจากวิธีการคำนวณประสิทธิภาพของราในครั้งแรก โดยการนำจำนวนแมลงที่พบการเจริญของ *B. bassiana* ในแต่ละไอโซเลท หลังจากทำการ re-isolation ตามวิธีที่ 1.2 พบว่าราไอโซเลท BCNT001-BCNT003 มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงที่สูงสุดเป็น 3 อันดับแรก จึงได้เลือกราไอโซเลท BCNT001 ถึง BCNT003 มาใช้ศึกษาในขั้นตอนนี้

ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* โดย EMS แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ทำการหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่ทำให้สปอร์ของ *B. bassiana* มีอัตราการตายที่มากกว่า 80% เมื่อกำหนดให้ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มสปอร์รากับสาร EMS คงที่ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สาร EMS ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* และส่วนที่ 2 คือการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แก่ราโดยใช้ความเข้มข้นที่ได้จากส่วนที่ 1 มาทดสอบ

5.1 การหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

นำราจำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCNT001 และ BCNT002 ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 25°C เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของราแต่ละไอโซเลทที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติมสารละลายสปอร์ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลาย EMS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2% (v/v) (Zhu et al., 2016) ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่บรรจุสารแขวนลอยสปอร์ของรา โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 12 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1-2 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT002 เติม sodium phosphate buffer pH 7 ตามลำดับ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 3-4 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001- BCNT002 เติม 0.3% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 5-6 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT002 เติม 0.5% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 7-8 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT002 เติม 1.0% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 9-10 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT002 เติม 1.5% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 11-12 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT002 เติม 2.0% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ทั้งหมดไปบ่มที่ 30°C เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นระยะเวลา 10 นาที เทสารละลายออก ล้าง pellet ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการละลาย pellet ด้วย sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น $1x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงบน PDA ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 7 วัน นับจำนวนโคโลนีที่ได้ในแต่ละความเข้มข้น เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม

5.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรา 3 ไอโซเลท (BCNT001-BCNT003)

โดยเลี้ยงราในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 25°C เป็นระยะเวลา 14 วัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของราแต่ละไอโซเลทที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร เติมสารละลายสปอร์ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ จากนั้นเติมสารละลาย EMS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.5 และ 1.0% (v/v) (จากผลการทดลองที่ 5.1) ในสารละลาย sodium phosphate buffer pH 7 ลงในหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ที่บรรจุสารแขวนลอยสปอร์ของรา โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 9 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1-3 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT003 เติม sodium phosphate buffer pH 7 ตามลำดับ (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 4-6 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT003 เติม 0.5% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 7-9 สารแขวนลอยสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT003 เติม 1.0% (v/v) ของ EMS ตามลำดับ

นำหลอดไมโครเซนทริฟิวจ์ทั้งหมดไปบ่มที่ 30°C เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,500 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นระยะเวลา 10 นาที เทสารละลายออก ล้าง pellet ด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ทำการละลาย pellet ด้วย sodium phosphate buffer pH 7 ปริมาตร

900 ไมโครลิตร จากนั้นทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้นของสปอร์เป็น $1x10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ไปเกลี่ยลงบน PDA ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยราในแต่ละโคโลนีด้วย cock borer นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 31 33 และ 35°C เป็นระยะเวลา 7 วัน วัดขนาดของโคโลนีราสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับโคโลนีของราต้นแบบ เลือกโคโลนีของราสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญได้ดีกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิสูง มาตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราในลำดับถัดไป

การทดลองที่ 6 การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ชักนำการก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS

นำราสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญได้ดีกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิสูงมาแยกความเหมือนหรือความแตกต่างของแต่ละไอโซเลท จากลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD (Carneiro et al., 2008) ด้วยไพรเมอร์ 5 ไพรเมอร์ (Bio Basic Canada Inc., Canada) ได้แก่ OPA02: TGC CGA GCT G OPA03: AGT CAG CCA G OPA09: GGG TAA CGC C OPA13: CAG CAC CCA C และ OPZ13: GACTAAGCCC โดยทำการจับคู่ไพรเมอร์ดังนี้ OPA02xOPA02 OPA03xOPA03 OPA09xOPA09 OPA13xOPA13 OPZ13xOPZ13 OPA02xOPA03 OPA02xOPA09 OPA02xOPA13 OPA02xOPZ13 OPA03xOPA09 OPA03xOPA13 และ OPA03xOPZ13 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Carneiro et al., 2008) มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วยไพรเมอร์แต่ละชนิด ปริมาตร 0.4 ไมโครโมลาร์ 1X PCR Master mix (Promega Corporation, USA) และ 25 นาโนกรัมของดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสจะเริ่มจากการแยกดีเอ็นเอสายคู่ออกที่ 94°C เป็นเวลา 15 วินาที จากนั้นให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่ 94°C เป็นเวลา 15 วินาที 36°C เป็นเวลา 30 วินาที และ 72°C เป็นเวลา 1 นาที โดยทำซ้ำทั้ง 3 ขั้นตอนนี้ 40 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72°C เป็นเวลา 7 นาที ผลของปฏิกิริยาจะทำให้เห็นภาพด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) ใน 1.5% วุ้นอะกาโรส โดยมี low molecular weight และ 1 kb เป็นตัวเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอ เปรียบเทียบรูปแบบของดีเอ็นเอของราต้นแบบกับราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS

การทดลองที่ 7 การทดสอบคุณสมบัติของ *B. bassiana* ที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง

นำ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายที่ได้ และราไอโซเลทต้นแบบ มาศึกษาคุณสมบัติของราเมื่ออยู่ในภาวะอุณหภูมิสูง จากผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS พบว่ามีราสายพันธุ์กลายเพียง 1 ไอโซเลท มีการเจริญของเส้นใยที่มากกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 33°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่ราสามารถเจริญได้จากการทดลองครั้งนี้

ทำการเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของราสายพันธุ์กลายและราต้นแบบ โดยการนำราทั้ง 2 ไอโซเลท ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 และ 33°C เป็นเวลา 14 วัน โดยทำการวัดขนาดโคโลนี และปริมาณสปอร์ของราในวันที่ 7 และ 14 โดยวัดขนาดโคโลนีของราด้วยไม้บรรทัด และนับปริมาณสปอร์จากสารแขวนลอยสปอร์ของราที่เลี้ยงบนอาหาร PDA ด้วย hemocytometer จากผลการทดสอบ พบว่าราสายพันธุ์กลายมีอัตราการเจริญที่อุณหภูมิ 33°C ค่อนข้างต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C จึงได้ปรับวิธีการทดสอบเป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการฟื้นฟูตนเองของราหลังจากอยู่ในภาวะอุณหภูมิสูง โดยนำราสายพันธุ์กลาย และราต้นแบบมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 33°C เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการวัดขนาดโคโลนี และปริมาณสปอร์ของราในวันที่ 7 และ 14 และวัดเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ของราสายพันธุ์กลายเปรียบเทียบกับราต้นแบบ โดยการนำราสายพันธุ์กลาย และราต้นแบบไปเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose broth (PDB) ที่อุณหภูมิ 33°C โดยหลังจากการบ่มเป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน ทำการนับจำนวนสปอร์ที่งอก จากนั้นย้ายไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 25°C เป็นระยะเวลา 5 วัน และทำการนับจำนวนสปอร์ที่งอกทุกวัน คำนวณเปอร์เซ็นต์ของสปอร์ที่งอก และวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics (ver. 17.0, SPSS Inc., USA)

การทดลองที่ 8 ทดสอบความสามารถในการควบคุมแมลงของ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกแล้ว

8.1 รา และแมลงที่ใช้ในการทดลอง

B. bassiana สายพันธุ์กลายได้จากการทดลองครั้งนี้ และราไอโซเลทต้นแบบ และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

8.2 การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของรา

วางแผนการทดลองแบบการทดลองที่มีแผนแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design; RCBD) 3 ซ้ำ เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของราที่ความเข้มข้น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร ตามวิธีของเอกรัฐ ปั่นกำจร, สมเกียรติ ปั้นแตง และกฤษณา บุญศิริ (2555) โดยทำการผสมสปอร์ของราในสารละลาย 0.05% (v/v) Tween 80 โดยกำหนดให้ BCNT002WT แทนไอโซเลทต้นแบบ และ BCNT002MT แทนไอโซเลทสายพันธุ์กลาย แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1-3 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT002WT ความเข้มข้น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 4-6 สารแขวนลอยสปอร์ของไอโซเลท BCNT002MT ความเข้มข้น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 7 สารละลาย 0.05% (v/v) Tween 80 (ชุดควบคุม)

จากนั้นฉีดพ่นลงบนเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระยะตัวอ่อน วัย 4-5 จำนวน 60 ตัว แล้วปล่อยแมลงลงไปในกรงที่มีข้าวพันธุ์ไทซุงเนทีฟ 1 อายุประมาณ 15 วัน (ดัดแปลงจาก Li et al. (2014)) เก็บซากแมลงและบันทึกการตายของแมลงทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน เพื่อคำนวณประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงของราแต่ละไอโซเลท ด้วยการหาเปอร์เซ็นต์ตายที่แท้จริงของแมลงด้วย Schneider-Orelli's formula (Valk, 2007) ดังที่แสดงไว้ในข้อ 4.2

8.3 ระบุชนิดของราที่แยกได้ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำตามวิธีในข้อ 2.1

8.4 คำนวณค่าความเข้มข้นของสปอร์ราที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (Lethal concentration to 50% mortality: LC50) และเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (Lethal time to 50% mortality: LT50)

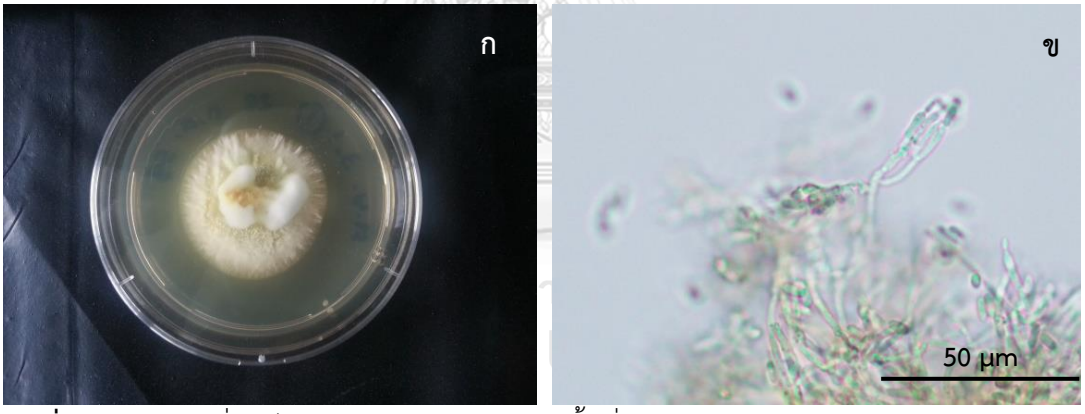
คำนวณหาค่าความเข้มข้นของสปอร์ราที่ทำให้แมลงศัตรูข้าวตายร้อยละ 50 (Lethal concentration to 50% mortality: LC50) และเวลาที่ทำให้แมลงศัตรูข้าวสำคัญตายร้อยละ 50 (Lethal time to 50% mortality: LT50) ของราสายพันธุ์กลายด้วย probit analysis ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics (ver. 17.0, SPSS Inc., USA) (Throne et al., 1995; Akmal et al., 2013)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการศึกษา

1. การแยกราจากแมลง และการระบุชนิดของรา

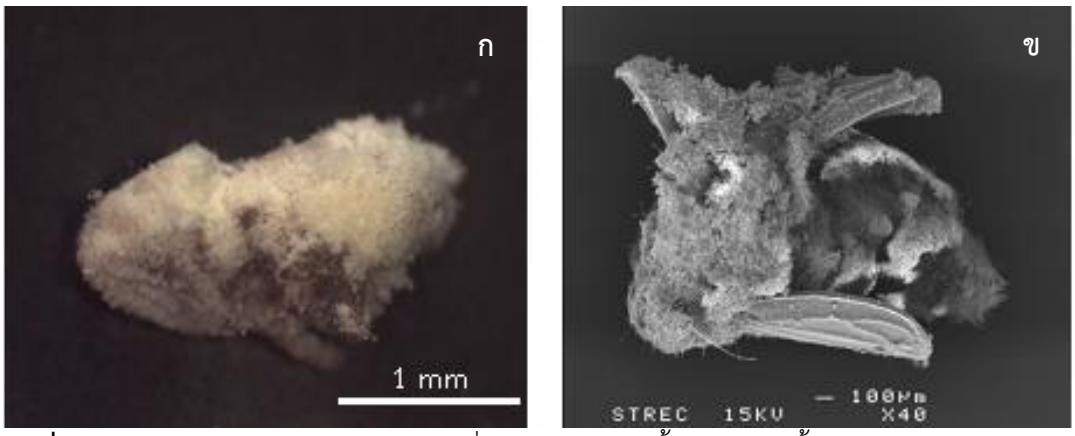
เก็บแมลงที่มีเส้นใยสีขาวของราปกคลุมจากแปลงนาในพื้นที่ของจังหวัดชัยนาท นำมาแยกรา พบเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมตัวแมลงหลังจากบ่มประมาณ 3-5 วัน หลังจากบ่มไปประมาณ 5-7 วัน ลักษณะโคโลนีเริ่มเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมเขียวหรือสีเขียว เมื่อทำ slide culture เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่แยกได้ พบว่าราที่แยกได้ทั้งหมดเป็น *Metarhizium* spp. มีลักษณะบนอาหาร SDA ผสม Dodine และลักษณะสปอร์ ดังภาพที่ 7 ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในแมลงเช่นกัน แต่ไม่พบ *B. bassiana* จึงได้ขอความอนุเคราะห์ *B. bassiana* ที่แยกได้จากแปลงนาในพื้นที่ของจังหวัดชัยนาท จากกรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BCNT001 BCNT002 BCNT003 BCNT004 BCNT005 และ BCNT006 (ภาคผนวก ข) ซึ่งมีลักษณะที่เจริญบนแมลงดังภาพที่ 8 และลักษณะเส้นใยดังภาพที่ 9



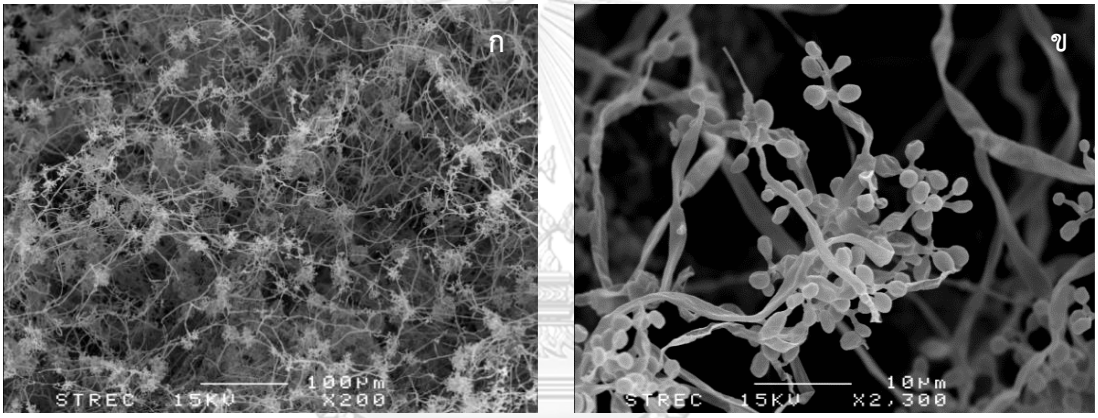
ภาพที่ 7 ตัวอย่างราที่แยกได้จากแมลงในแปลงนาในพื้นที่ของจังหวัดชัยนาท

ก. โคโลนีราบนอาหาร SDA ผสม Dodine 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข. โครงสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



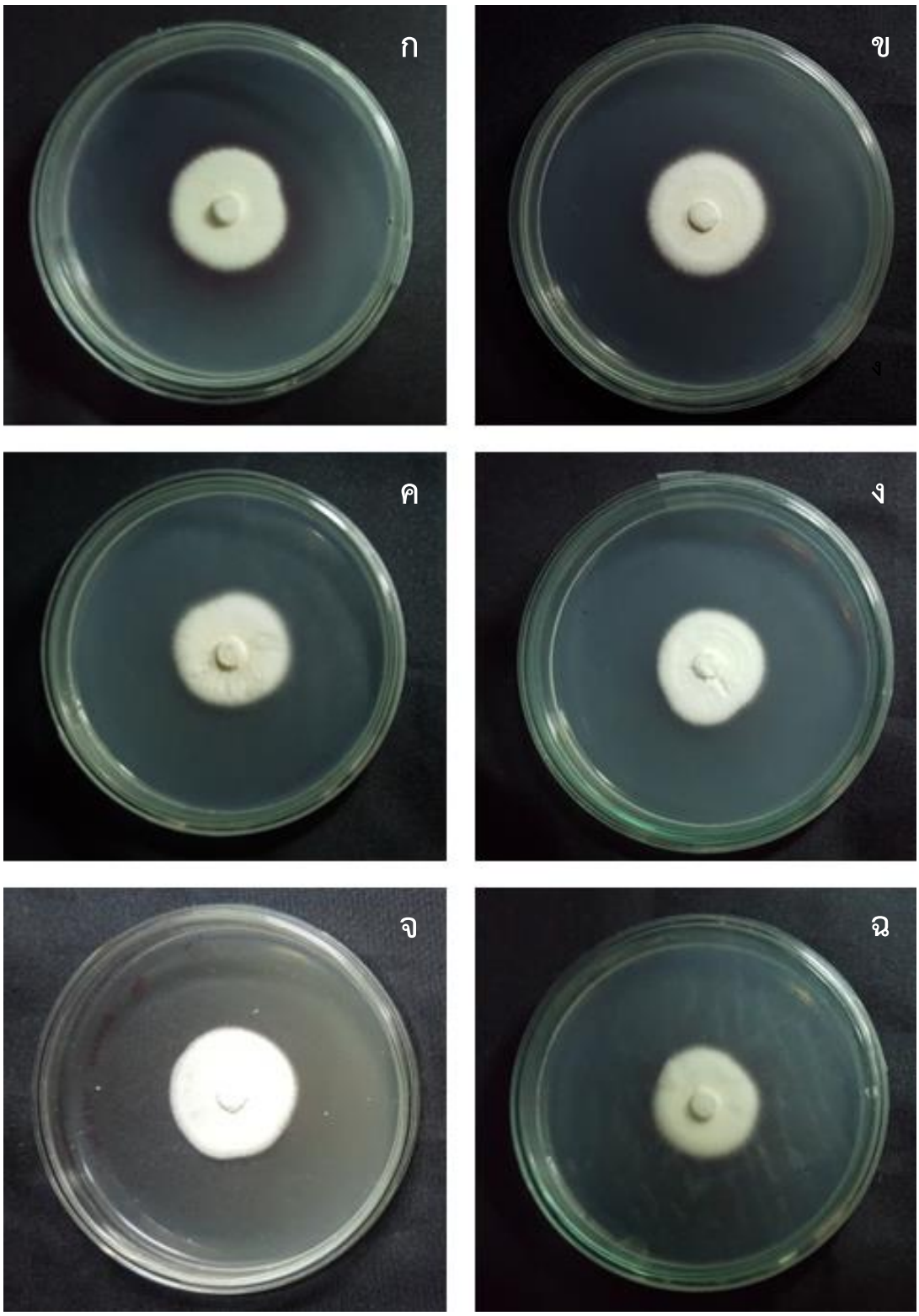
ภาพที่ 8 ลักษณะของเส้นใย *B. bassiana* ที่เจริญปกคลุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล:
ก. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ข. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน



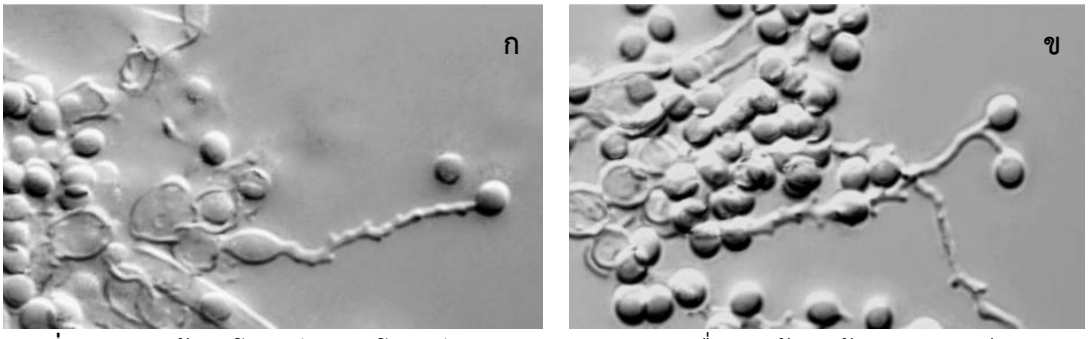
ภาพที่ 9 ลักษณะของเส้นใยและสปอร์ (โคนิเดีย) ของ *B. bassiana* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน: ก. กำลังขยาย 200 เท่า ข. กำลังขยาย 2,300 เท่า

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

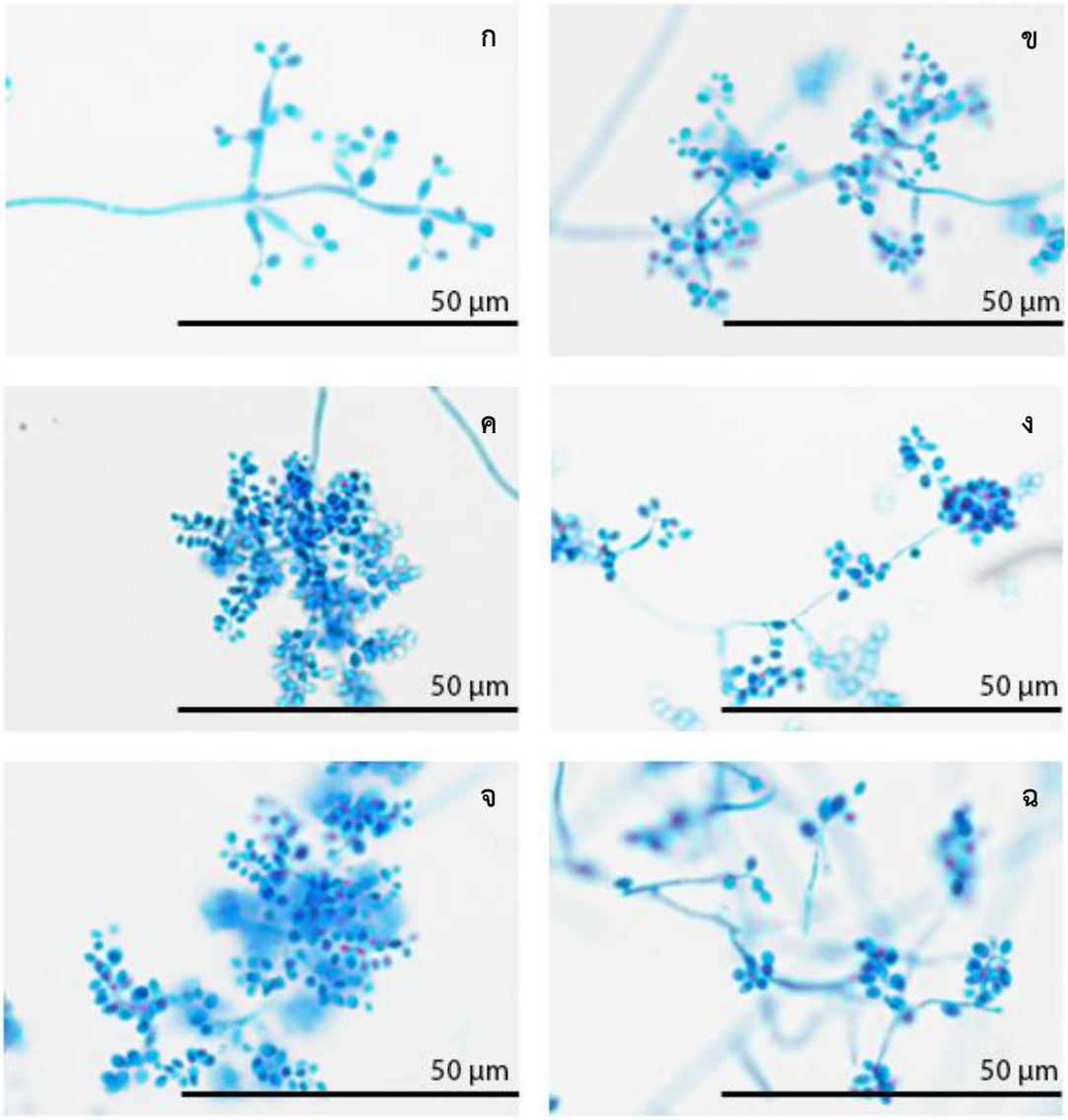
ระบุชนิดของ *B. bassiana* ที่ได้รับจากกรมการข้าวโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าราทั้ง 6 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนีสีขาวถึงครีมบนอาหาร PDA (ภาพที่ 10) สปอร์มีลักษณะคล้ายผงแป้งสีขาว เมื่อทำ slide culture แล้วนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใยใสไม่มีสี มีผนังกั้น ลักษณะก้านชูโคนิเดียมีลักษณะซิกแซก ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของราในสกุล *Beauveria* โคนิเดียมีขนาดอยู่ในช่วง 1.5-3.5 ไมโครเมตร ระบุว่าเป็น *B. bassiana* (ภาพที่ 11-12)



ภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ บน PDA เมื่อเวลา 7 วัน
ก. ไอโซเลท BCNT001 ข. ไอโซเลท BCNT002 ค. ไอโซเลท BCNT003
ง. ไอโซเลท BCNT004 จ. ไอโซเลท BCNT005 ฉ. ไอโซเลท BCNT006



ภาพที่ 11ก.-ข. ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดีย ของ *B. bassiana* เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Rehner et al., 2011)

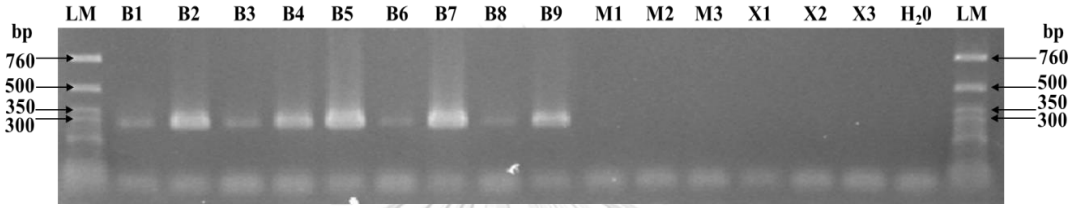


ภาพที่ 12 ลักษณะเส้นใย ก้านชูโคนิเดีย และโคนิเดียของรา

ก. ไอโซเลท BCNT001 ข. ไอโซเลท BCNT002 ค. ไอโซเลท BCNT003

ง. ไอโซเลท BCNT004 จ. ไอโซเลท BCNT005 ฉ. ไอโซเลท BCNT006

เมื่อทำการระบุชนิดของราด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล จากผลของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยคู่ไพรเมอร์ EFFO และ EFRO พบแถบดีเอ็นเอจำเพาะต่อ *B. bassiana* ขนาด 307 bp (Johny and Kyei-Poku, 2014) ปรากฏขึ้นในทุกไอโซเลทของ *B. bassiana* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ โดยที่ไม่พบแถบของดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวปรากฏขึ้นในไอโซเลทของ *Metarhizium* spp. และแบคทีเรีย *Xanthomonas oryzae* (ภาพที่ 13) จากผลการเปรียบเทียบลำดับของนิวคลิโอไทด์กับฐานข้อมูลใน NCBI GenBank พบว่า ราทั้ง 6 ไอโซเลท ระบุชนิดเป็น *B. bassiana* โดยมีเปอร์เซ็นต์เอกลักษณ์ (% identity) เท่ากับ 100% ซึ่งตรงกับผลจากการระบุด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

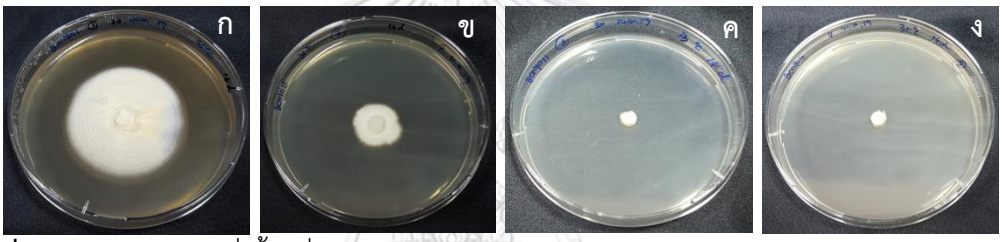


ภาพที่ 13 การระบุชนิดของ *B. bassiana* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ EFFO และ EFRO ซึ่งแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 307 bp ของ *B. bassiana*; เลน LM Low molecular weight DNA ladder, เลน B1-B9 *B. bassiana*: B1 BCNT001, B2 BCNT002, B3 BCNT003, B4 BCNT004, B5 BCNT005, B6 BCNT006, B7 TISTR3617, B8 BCC22355, และ B9 BDOAE001, เลน M1-M3 *Metarhizium* spp.: M1 MNBKK039, M2 MNBKK040, และ M3 MNBKK037, เลน X1-X2 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*: X1 BB2014-288 และ X2 BB2014-292, เลน X3 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*: BLS2014-5 และ H_2O

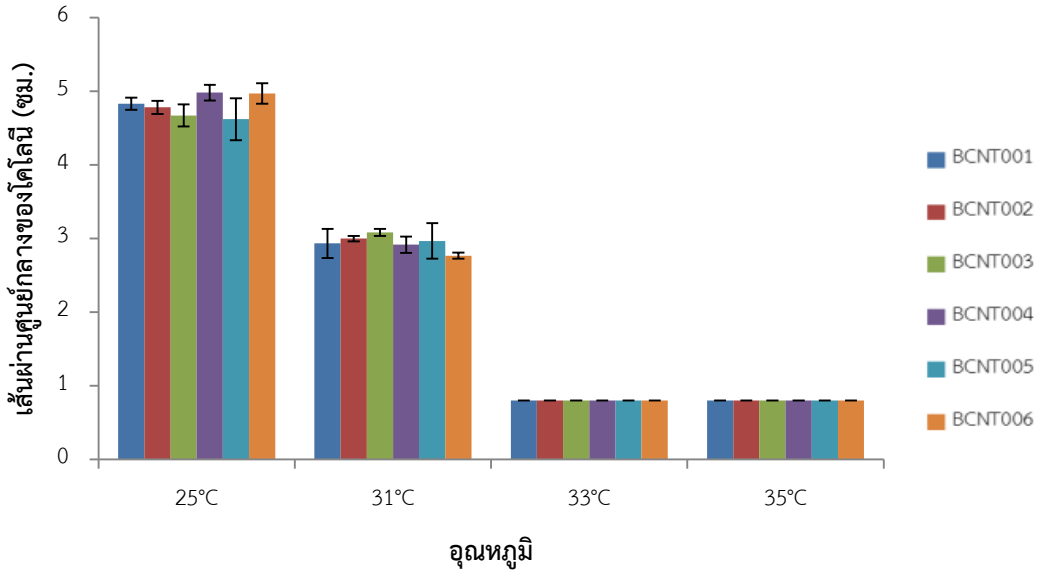
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2. การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของ *B. bassiana*

การทดสอบการเจริญของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรา เปรียบเทียบกับอุณหภูมิสูงที่ 31 33 และ 35°C ณ วันที่ 7 และ 14 ของการเลี้ยงรา พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของราทั้ง 6 ไอโซเลท มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละอุณหภูมิและทุกระยะเวลา (ภาพที่ 15 และภาคผนวก ก) แต่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมีขนาดลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น (ภาพที่ 14-15) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่ 25°C มีค่าประมาณ 3 และ 4 เซนติเมตร ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ ที่ 31°C มีค่าประมาณ 2 และ 3 เซนติเมตร ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 33 และ 35 °C ราทั้ง 6 ไอโซเลทไม่มีการเจริญของเส้นใย สังเกตจากขนาดโคโลนีที่ไม่เพิ่มขึ้นจากขนาดวุ้นเดิมที่วางลงไปบนอาหารเลี้ยงราทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางชิ้นวุ้นเท่ากับ 0.8 เซนติเมตร)

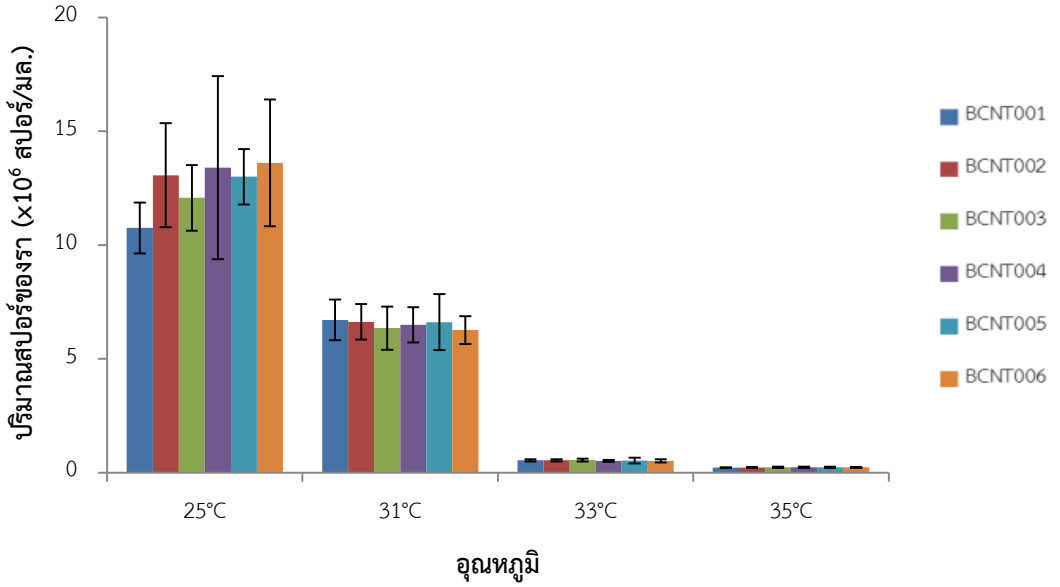


ภาพที่ 14ก.-ง. โคโลนีราที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 31 33 และ 35°C ตามลำดับ



ภาพที่ 15 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ

เมื่อวัดปริมาณสปอร์ของราพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกอุณหภูมิและทุกช่วงเวลา (ภาพที่ 16 และภาคผนวก ก) และปริมาณสปอร์ของราลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณสปอร์ที่ 25°C มีค่าประมาณ $6x10^6$ และ $1x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ ที่ 31°C มีค่าประมาณ $3x10^6$ และ $4x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร ในวันที่ 7 และ 14 ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 33 และ 35°C ราทั้ง 6 ไอโซเลทมีค่าประมาณ $1x10^5$ สปอร์/มิลลิลิตร ราทั้ง 6 ไอโซเลท มีการสร้างสปอร์ที่ลดลง ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี

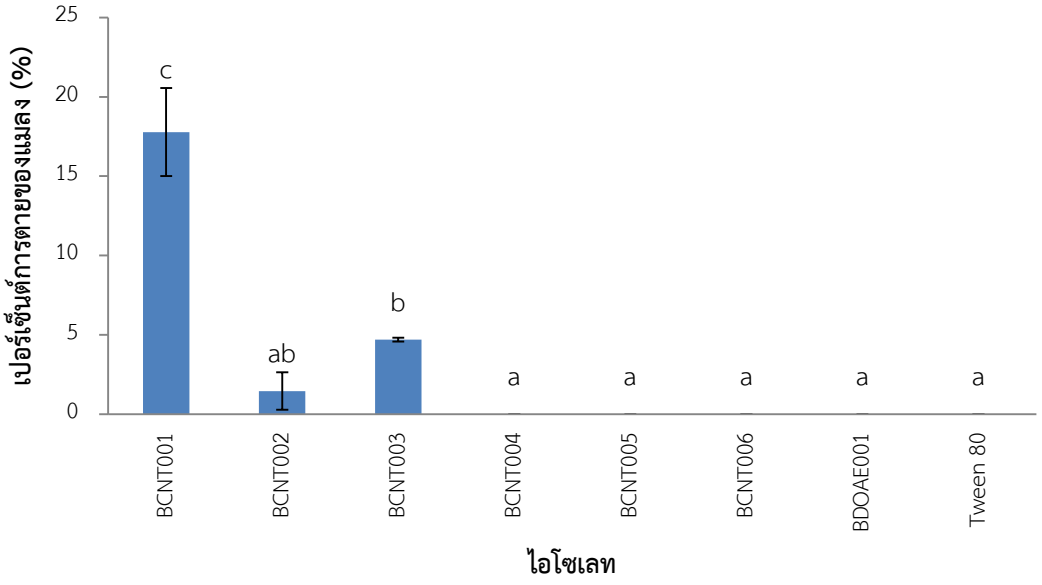


ภาพที่ 16 จำนวนสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 14 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

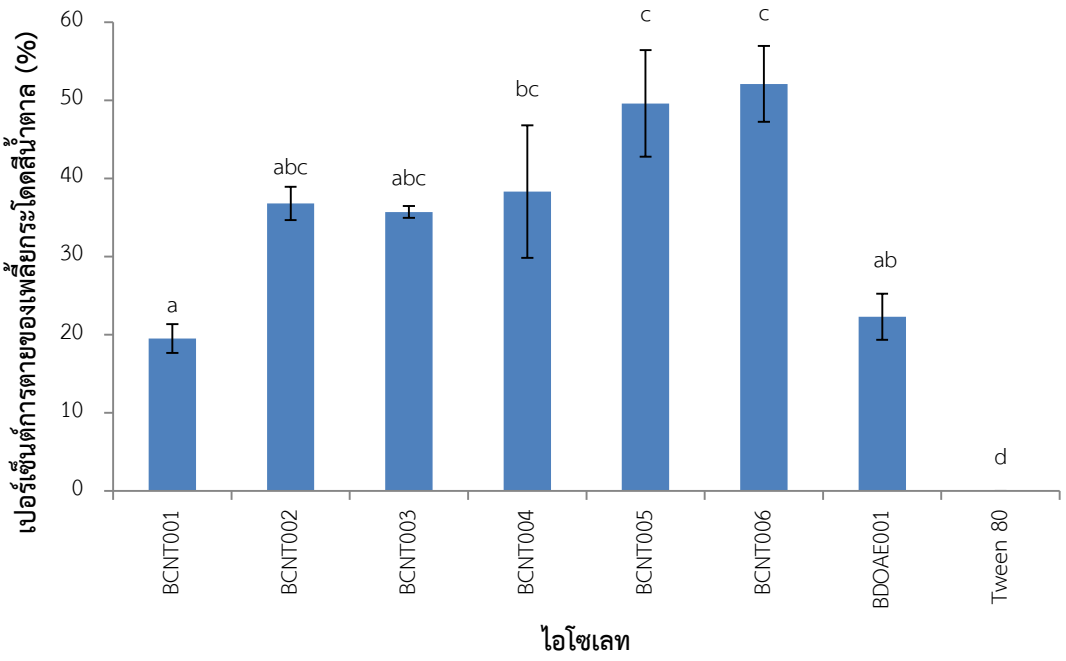
3. การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในแมลงของ *B. bassiana*

การทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของ *B. bassiana* ทำการทดสอบในช่วงวันที่ 17-31 สิงหาคม 2559 (อุณหภูมิเฉลี่ย 31.5±1.2°C, ความชื้นสัมพัทธ์ในทรงพุ่ม 76.8%) เนื่องจากวิธีการคำนวณประสิทธิภาพของราในครั้งแรก (ภาพที่ 17) โดยการนำจำนวนแมลงที่พบการเจริญของ *B. bassiana* ในแต่ละไอโซเลท หลังจากทำการ re-isolation พบว่าราไอโซเลท BCNT001 BCNT002 และ BCNT003 มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงที่สูงสุดเป็น 3 อันดับแรก จึงได้เลือกราไอโซเลท BCNT001-BCNT003 ไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS โดยไอโซเลท BCNT001 และ BCNT003 มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลได้ดีกว่าชุดควบคุม (Tween 80) และไอโซเลทที่กรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรใช้ (BDOAE001)



ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของรา *B. bassiana* แต่ละไอโซเลท ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

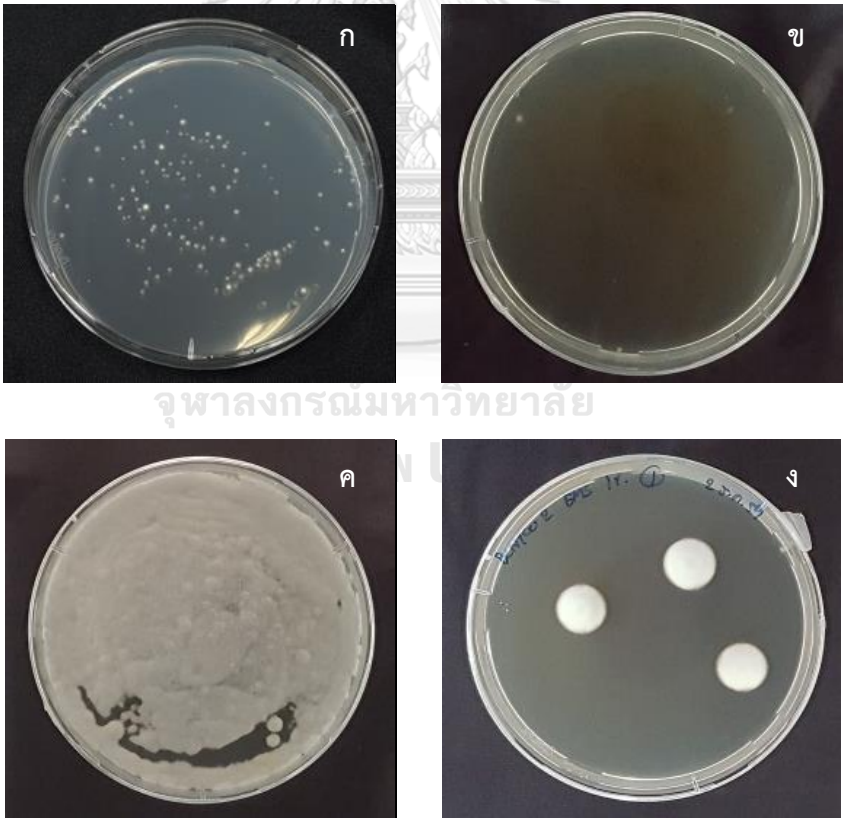
แต่ประสิทธิภาพของราที่คำนวณจากจำนวนแมลงที่พบการเจริญของ *B. bassiana* ในแต่ละไอโซเลท หลังจากทำการ re-isolation มีค่าที่ต่ำ จึงได้เปลี่ยนค่าที่ใช้ในการคำนวณ โดยใช้จำนวนแมลงที่ตายตั้งแต่วันที่ 4-14 วัน ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบว่ารามีการก่อโรคในแมลงและทำให้แมลงตายมาคำนวณแทน ด้วย Schneider-Orelli's formula เป็นการนำจำนวนแมลงที่ตายจากชุดทดลองสารแขวนลอยสปอร์รา ลบด้วยจำนวนแมลงที่ตายจากชุดควบคุมเพื่อหาจำนวนของแมลงตายที่เกิดจากราอย่างแท้จริงโดยไม่ได้ตายเพราะอุณหภูมิในกรงเลี้ยงที่สูงเกินไป หรือปัจจัยอื่นๆ ค่าที่คำนวณใหม่แสดงไอโซเลทของ *B. bassiana* ที่ได้รับมาจากกรมการข้าว จำนวน 5 ไอโซเลท (BCNT002-BCNT006) มีความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมากกว่าราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมส่งเสริมการเกษตร (BDOAE001) ซึ่งไอโซเลท BDOAE001 เป็นไอโซเลทที่ทางกรมส่งเสริมการเกษตรแนะนำให้เกษตรกรใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าวในประเทศไทย (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของรา *B. bassiana* แต่ละไอโซเลท ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

4. การชักนำให้เกิดการก่อการกลายพันธุ์ใน *B. bassiana* โดยใช้สารเอธิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate; EMS)

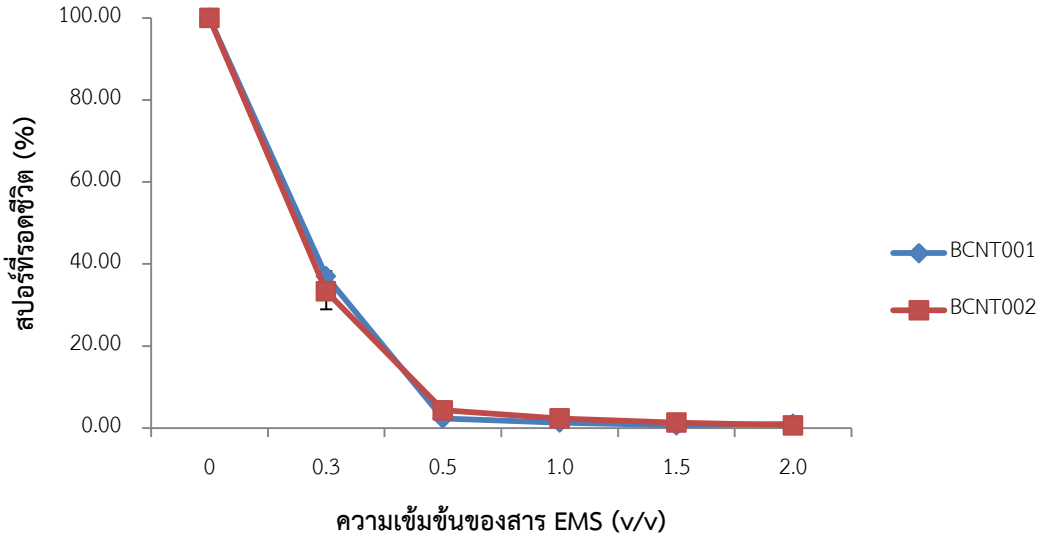
ผลการหาความเข้มข้นของสาร EMS ที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ พบว่าราทั้ง 2 ไอโซเลท มีสปอร์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกันในแต่ละความเข้มข้นของสาร EMS ดังแสดงในภาพที่ 19-20 โดยไอโซเลท BCNT001 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100.0 37.0 2.3 1.3 0.7 และ 1.0 ที่ความเข้มข้นสาร EMS 0.0 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท BCNT002 มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 100.0 33.3 4.3 2.3 1.3 และ 0.7 ที่ความเข้มข้นสาร EMS เท่ากับ 0.0 0.3 0.5 1.0 1.5 และ 2.0% ตามลำดับ โดยค่าความเข้มข้นของสาร EMS ที่ทำให้สปอร์ของ *B. bassiana* ที่บ่มที่ 30°C นาน 60 นาที ตายมากกว่า 80% อยู่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% ขึ้นไป จากข้อมูลที่ได้ดังกล่าวจึงทำการเลือกความเข้มข้นที่ 0.5 และ 1.0% (v/v) EMS สำหรับการศึกษาในลำดับถัดไป



ภาพที่ 19 โคโลนีราหลังทำการเกลี่ยสารแขวนลอยสปอร์ลงบนอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 25°C

ก. ชุดควบคุมหลังบ่ม 3 วัน ข. ชุดที่ทดสอบด้วย 1.0% (v/v) EMS หลังบ่ม 3 วัน

ค. ชุดควบคุมหลังบ่ม 7 วัน ง. ชุดที่ทดสอบด้วย 1.0% (v/v) EMS หลังบ่ม 7 วัน

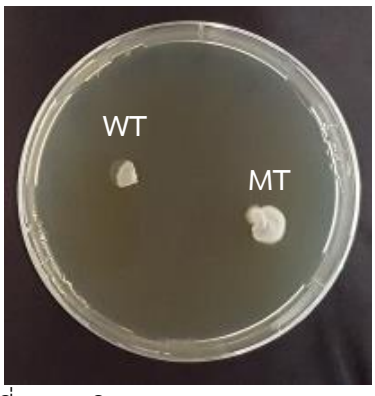


ภาพที่ 20 ผลของสาร EMS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการรอดชีวิตของสปอร์ของ *B. bassiana*

ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS (ตารางที่ 1) พบว่าสปอร์ราที่ได้รับสาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 1% มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์อยู่ในช่วง 7-9% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร EMS ที่อุณหภูมิ 25°C และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง พบเพียง 1 โคโลนี จาก *B. bassiana* ทั้งหมดที่นำมาทดสอบสาร EMS สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 33°C (ภาพที่ 21) ซึ่งมาจากราไอโซเลท BCNT002 ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ความเข้มข้น 0.5% ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิ 31°C พบราที่นำมาทดสอบด้วยสาร EMS สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตได้ แต่ราต้นแบบสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิดังกล่าวเช่นกัน และไม่พบโคโลนีของราที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 35°C

ตารางที่ 1 จำนวนโคโลนีของ *B. bassiana* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 31 33 และ 35°C เป็นระยะเวลา 7 วัน หลังจากได้รับสาร EMS

ไอโซเลท	ชุดควบคุม				0.5% EMS				1.0% EMS			
	25°C	31°C	33°C	35°C	25°C	31°C	33°C	35°C	25°C	31°C	33°C	35°C
BCNT001	300	300	0	0	29	23	0	0	27	17	0	0
BCNT002	300	300	0	0	31	22	1	0	22	13	0	0
BCNT003	300	250	0	0	24	12	0	0	22	14	0	0



ภาพที่ 21 ลักษณะโคโลนีที่เจริญที่อุณหภูมิ 33°C บนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน
โดยที่ WT = ราต้นแบบ (BCNT002WT) และ MT = ราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT)

5. การตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ชักนำการก่อการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS

ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์จำนวน 5 ไพรเมอร์ โดยจับคู่ทั้งหมด 12 รูปแบบ (แสดงในวิธีการศึกษา) พบว่ารูปแบบของแถบดีเอ็นเอของราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) แตกต่างกับราต้นแบบ (BCNT002WT) เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ 11 คู่ ดังนี้ OPA02xOPA02 OPA03xOPA03 OPA13xOPA13 OPZ13xOPZ13 OPA02xOPA03 OPA02xOPA09 OPA02xOPA13 OPA02xOPZ13 OPA03xOPA09 OPA03xOPA13 และ OPA03xOPZ13 และไม่แตกต่างเมื่อทดสอบด้วยคู่ไพรเมอร์ OPA09xOPA09 และ OPA13xOPA13 ดังแสดงในภาพที่ 22-24

โดยคู่ไพรเมอร์ OPA02xOPA02 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทต้นแบบแต่ไม่พบในไอโซเลทสายพันธุ์กลาย คือแถบดีเอ็นเอขนาด 1,000 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA13xOPA13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทต้นแบบแต่ไม่พบในไอโซเลทสายพันธุ์กลาย คือแถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 bp

คู่ไพรเมอร์ OPZ13xOPZ13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทต้นแบบแต่ไม่พบในไอโซเลทสายพันธุ์กลาย คือแถบดีเอ็นเอขนาด 600 และ 1,800 bp และแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 700 และ 800 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA02xOPA03 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 500 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA02xOPA09 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 250 และ 700 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA02xOPA13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

คู่ไพรเมอร์ OPA02xOPZ13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทต้นแบบแต่ไม่พบในไอโซเลทสายพันธุ์กลาย คือแถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp

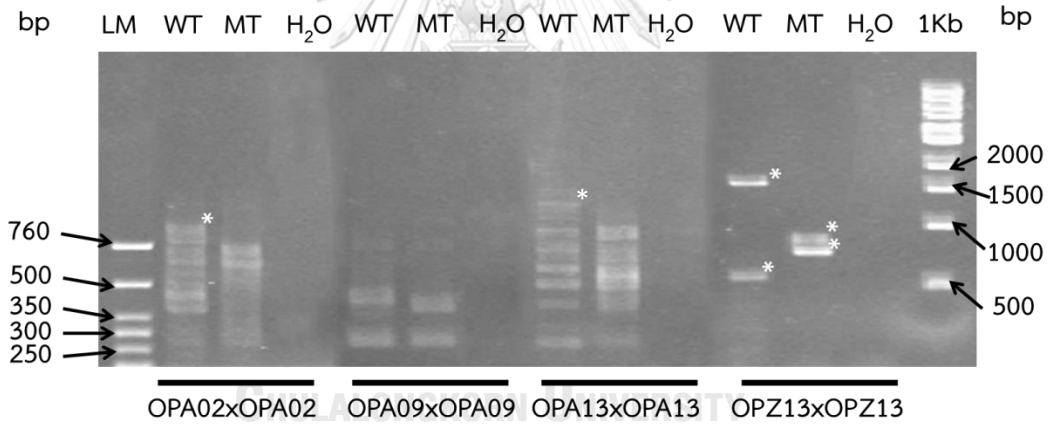
คู่ไพรเมอร์ OPA03xOPA03 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 370 และ 1,000 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA03xOPA09 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 600 และ 1,000 bp

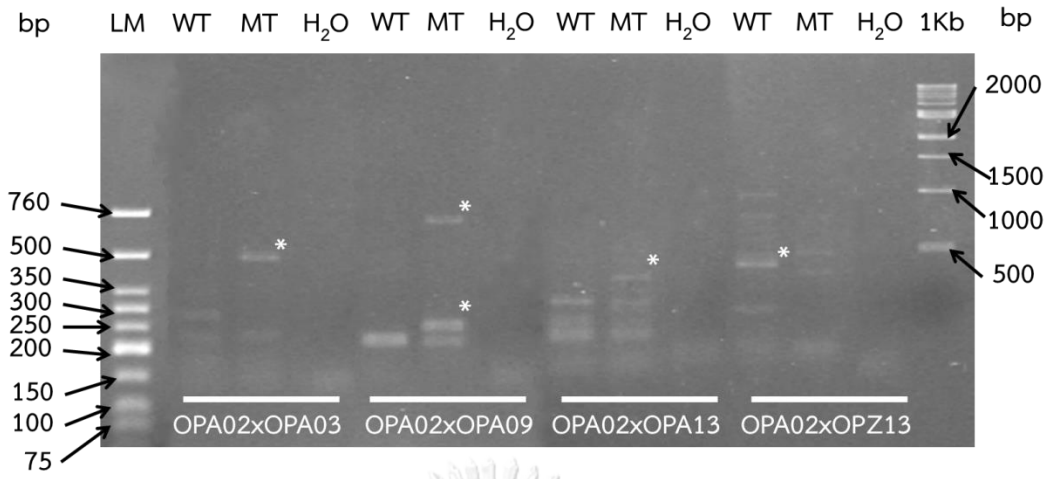
คู่ไพรเมอร์ OPA02xOPA13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทต้นแบบแต่ไม่พบในไอโซเลทสายพันธุ์กลาย คือแถบดีเอ็นเอขนาด 250 bp

คู่ไพรเมอร์ OPA03xOPZ13 พบแถบของดีเอ็นเอที่ปรากฏในไอโซเลทสายพันธุ์กลายแต่ไม่พบในไอโซเลทต้นแบบ คือแถบดีเอ็นเอขนาด 600 และ 1,000 bp

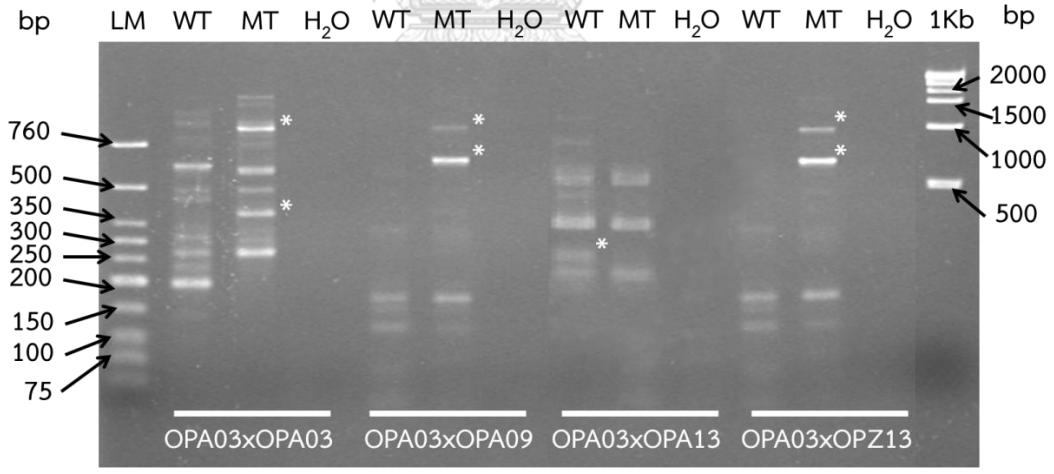
ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสของ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายเกิดจากการชักนำด้วยสาร EMS



ภาพที่ 22 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD โดยที่ BCNT002WT (WT), BCNT002MT (MT) และ H_2O; เลน 1 Low molecular weight DNA ladder (LM), เลน 2-4 OPA02xOPA02 เลน 5-7 OPA09xOPA09, เลน 8-10 OPA13xOPA13, เลน 11-13 OPZ13xOPZ13 และเลน 14 1 Kb ladder, โดยที่แถบดีเอ็นเอที่มีเครื่องหมาย * แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของราสายพันธุ์กลายและราต้นแบบ



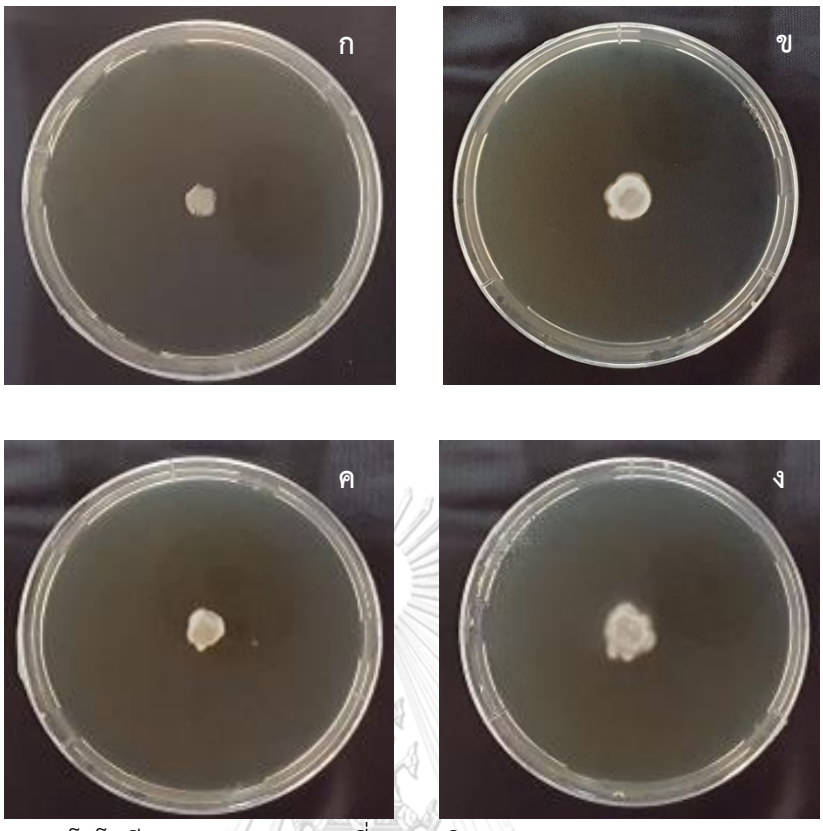
ภาพที่ 23 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD โดยที่ BCNT002WT (WT), BCNT002MT (MT) และ H_2O; เลน 1 Low molecular weight DNA ladder (LM), เลน 2-4 OPA02xOPA03 เลน 5-7 OPA02xOPA09, เลน 8-10 OPA02xOPA13, เลน 11-13 OPA02xOPZ13 และเลน 14 1 Kb ladder, โดยที่แถบดีเอ็นเอที่มีเครื่องหมาย * แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของราสายพันธุ์กลายและราต้นแบบ



ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบการกลายพันธุ์ของราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS ด้วยวิธี RAPD โดยที่ BCNT002WT (WT), BCNT002MT (MT) และ H_2O; เลน 1 Low molecular weight DNA ladder (LM), เลน 2-4 OPA03xOPA03 เลน 5-7 OPA03xOPA09, เลน 8-10 OPA03xOPA13, เลน 11-13 OPA03xOPZ13 และเลน 14 1 Kb ladder, โดยที่แถบดีเอ็นเอที่มีเครื่องหมาย * แสดงแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันของราสายพันธุ์กลายและราต้นแบบ

6. การทดสอบคุณสมบัติของ *B. bassiana* ที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง

ราสายพันธุ์กลาย BCNT002MT มีการเจริญเติบโตที่มากกว่าราต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อุณหภูมิ 33°C (ภาพที่ 25 และ 28) แต่อย่างไรก็ตามที่ 33°C อัตราการเจริญของรา BCNT002MT มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25°C (ภาพที่ 25-28) ดังนั้นการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูของราสายพันธุ์กลาย โดยการเลี้ยงราที่อุณหภูมิสูง (33°C) เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำการย้ายกลับมาเลี้ยงที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรา (25°C) (ภาพที่ 27 และ 28) จากผลที่ได้พบว่าในวันที่ 7 ขนาดโคโลนีของราทั้งสองไอโซเลทมีการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน (ไอโซเลทต้นแบบ และไอโซเลทสายพันธุ์กลายมีค่าเท่ากับ 3.3 และ 3.4 เซนติเมตร ตามลำดับ) ซึ่งมากกว่าที่อุณหภูมิ 25°C (ไอโซเลทต้นแบบ และไอโซเลทสายพันธุ์กลายมีค่าเท่ากับ 2.3 และ 2.4 เซนติเมตร ตามลำดับ) และ 33°C (ไอโซเลทต้นแบบ และไอโซเลทสายพันธุ์กลายมีค่าเท่ากับ 0.8 และ 1.1 เซนติเมตร ตามลำดับ) ในขณะที่วันที่ 14 (ภาพที่ 27 และ 28) ราสายพันธุ์กลาย BCNT002MT มีความสามารถในการฟื้นฟูตนเองที่ดีกว่าราต้นแบบ BCNT002WT โดยขนาดเฉลี่ยของโคโลนีของราหลังจากการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูของราสายพันธุ์กลายมีค่าเท่ากับ 4.9 เซนติเมตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับอุณหภูมิ 25°C ที่มีค่าเป็น 4.6 เซนติเมตร ในขณะที่สายพันธุ์ต้นแบบเมื่อทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูมีค่าเท่ากับ 3.9 เซนติเมตร ซึ่งน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25°C มีค่าเท่ากับ 4.5 เซนติเมตร ส่วนปริมาณสปอร์ของรา เลี้ยงที่ 25°C ไม่พบความแตกต่างของจำนวนสปอร์ของทั้งสองไอโซเลท แต่ที่ 33°C ไอโซเลทสายพันธุ์กลายสร้างสปอร์ได้มากกว่าไอโซเลทต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (วันที่ 14: $4.4x10^6$ สปอร์/มิลลิลิตร และ $5.4x10^5$ สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ) หลังการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟู พบว่า ในวันที่ 7 (ภาพที่ 29) ราทั้งสองไอโซเลทมีปริมาณสปอร์ที่ใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 25 °C (ประมาณ $5.2\text{-}6.1x10^6$) ส่วนในวันที่ 14 ราทั้งสองไอโซเลทมีปริมาณสปอร์ที่วัดได้เพิ่มขึ้น โดยที่ราสายพันธุ์กลาย ($3.2x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร) มีปริมาณของสปอร์ที่มากกว่าราไอโซเลทต้นแบบ ($1.5x10^7$ สปอร์/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

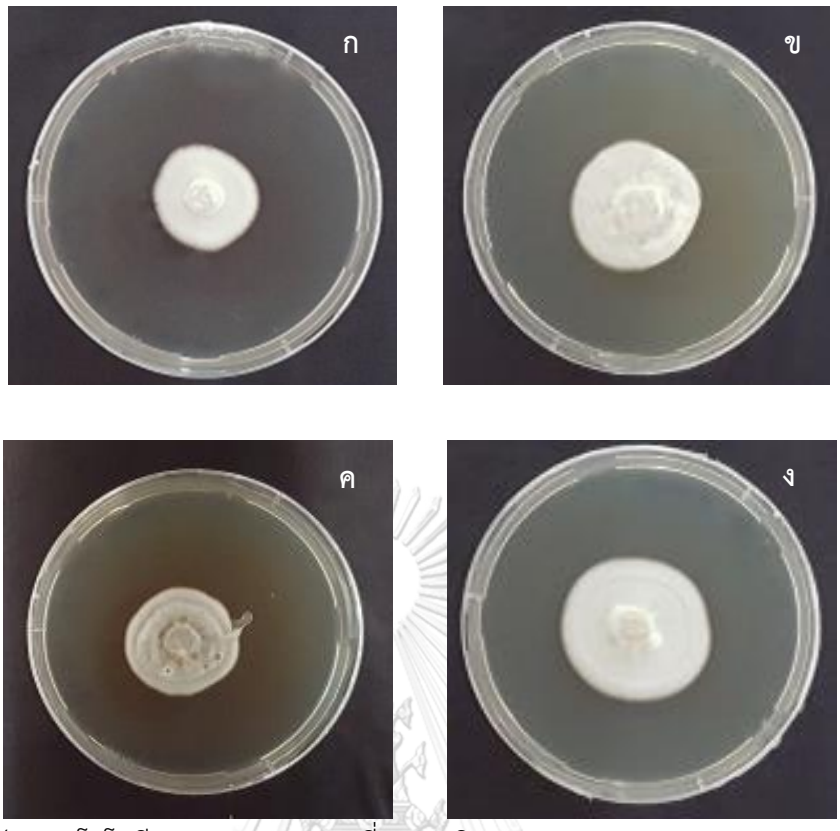


ภาพที่ 25 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 33°C

ก. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 7 วัน ข. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 7 วัน

ค. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 14 วัน ง. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 14 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

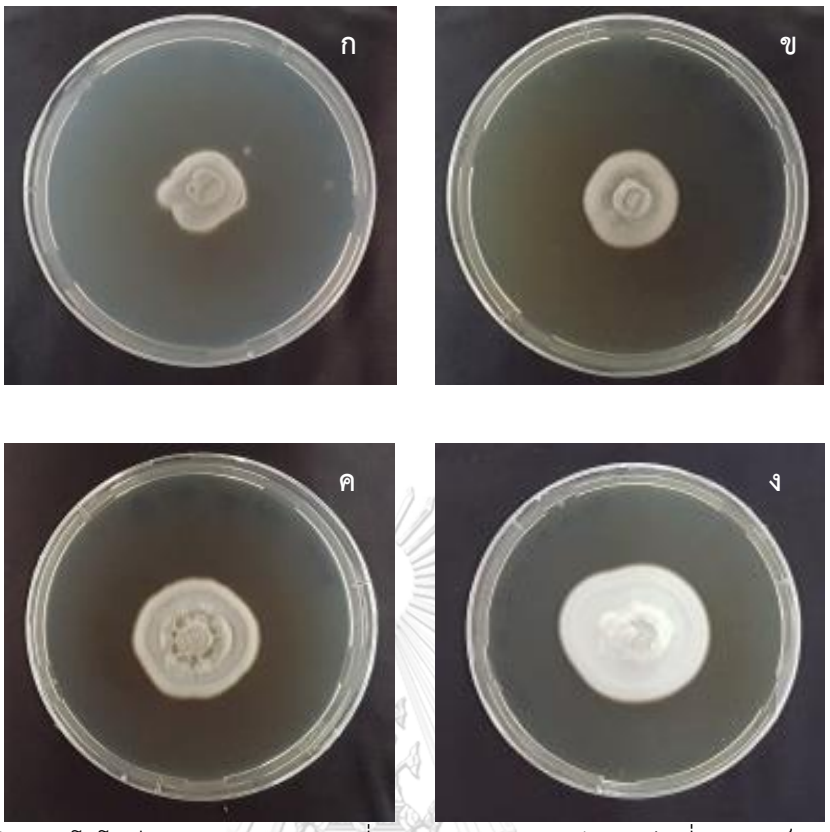


ภาพที่ 26 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C

ก. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 7 วัน ข. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 7 วัน

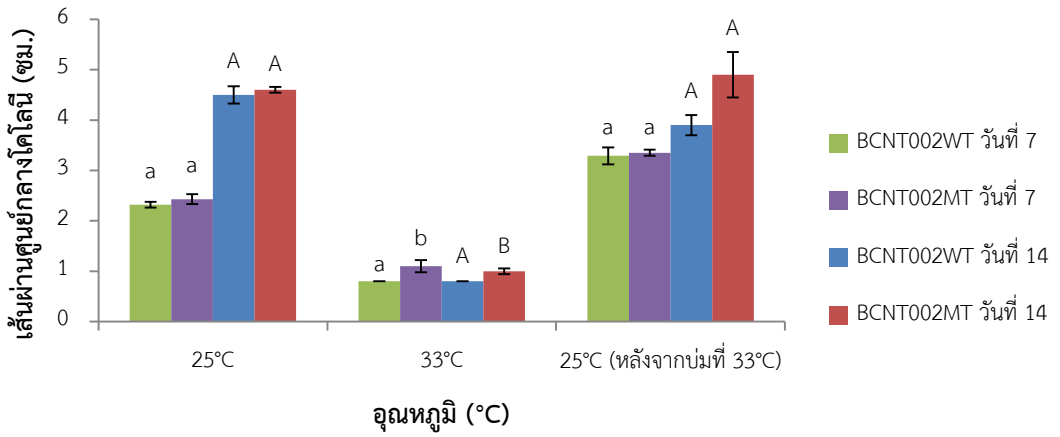
ค. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 14 วัน ง. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 14 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

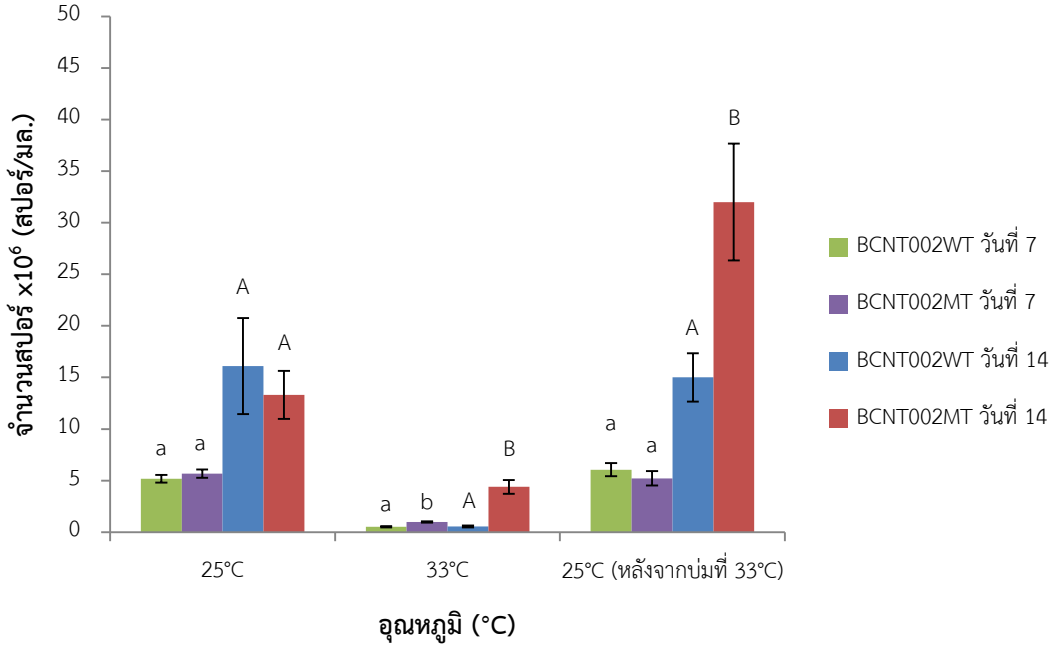


ภาพที่ 27 ลักษณะโคโลนีราบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C เป็นเวลา 7 วัน)
ก. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 7 วัน ข. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 7 วัน
ค. ไอโซเลท BCNT002WT หลังบ่ม 14 วัน ง. ไอโซเลท BCNT002MT หลังบ่ม 14 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 28 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ยในวันที่ 7 และ 14 ของราสายพันธุ์ต้นแบบ (BCNT002WT) และราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) หลังจากบ่มที่ 25 33 และ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C) ตามลำดับ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



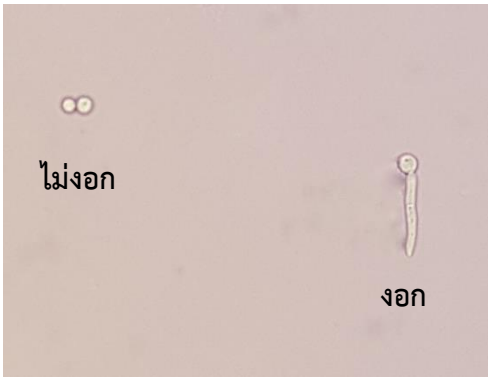
ภาพที่ 29 จำนวนสปอร์เฉลี่ย ในวันที่ 7 และ 14 ของราสายพันธุ์ต้นแบบ (BCNT002WT) และราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) หลังจากบ่มที่ 25 33 และ 25°C (หลังจากบ่มที่ 33°C) ตามลำดับ ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเลี้ยงสปอร์ที่อุณหภูมิ 33°C เพื่อดูประสิทธิภาพในการงอกของสปอร์ โดยคำนวณค่าจากจำนวนสปอร์ที่งอก (ภาพที่ 30) และสปอร์ทั้งหมดที่นับ ผลปรากฏว่าไม่พบการงอกของสปอร์ทั้งในราไอโซเลทสายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ต้นแบบที่บ่มไว้ เป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน การทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูการงอกของสปอร์ของรา พบว่าหลังจากย้ายสปอร์จากอุณหภูมิ 33°C มาเลี้ยงที่ 25°C สปอร์ในทุกชุดการทดลองมีการงอกภายใน 24 ชั่วโมง และประสิทธิภาพในการงอกของสปอร์ของราทั้งสายพันธุ์กลายและต้นแบบ หลังจากบ่มไว้ที่อุณหภูมิสูงมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้บ่มเพิ่มมากขึ้น โดยสปอร์ของราที่เลี้ยงไว้ที่ 33°C เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายไปบ่มที่ 25°C มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่เพิ่มขึ้นมากกว่าที่บ่มไว้ที่ 33°C เป็นระยะเวลา 10 และ15 วัน ตามลำดับ (ภาพที่ 31) อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์มีค่ามากกว่าราต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกระยะที่ทำการศึกษา ยกเว้นสปอร์ที่บ่มที่ 33°C เป็นระยะเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายไปบ่มที่ 25°C เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (งอกได้ 100% ทั้ง 2 ไอโซเลท) ดังนี้

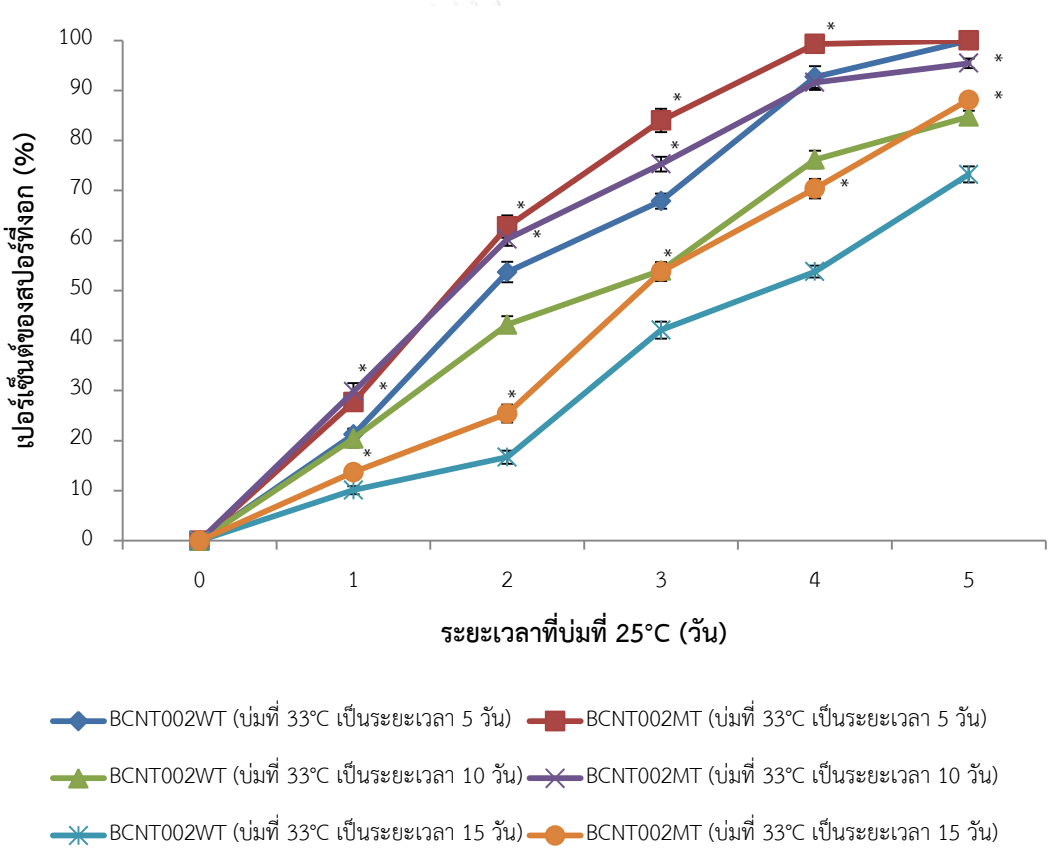
สปอร์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 33°C เป็นระยะเวลา 5 วัน ไม่พบการงอกของสปอร์ทั้งไอโซเลทต้นแบบและไอโซเลทสายพันธุ์กลาย เมื่อย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิ 25°C พบไอโซเลทต้นแบบมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 21.2 53.7 67.9 92.7 และ 100 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลทสายพันธุ์กลาย มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 27.7 62.8 84.0 99.3 และ 100 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ

สปอร์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 33°C เป็นระยะเวลา 10 วัน ไม่พบการงอกของสปอร์ทั้งไอโซเลทต้นแบบและไอโซเลทสายพันธุ์กลาย เมื่อย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิ 25°C พบไอโซเลทต้นแบบมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 20.4 43.2 54.0 76.2 และ 84.8 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลทสายพันธุ์กลาย มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 29.8 60.3 75.3 91.6 และ 95.4 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ

และสปอร์ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 33°C เป็นระยะเวลา 15 วัน ไม่พบการงอกของสปอร์ทั้งไอโซเลทต้นแบบและไอโซเลทสายพันธุ์กลาย เมื่อย้ายมาบ่มที่อุณหภูมิ 25°C พบไอโซเลทต้นแบบมีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 10.1 16.7 42.1 53.8 และ 73.2 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลทสายพันธุ์กลาย มีเปอร์เซ็นต์การงอกเท่ากับ 13.7 25.4 53.8 70.4 และ 88.1 เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1-5 วัน ตามลำดับ



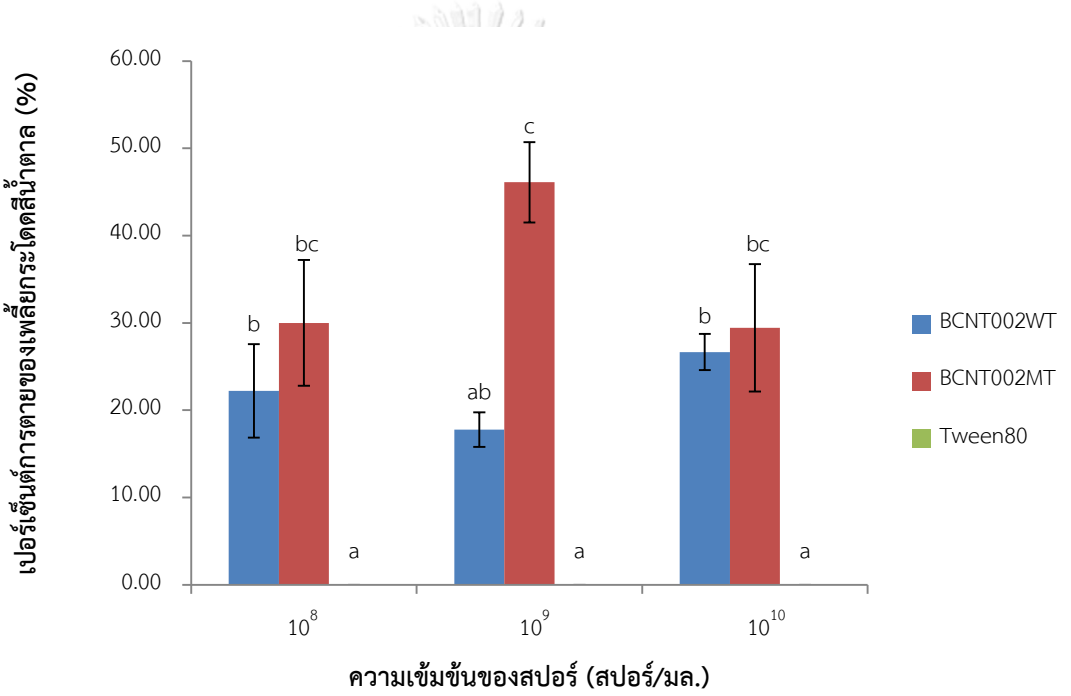
ภาพที่ 30 *B. bassiana* แสดงการงอก และไม่งอกของสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เมื่อบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 5 วัน (หลังจากบ่มที่ 33°C เป็นระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีเครื่องหมาย * แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบระหว่างคู่ของราที่บ่มในระยะเวลาเดียวกัน

7. ทดสอบความสามารถในการควบคุมแมลงของ *B. bassiana* สายพันธุ์กลายที่คัดเลือกแล้ว

การทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของ *B. bassiana* ทำการทดสอบในช่วงวันที่ 13–27 มีนาคม 2560 (อุณหภูมิเฉลี่ย 35.0±2.5°C, ความชื้นสัมพัทธ์ในทรงพุ่ม 63.8%) จากผลการทดลองพบว่า ราไอโซเลทสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงที่ดีกว่าราไอโซเลทต้นแบบ (BCNT002WT) ในทุกความเข้มข้น (ภาพที่ 32) โดยที่ความเข้มข้นของสปอร์ราที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LC50) มีค่าเท่ากับ $1x10^{9.69}$ สปอร์/มิลลิลิตร และเวลาที่ทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายร้อยละ 50 (LT50) ที่ความเข้มข้น 10^{9} สปอร์/มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 14.25 หรือประมาณ 15 วัน



ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจากการเข้าทำลายของ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้น 10^8 10^9 และ 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 5
อภิปรายผลการศึกษา

จากการศึกษาราที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูข้าว โดยการแยกราจากแมลงที่เก็บมาจากแปลงของเกษตรกร ถึงแม้ว่าในช่วงแรกพบเส้นใยสีขาวปกคลุมตัวแมลง ที่คาดว่าเป็นรา *B. bassiana* แต่หลังจากราเจริญและมีการสร้างสปอร์ เมื่อระบุชนิดจากลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าราที่แยกได้เป็น *Metarhizium* spp. ซึ่งเป็นราที่ก่อโรคในแมลงชนิดหนึ่ง แต่ไม่พบรา *B. bassiana* จากซากแมลงที่ทำการเก็บมาได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Metarhizium* spp. มีค่าประมาณ 30°C ซึ่งมากกว่า *B. bassiana* ที่มีค่าประมาณ 25°C (Dimbi et al., 2004) และความสามารถในการงอกของสปอร์ของ *Matarhizium* spp. ที่มีมากกว่า *B. bassiana* ที่อุณหภูมิสูงถึง 35°C (Bugeme et al., 2008) ซึ่งอาจส่งผลให้ *Matarhizium* spp. สามารถเข้าทำลายแมลงได้มากกว่า *B. bassiana* ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง ทำให้มีโอกาสพบแมลงที่ตายเพราะ *Metarhizium* spp. ในแปลงนามากกว่า *B. bassiana* ได้ และอาจส่งผลต่อการอยู่รอดของ *Metarhizium* spp. ในตัวแมลงที่มากกว่า เพราะในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทำการศึกษาไม่ได้ทำความสะอาดพื้นผิวของแมลงและบ่มเชื้อในทันที แต่เก็บแมลงที่ตายแล้วมาบ่มที่ห้องปฏิบัติการที่กรมการข้าว กรุงเทพมหานคร ซึ่งใช้ระยะเวลาที่ค่อนข้างนาน อาจส่งผลให้อุณหภูมิภายนอกของแมลงรบกวนต่อการมีชีวิตของสปอร์ *B. bassiana* และอาจส่งผลให้ราในกลุ่มอื่นเจริญขึ้นปกคลุมบนซากแมลงได้ นอกจากนี้เทคนิคของผู้ทำการศึกษาอาจมีผลต่อการแยกราจากแมลง เพราะพบแมลงบางส่วนที่เกิดการปนเปื้อนราชนิดอื่นๆ เช่น *Aspergillus* spp. หรือ *Penicillium* spp. ในขั้นตอนการแยกราจากแมลง ถึงแม้ว่า *Matarhizium* spp. จะทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ดีกว่า *B. bassiana* แต่จากรายงานของ Thungrabeab and Tongma (2007) *Metarhizium anisopliae* ก่อโรคในแมลงศัตรูธรรมชาติ เช่น *Chrysoperla carnea* Stephens และ *Dicyphus tamaninii* Wagner ขณะที่ไม่พบ *B. bassiana* ก่อโรคในแมลงศัตรูตามธรรมชาติ และแมลงที่มีประโยชน์ในดิน

การระบุชนิดของราที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าวด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ระบุว่าราทั้ง 6 ไอโซเลท เป็น *B. bassiana* และเพื่อยืนยันผลการระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล พบว่าจากการทดสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ EFFO และ EFRO ปรากฏแถบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 307 bp ใน *B. bassiana* ทั้ง 6 ไอโซเลท และใน *B. bassiana* ที่ใช้เป็นชุดควบคุม (positive control) แต่ไม่พบในรา *Metarhizium* spp. และในแบคทีเรีย *Xanthomonas* spp. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Johny and Kyei-Poku (2014) ที่ใช้ไพรเมอร์คู่นี้ในการระบุชนิดของ *B. bassiana* ทำให้ผลการระบุด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สอดคล้องกับผลการระบุด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เนื่องจากการศึกษาของ Johny and Kyei-Poku (2014) ไม่ได้แสดงผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 307 bp กับ *B. bassiana* จากฐานข้อมูลใน NCBI Genbank ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวกับฐานข้อมูลใน NCBI Genbank พบว่าลำดับดังกล่าวตรงกับลำดับเบสของดีเอ็นเอของ *B. bassiana* จากฐานข้อมูลใน NCBI Genbank โดยมีเปอร์เซ็นต์เอกลักษณ์ เท่ากับ 100% ดังนั้นไพรเมอร์ที่จำเพาะคู่นี้ สามารถแนะนำให้ใช้เป็นเครื่องมือในการระบุชนิดของ *B. bassiana* ได้

ความสามารถในการเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิสูงของราทั้ง 6 ไอโซเลท มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกันในแต่ละอุณหภูมิ ซึ่งอาจเกิดจากสถานที่ที่เก็บแมลงอยู่ในเขตพื้นที่จังหวัดชัยนาทเหมือนกัน ทำให้รามีความแตกต่างกันน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อเลี้ยงราแต่ละไอโซเลทที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และปริมาณสปอร์มีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Bugeme et al. (2008) เมื่อเลี้ยงราที่อุณหภูมิ 20 และ 35°C *B. bassiana* มีการเจริญเติบโต (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี) ที่น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. bassiana* อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 23-28°C อุณหภูมิที่ต่ำที่สุดอยู่ในช่วง 5-10°C อุณหภูมิที่สูงที่สุดอยู่ในช่วง 30-38°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับไอโซเลทของรา (Roberts and Campbell, 1977)

ผลการทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของ *B. bassiana* ที่ได้รับมาจากกรมการข้าว จำนวน 5 ไอโซเลท (BCNT002-BCNT006) มีความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมากกว่าราที่ได้รับความอนุเคราะห์มาจากกรมส่งเสริมการเกษตร (BDOAE001) ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แนะนำให้เกษตรกรใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูข้าวในประเทศไทย แต่มีเพียง 2 ไอโซเลท (BCNT005 และ BCNT006) เท่านั้น ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้การที่ราจากกรมการข้าวส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงที่มากกว่าอาจเป็นผลมาจากเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากแมลงในนาข้าวเมื่อไม่นานมานี้ จึงส่งผลให้ความรุนแรงในการก่อโรคของราในแมลงยังคงอยู่ในระดับที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับราจากกรมส่งเสริมการเกษตร ที่มีการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าของ Ansari and Butt (2011) ที่เมื่อทำการ subculture ราในอาหารเลี้ยงเชื้อไปหลายครั้ง ส่งผลให้ความรุนแรงในการก่อโรคในแมลงของราลดลง อย่างไรก็ตามราไอโซเลท BCNT001–BCNT003 ถูกเลือกนำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การพัฒนาประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงของรา ด้วยการเพิ่มความสามารถในการทนร้อนของรา โดยชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ไม่พบการเจริญเติบโตของราที่อุณหภูมิ 35°C ในทุกไอโซเลท ราที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เลี้ยงที่

อุณหภูมิ 33°C พบการรอดชีวิตจำนวน 1 ไอโซเลท ที่มีการเจริญของเส้นใยเพิ่มมากขึ้น โดยเปรียบเทียบขนาดโคโลนีของราสายพันธุ์กลาย (BCNT002MT) ที่มีมากกว่าโคโลนีของราต้นแบบ (BCNT002WT) ที่อุณหภูมิเดียวกัน จากการศึกษาของ Avanti, Balaraman, and Gopinath (2014) ที่ชักนำให้ *B. bassiana* ทนต่ออุณหภูมิสูงได้โดยใช้ความร้อนชื้นและแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งทำให้ราสามารถสร้าง blastospore ได้มากกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 35°C แต่เนื่องจากความร้อนชื้นสามารถทำลายโปรตีนบางชนิด ซึ่งอาจไปทำลายโปรตีนที่สำคัญต่อการงอกของสปอร์ได้ (Wang et al., 2012) และจากการศึกษาของ Lawrence and Christensen (1976) พบว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต มีอัตราการกลายพันธุ์ที่ต่ำ เพราะราสามารถฟื้นฟูดีเอ็นเอที่เปลี่ยนแปลงไปกลับมาได้เอง การใช้สาร EMS มีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตที่สูง จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีในการนำมาใช้ ถึงแม้ว่าราสายพันธุ์กลายจากการศึกษาครั้งนี้จะเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าในการศึกษาของ Avanti, Balaraman, and Gopinath (2014) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทต้นแบบแล้ว ราสายพันธุ์กลายที่ได้ นับว่ามีประสิทธิภาพที่ดีกว่า นอกจากนี้ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงยังขึ้นกับไอโซเลทของราที่ทำการศึกษา เพราะราแต่ละไอโซเลทจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่แตกต่างกัน (Roberts and Campbell, 1977) หากราต้นแบบที่นำมาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่สูง เช่น ไอโซเลทที่ใช้ในการศึกษาของ Bugeme et al. (2008) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของราสูงถึง 30°C และราสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิที่สูงถึง 35°C น่าจะชักนำให้ทนต่ออุณหภูมิที่สูงมากกว่าในการศึกษาครั้งนี้ได้ เพราะอุณหภูมิที่เหมาะสมของราไอโซเลทที่นำมาทดสอบในการศึกษาครั้งนี้อยู่ที่ประมาณ 25°C สังเกตได้จากการเจริญเติบโตของราที่เลี้ยงไว้ที่ 25 31 33 และ 35°C มีการเจริญได้ดีที่สุดที่ 25°C

ในการตรวจสอบราสายพันธุ์กลาย เพื่อแยกความเหมือนหรือความแตกต่างจากราต้นแบบด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยเทคนิค RAPD พบว่าราสายพันธุ์กลายกับราต้นแบบมีลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไป สาร EMS จะชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตด้วยการทำให้เกิดการแทนที่ของเบส (base-pair substitution) (Sega, 1984; Shiwa et al., 2012) อย่างไรก็ตาม แถบของดีเอ็นเอที่พบในไอโซเลท BCNT002MT แต่ไม่พบในไอโซเลท BCNT002WT อาจมีความเกี่ยวข้องกับยีนที่ทนต่ออุณหภูมิสูงของ *B. bassiana* ได้ ในการวิเคราะห์จีโนมทั้งหมดของ *Lotus japonicas* ที่ผ่านการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสาร EMS พบว่า มีซิงเกิลนิวคลีโอไทด์โพลีมอร์ฟิซึมเป็นจำนวนมาก ซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์แบบสุ่ม และส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Mohd-Yusoff et al., 2015) ผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาชิ้นส่วนขนาดเล็กแบบสุ่มของทั้งจีโนม ด้วยวิธี RAPD เท่านั้น การศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่ออุณหภูมิสูง อาจทำได้โดยการศึกษาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นได้ต่อไป

ราสายพันธุ์กลาย BCNT002MT มีขนาดโคโลนีและปริมาณของสปอร์มากกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 33°C จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอุณหภูมิที่สูงจะไปชะลอหรือยับยั้งการงอกของสปอร์ การเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ของ *B. bassiana* ซึ่งส่งผลต่อความรุนแรงในการก่อโรคในแมลงของรา (Shimazu, 2004; Bugeme et al., 2008) แม้ว่ามีการศึกษาที่พบว่า *B. bassiana* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 35°C (Shimazu, 2004; Bugeme et al., 2008; Avanti, Balaraman, and Gopinath, 2014) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ *B. bassiana* (optimal temperature) อาจขึ้นอยู่กับแหล่งการกระจายตัวของราว่าสามารถเจริญอยู่ได้ที่อุณหภูมิช่วงใด จากการศึกษาของ Orduño-Cruz et al. (2015) พบว่า *B. bassiana* ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 35°C ถูกคัดแยกมาจากรัฐเบรากรุช ในประเทศเม็กซิโก ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 32°C

การศึกษาการคัดแยกไอโซเลทของราที่รอดชีวิตในภาวะอุณหภูมิสูง เป็นการจำลองสภาพแวดล้อมในธรรมชาติที่ราจะต้องเผชิญ แต่ในสภาพธรรมชาติอุณหภูมิจะไม่สูงตลอดเวลาและจะมีช่วงที่อุณหภูมิลดต่ำลง ให้ราได้มีการเจริญเติบโตเพื่อก่อโรคในแมลงได้ ซึ่งถ้าหากราสามารถฟื้นฟูตนเองได้เร็ว หรือทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ จะเป็นการเพิ่มโอกาสหรือระยะเวลาในการก่อโรคในแมลงได้มากขึ้น จากผลการศึกษาในครั้งนี้ราสายพันธุ์กลายมีการเจริญเติบโตที่มากกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 33°C แต่ที่อุณหภูมิดังกล่าวอัตราการเจริญของราสายพันธุ์กลายมีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูของราทั้ง 2 ไอโซเลท พบว่าขนาดของโคโลนีของราหลังจากการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟู (ที่อุณหภูมิ 25°C หลังจากบ่มที่ 33°C) มีค่าใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 25°C ส่วนปริมาณสปอร์ของรา หลังการทดสอบความสามารถในการฟื้นฟูพบว่า ราทั้ง 2 ไอโซเลท มีปริมาณสปอร์ที่วัดได้เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 25 และ 33°C อาจเกิดจากการที่อุณหภูมิสูงไปกระตุ้นให้ราสร้างสปอร์เพิ่มมากขึ้น หลังจากที่ราถูกย้ายกลับมาที่อุณหภูมิ 25°C เพื่อความอยู่รอดของราต่อไป เพราะราในสภาพสปอร์จะทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่าเส้นใย (Shimazu, 2004; Liu et al., 2015) ราสายพันธุ์กลายสร้างสปอร์ที่มากกว่าราไอโซเลทต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าราสายพันธุ์กลายมีความสามารถในการฟื้นฟูตนเองได้ดีกว่าราสายพันธุ์ต้นแบบ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Shimazu (2004) ที่ *B. bassiana* สามารถฟื้นฟูตนเองกลับมาได้ หลังจากที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง โดยอุณหภูมิที่สูงที่สุดที่เส้นใยของราสามารถทนได้คือ 35°C ที่ระยะเวลา 8 วัน แต่ถ้าเพิ่มเป็น 36°C ราจะสามารถทนได้เพียง 4 วัน หากนานกว่านั้นราจะตาย และไม่สามารถฟื้นฟูตนเองกลับมาได้อีก (ไม่พบการเจริญเติบโตของราเพิ่มขึ้นจากเดิม หลังย้ายไปบ่มที่ 25°C เป็นเวลา 7 วัน) จากผลการศึกษาการงอกของสปอร์ พบว่าที่อุณหภูมิ 33°C ราทั้ง 2 ไอโซเลทไม่มีการงอกของสปอร์เกิดขึ้น ที่ระยะเวลา 5 10 และ 15 วัน แต่เมื่อทำการย้ายรากลับไปเลี้ยงที่ 25°C พบการงอกของสปอร์ของราเกิดขึ้นทั้ง 2 ไอโซเลท สืบเนื่อง

จากสปอร์ของราต้องการอุณหภูมิที่จำเพาะสำหรับการงอก และอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์จะไปส่งเสริมให้เกิดการพักตัวของสปอร์แบบไม่อาศัยเพศของรา (conidia) เพื่อตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม (Feofilova et al., 2012) โดยความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงจะขึ้นกับระยะการเจริญของรา โดยในระยะสปอร์ ราจะสามารถทนต่อความร้อนได้มากกว่าในระยะการเป็นเส้นใย ซึ่งอาจเกิดจากการที่สปอร์ของรามีการปรับตัวเพื่อให้สามารถมีชีวิตรอดในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี (Shimazu, 2004; Liu et al., 2015) สำหรับ *B. bassiana* ส่วนใหญ่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ของราอยู่ในช่วงประมาณ 25°C ซึ่งช่วงของอุณหภูมิที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับไอโซเลทของราด้วย จากการศึกษาของ Qazzaz, Al-Masri, and Barakat (2015) รายงานว่าช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 20–25°C ในขณะที่ Bugeme et al. (2008) รายงานว่า ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 25–30°C หากสปอร์ของราอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ช่วงอุณหภูมิไม่เหมาะสมจะพบว่าสปอร์ของรามีอัตราการงอกที่ต่ำ จากการศึกษาของ Sivasankaran, Eswaramoorthy, and David (1998) รายงานว่า *B. bassiana* ต้องการน้ำเพื่อใช้สำหรับการงอกของสปอร์ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สนับสนุนว่าอุณหภูมิสูง (33°C) ส่งผลกระทบต่อการงอกของสปอร์ของราที่เลี้ยงในอาหารเหลว แม้ว่าสภาพแวดล้อมจะมีความชื้นสูงเพียงพอต่อการงอกของสปอร์ก็ตาม

จากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า อุณหภูมิสูงจะลดความมีชีวิตของสปอร์ของรา (Zimmermann, 2007) ซึ่งสามารถอธิบายสาเหตุของเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ของราที่ทำการศึกษาเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33°C เป็นระยะเวลา 15 วัน มีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ต่ำกว่าการเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลา 10 และ 5 วัน ตามลำดับ ก่อนที่จะย้ายไปเลี้ยงที่ 25°C สนับสนุนการศึกษาของ Shimazu (2004) ที่ว่ายิ่งระยะเวลาในการเลี้ยงราที่อุณหภูมิสูงเพิ่มมากขึ้น อัตราการงอกของสปอร์ของรายิ่งลดลง และเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 36°C ไม่พบการงอกของสปอร์ จากการศึกษาครั้งนี้ การที่ราสายพันธุ์กลายมีการเจริญของเส้นใย การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ ที่มากกว่าราต้นแบบ แสดงว่าราสายพันธุ์กลายมีการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงได้ดีกว่าราสายพันธุ์ต้นแบบ อย่างไรก็ตามความเสถียรของลักษณะดังกล่าวยังคงไม่ได้ทำการศึกษา

ราสายพันธุ์กลาย และราต้นแบบ ถูกนำไปทดสอบความสามารถในการก่อโรคในตัวอ่อนของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่าราสายพันธุ์กลายมีประสิทธิภาพในการก่อโรคในเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลมากกว่าราต้นแบบในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร ราสายพันธุ์กลายมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงมากกว่าราต้นแบบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้น 10^{10} สปอร์/มิลลิลิตร พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงมีค่าต่ำกว่าที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร อาจเกิดจากการกระตุ้นของอุณหภูมิและสารอาหารที่แมลงได้รับ ซึ่งแตกต่างกันไปในแมลงแต่ละตัว ส่งผลต่อการตอบสนองต่อ *B. bassiana* ที่แตกต่างกันได้ (Donegan and Lighthart, 1989) จากการศึกษาของ Bugeme et al. (2008) พบว่าความรุนแรงของราที่ก่อโรคในแมลงมีความเกี่ยวข้องกับ

ไอโซเลทและอุณหภูมิ จากการที่ *B. bassiana* แต่ละไอโซเลททำให้ไรแมงมุมในมะเขือเทศตายได้แตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิ ตัวอย่างเช่น ไอโซเลท ICIPE278 ทำให้ไรแมงมุมตายมากกว่าไอโซเลท ICIPE279 ที่อุณหภูมิ 25°C แต่ไอโซเลท ICIPE278 ทำให้ไรแมงมุมตายน้อยกว่าไอโซเลท ICIPE279 ที่อุณหภูมิ 30°C สอดคล้องกับการที่ราไอโซเลทสายพันธุ์กลายสามารถก่อโรคในแมลงได้มากกว่าราสายพันธุ์ต้นแบบในเรือนทดลอง (35.0 ± 2.5°C) นอกจากนี้ประสิทธิภาพการก่อโรคในแมลงของรายังขึ้นกับปัจจัยหลายชนิด ได้แก่ ประสิทธิภาพในการงอกของสปอร์ การเจริญของเส้นใย และการสร้างสปอร์ (Zimmermann, 2007)

จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยของรา การสร้างสปอร์ และการงอกของสปอร์ภายหลังจากที่ได้รับอุณหภูมิสูง พบว่าราสายพันธุ์กลายมีความเหมาะสมที่จะส่งเสริมเพื่อใช้ในการควบคุมแมลงสำหรับเกษตรกรในประเทศไทย อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมถึงการเปลี่ยนแปลงและการคงสภาพทางด้านพันธุกรรมราสายพันธุ์กลาย และการทดสอบการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในแปลง ซึ่งเป็นเรื่องที่เหมาะสมต่อการศึกษาเป็นลำดับถัดไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา

1. คัดเลือกราเพื่อนำมาชักนำให้เกิดราสายพันธุ์กลายของรา *B. bassiana*

ความสามารถในการเจริญและสร้างสปอร์ของ *B. bassiana* ที่รับมาจากกรมการข้าวมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล พบว่ามีประสิทธิภาพแตกต่างกัน จึงใช้ความสามารถในการควบคุมแมลงสำหรับคัดเลือกไอโซเลทราเพื่อทดสอบต่อไป

2. การชักนำให้เกิดราสายพันธุ์กลายของ *B. bassiana* ด้วยสาร EMS

สาร EMS สามารถชักนำให้ *B. bassiana* สายพันธุ์กลาย สามารถเจริญได้ดีกว่าราสายพันธุ์ต้นแบบที่อุณหภูมิสูงที่สุดที่ 33°C

3. การทดสอบการกลายพันธุ์ของรา

ราที่ผ่านการชักนำด้วยสาร EMS และมีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงเมื่อนำมาศึกษาลักษณะแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี RAPD พบว่าราที่นำมาทดสอบนั้นมีลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากราต้นแบบ

4. ทดสอบความสามารถในการเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิสูง

ราสายพันธุ์กลายมีขนาดโคโลนีและปริมาณสปอร์มากกว่าราต้นแบบที่อุณหภูมิ 33°C และ 25°C (หลังจากผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 33°C มาก่อนเป็นเวลา 7 วัน) เมื่อวัดการงอกของสปอร์ของรา พบว่าราสายพันธุ์กลายมีเปอร์เซ็นต์การงอกที่ดีกว่าราต้นแบบที่ 25°C (หลังจากผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 33°C) มาก่อนเป็นเวลา 5 10 และ 15 วัน

5. ทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลของราสายพันธุ์กลาย

ราสายพันธุ์กลายสามารถทำให้เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลตายได้มากกว่าราสายพันธุ์ต้นแบบในทุกความเข้มข้น แต่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 10^9 สปอร์/มิลลิลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

กรมการข้าว. 2557. สรุปสถานการณ์ศัตรูข้าว ระหว่างวันที่ 30 ตุลาคม - 5 พฤศจิกายน 2557. [ออนไลน์]. Available from http://www.brrd.in.th/main/index.php?option=com_content&view=article&id=1361:-30-5-2557-&catid=51:pp-Submain&Itemid=15 [30 ธันวาคม 2558]

กรมการข้าว. 2559. พบเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลระบาดในนาข้าวเป็นวงกว้างกว่า 6 หมื่นไร่ แนะชาวนา ในจ.สุรินทร์-ศรีสะเกษ เร่งสำรวจและเฝ้าระวังการระบาด. [ออนไลน์]. Available from http://www.ricethailand.go.th/web/index.php/rice-news/163-2016-09-26-08-19-04 [14 ตุลาคม 2560]

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2560. แผนภูมิข้อมูลอากาศ. [ออนไลน์]. Available from https://www.tmd.go.th/climate/climate.php?FileID=7 [10 กันยายน 2560]

วันทนา ศรีรัตนศักดิ์. 2553. เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล: ศัตรูตัวฉกาจของการปลูกข้าวนาชลประทานและมิติใหม่ของการจัดการ. วารสารวิชาการข้าว. 4: 72-82.

วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, จินตนา ไชยวงศ์, สุกัญญา อรัญมิตร และอุรัสยาน์ บูลย์ประมุข. 2554. แมลง-สัตว์ศัตรูข้าว และการป้องกันกำจัด. กรุงเทพมหานคร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย.

วันทนา ศรีรัตนศักดิ์, สุกัญญา อรัญมิตร และจินตนา ไชยวงศ์. 2554. สถานการณ์ระบาดของเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในประเทศไทย วารสารวิชาการข้าว. 5: 79-89.

สมคิด นุชปั้น. 2554. การเตือนและสถานการณ์การแพร่ระบาดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล. กรมส่งเสริมการเกษตร.

เอกรัฐ ปั่นกำจร, สมเกียรติ ปั้นแตง และกฤษณา บุญศิริ. 2555. ความเข้มข้นของเชื้อราบิวเวอร์เรียในการป้องกันกำจัดเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลในกล้าข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 43: 273-276.

Abdullah, R., Haq, I., Iftikhar, T., Butt, Z. A., and Khattak, M. I. 2013. Random mutagenesis for enhanced production of alpha amylase by *Aspergillus Oryzae* IIB-30. Pakistan Journal of Botany. 45: 269-274.

Akmal, M., Freed, S., Malik, M. N., and Gul, H. T. 2013. Efficacy of *Beuaveria bassiana* (Deuteromycotina: Hypomycetes) against different aphid species under laboratory conditions. Pakistan journal of zoology. 45: 71-78.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Ansari, M. A., and Butt, T. M. 2011. Effects of successive subculturing on stability, virulence, conidial yield, germination and shelf-life of entomopathogenic fungi. Journal of Applied Microbiology. 110: 1460–1469.

Aquino, G., and Heinrichs, E. A. 1979. Brown planthopper populations on resistant varieties treated with a resurgence-causing insecticide. IRRN.

Avanti, B., Balaraman, K., and Gopinath, R. 2014. Development of higher temperature tolerant mutant of *Beauveria bassiana* and *Verticillum lecanii*. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research. 3: 109-112.

Braber, K., and Meenakanit, P. 1992. Field population dynamics of rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål. In Central Thailand. In Workshop on causes of the brown planthopper and ragged stunt virus, outbreaks and suppressions in Central Thailand, 23. 10-12 July 1992 Pattaya, Thailand.

Broome, J. R., Sikorowski, P. P., and Norment, B. R. 1976. A mechanism of pathogenicity of *Beauveria bassiana* on larvae of the imported fire ant, *Solenopsis richteri*. Journal of Invertebrate Pathology. 28: 87-91.

Bugeme, D. M., Maniania, N. K., Knapp, M., and Boga, H. I. 2008. Effect of temperature on virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to *Tetranychus evansi*. Experimental and Applied Acarology. 46: 275-285.

Butt, T. M., Coates, C. J., Dubovskiy, I. M., and Ratcliffe, N. A. 2016. Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host–Pathogen Interactions. Advances in Genetics. 94: 307-364.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Carneiro, A. A., Gomes, E. A., Guimarães, C. T., Fernandes, F. T., Carneiro, N. P., and Cruz, I. 2008. Molecular characterization and pathogenicity of isolates of *Beauveria* spp. to fall armyworm. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 43: 513-520.

Chiu, S. C. 1979. Biological control of the brown planthopper. Philippines. International Rice Research Institute.

Clerk, G. C., and Madelin, M. F. 1965. The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. Transactions of the British Mycological Society. 48: 193-209.

Daoust, R. A., and Pereirn, R. M. 1986. Stability of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on beetle-attracting tubers and cowpea foliage in Brazil. Environmental Entomology. 15: 1237-1243.

Dimbi, S., Maniania, N. K., Lux, S. A., and Mueke, J. M. 2004. Effect of constant temperatures on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* to three species of African tephritid fruit flies. Biological Control. 49: 83-94.

Donegan, K., and Lighthart, B. 1989. Effect of several stress factors on the susceptibility of the predatory insect, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology. 54: 79–84.

Dyck, V. A., and Thomas, B. 1979. The brown planthopper problem. Los Banos. International Rice Research Institute.

Fargues, J., Goettel, M. S., Smits, N., Ouedraogo, A., and Rougier, M. 1997. Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* Isolates from different origins. Mycologia. 89: 383-392.

Feofilova, E. P., Ivashechkin, A. A., Alekhin, A. I., and Sergeeva, Y. E. 2012. Fungal spores: dormancy, germination, chemical composition, and role in biotechnology. Applied Biochemistry and Microbiology. 48: 1-11.

Gallagher, K. D., Kenmore, P. E., and Sogawa, K. 1994. Judicial use of insecticides deter planthopper outbreaks and extend the life of resistant varieties in Southeast Asian rice. New York. Chapman & Hall.

Goettel, M. S., Poprawski, T. J., Vandenberg, J. D., Li, Z., and Roberts, D. W. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. CRC Press.

Goettlel, S., and Inglis, G. D. 1997. Fungi: Hyphomycetes. London. Academic Press.

Hallsworth, J. E., and Magan, N. 1999. Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology. 74: 261-266.

Ho, H. L., and Ho, K. F. 2015. *Aspergillus brasiliensis* for overproduction of xylanase in submerged fermentation through UV irradiation and chemicals mutagenesis. Journal of Advances in Biology & Biotechnology. 3: 117-131.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Humber, R. A. 2005. Entomopathogenic fungal identification. [Online]. Available from https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80620520/apswkshoprev.pdf [12 August 2015]

Hywel-Jones, N. L., and Gillespie, A. T. 1990. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. Mycological Research. 94: 389-392.

Inglis, G. D., Johnson, D. L., and Goettel, A. S. 1997. Effects of temperature and sunlight on mycosis (*Beauveria bassiana*) (Hyphomycetes: Sympodulosporae) of grasshoppers under field conditions. Environmental Entomology. 26: 400-409.

Jia, Y., et al. 2013. Distribution of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in rice ecosystems and its effect on soil enzymes. Current Microbiology. 67: 631-636.

Johny, S., and Kyei-Poku, G. 2014. A molecular tool for detection and tracking of a potential indigenous *Beauveria bassiana* strain for managing emerald ash borer populations in Canada. Journal of Invertebrate Pathology. 122: 16-21.

Kenmore, P. E. 1980. Ecology and outbreaks of tropical insect pest of the Green Revolution, the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål). Doctoral dissertation, University of California.

Kenmore, P. E. 1991. Indonesia's integrated pest management—a model for Asia. Manila. FAO.

Kerchev, P. I., Fenton, B., Foyer, C. H., and Hancock, R. D. 2012. Plant responses to insect herbivory: Interactions between photosynthesis, reactive oxygen species and hormonal signalling pathways. Plant, Cell & Environment. 35: 441-453.

Keswani, C., Singh, S. P., and Singh, H. B. 2013. *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. Biotech Today. 3: 16-20.

Klug, W. S., and Cummings, M. R. 1997. Concepts of Genetics. 5 ed. Pearson.

Krieg, A., Gröner, A., Huber, J., and Zimmermann, G. 1981. Inaktivierung von verschiedenen Insektenpathogenen durch ultraviolette Strahlen. Journal of Plant Diseases and Protection. 88: 38-48.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Krutmuang, P. 2011. Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*) and Pest Management in Thailand. In International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development, 5-7 October 2011 University of Bonn [Online] Available from: http://ag.udel.edu/delpha/8137.pdf [12 August 2015]

Lawrence, C. W., and Christensen, R. 1976. UV mutagenesis in radiation-sensitive strains of yeast. Genetics. 82: 207-232.

Lee, S. J., Yu, J. S., Nai, Y.-S., Parker, B. L., Skinner, M., and Kim, J. S. 2015. *Beauveria bassiana* sensu lato granules for management of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* in rice. BioControl. 60: 263-270.

Leger, R. J. S., Nelson, J. O., and Screen, S. E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity Microbiology. 145: 2691-2699.

Leonard, C. A., Brown, S. D., and Hayman, J. R. 2013. Random mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* genome results in fungal antibacterial activity. International Journal of Microbiology. 2013: 1-5.

Li, M., Li, S., Xu, A., Lin, H., Chen, D., and Wang, H. 2014. Selection of *Beauveria* isolates pathogenic to adults of *Nilaparvata lugens*. Journal of Insect Science. 14: 1-12.

Liu, H., Zhao, X., Guo, M., Liu, H., and Zheng, Z. 2015. Growth and metabolism of *Beauveria bassiana* spores and mycelia. BMC Microbiology. 15: 1-12.

Liu, Z., Zhang, K., Lin, J., and Guo, L. 2011. Breeding cold tolerance strain by chemical mutagenesis in *Volvariella volvacea*. Scientia Horticulturae. 130: 18-24.

Lu, Z., Kongluen, H., Xiaoping, Y., and Cui, H. 2005. Effects of Nitrogen on the Tolerance of Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*, to Adverse Environmental Factors. Insect Science. 12: 121-128.

Mohd-Yusoff, N. F., et al. 2015. Scanning the effects of ethyl methanesulfonate on the whole genome of *Lotus japonicus* using second-generation sequencing analysis. G3 (Bethesda). 5: 559-567.

Momose, H., and Gregory, K. F. 1998. Temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae* variable in the methionine content of their protein Applied and Environmental Microbiology. 35: 641-647.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Orduño-Cruz, N., et al. 2015. In vitro selection of a fungal pathogen for use against *Diaphorina citri*. Biological Control. 90: 6-15.

Pilavong, T., Lekprichakul, N., Puyakul, O., Trakolsap, T., and Ammarapala, V. 2012. Thai rice exporting situation towards the emergence of ASEAN economic cooperation (AEC). In 1st Mae Fah Luang University International Conference 29 November-1 December 2012 Mae Fah Luang University,Chiang Rai, Thailand [Online] Available from: http://mfuic2012.mfu.ac.th/electronic_proceeding/Documents/00_PDF/O-SSH/O-SSH-27.pdf [12 August 2015]

Prayana, N. A., Mudjiono, G., and Rahardjo, B. T. 2013. Population management strategy implementation brown planthopper *Nilaparvata lugens* Stal. (Homoptera: Delphacidae) integrated. International Journal of Science and Research. 2: 389-394.

Qazzaz, F. O., Al-Masri, M. I., and Barakat, R. M. 2015. Effectiveness of *Beauveria bassiana* native isolates in the biological control of the mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). Advances in Entomology. 3: 44-55.

Rehner, S. A., Minnis, A. M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J. J., Devotto, L., and Humber, R. A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. Mycologia. 103: 1055-1073.

Roberts, D. W., and Campbell, A. S. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America. 10: 19-76.

Safavi, S. A. 2010. Isolation, identification and pathogenicity assessment of a new isolate of entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* in Iran. Journal of Plant Protection Research. 50: 158-163.

Sega, G. A. 1984. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. 134: 113-142.

Shaikh, S. H., and Mohite, P. 2015. Effect of Entomopathogenic Fungi Against Brown Plant Hopper, *Nilaparvata lugens* (Stal.) (Hemiptera: Delphacidae) Infesting Rice. International Journal of Science and Research (IJSR). 4: 905-907.

Shimazu, M. 2004. Effects of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*,

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

especially tolerance to high temperatures. Applied Entomology and Zoology. 39: 469–475.

Shiwa, Y., Fukushima-Tanaka, S., Kasahara, K., Horiuchi, T., and Yoshikawa, H. 2012. Whole-genome profiling of a novel mutagenesis technique using proofreading-deficient DNA polymerase **δ**. International Journal of Evolutionary Biology. 2012: 1-8.

Sivasankaran, P., Eswaramoorthy, S., and David, H. 1998. Influence of temperature and relative humidity on the growth, sporulation and pathogenecity of *Beauveria bassiana*. Journal of Biological Control. 12: 71-75.

Sogawa, K. 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. Annual Review of Entomology. 27: 49–73.

Sogawa, K. 2015. Planthopper Outbreaks in Different Paddy Ecosystems in Asia: Man-Made Hopper Plagues That Threatened the Green Revolution in Rice. Zhejiang University Press.

The National Science and Technology Development Agency (NSTDA). 2013. Why Thai rice is losing its market share to Vietnam? [Online]. Available from http://www.nstda.or.th/pub/2013/20130710-PosterriceAECEng.pdf [16 September 2015]

Thomas, M. B., and Read, A. F. 2007. Can fungal biopesticides control malaria? Nature Reviews Microbiology. 5: 377-383.

Throne, J. E., Weaver, D. K., Chew, V., and Baker, J. E. 1995. Probit analysis of correlated data: Multiple observations over time at one concentration. Journal of Economic Entomology. 88: 1510-1512.

Thungrabeab, M., and Tongma, S. 2007. Effect of Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) on non target insects. KMITL Science and Technology Journal. 7: 8-12.

UCLA Department of Chemistry and Biochemistry. 2017. Illustrated Glossary of Organic Chemistry. [Online]. Available from http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/M/methanesulfonate.html [5 October 2017]

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Valk, H. 2007. Review of the efficacy of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Plant Protection and Protection Division, Food and Agriculture Organization of the United Nation.

Walstad, J. D., Anderson, R. F., and Stambaugh, W. J. 1970. Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). Journal of Invertebrate Pathology. 16: 221-226.

Wan, H. 2003. Molecular biology of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*: Insect-cuticle degrading enzymes and development of a new selection marker for fungal transformation. Doctoral dissertation, Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany.

Wang, G., Paredes-Sabja, D., Sarker, M. R., Green, C., Setlow, P., and Li, Y. 2012. Effects of wet heat treatment on the germination of individual spores of *Clostridium perfringens*. Journal of Applied Microbiology. 113: 824-836.

Wang, Q., and Xu, L. 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi. Molecules. 17: 2367-2377.

Wilson, M. R., and Claridge, M. F. 1991. Handbook for the Identification of Leafhoppers and Planthoppers of Rice. C.A.B. International, Wallingford, Oxon, U.K.

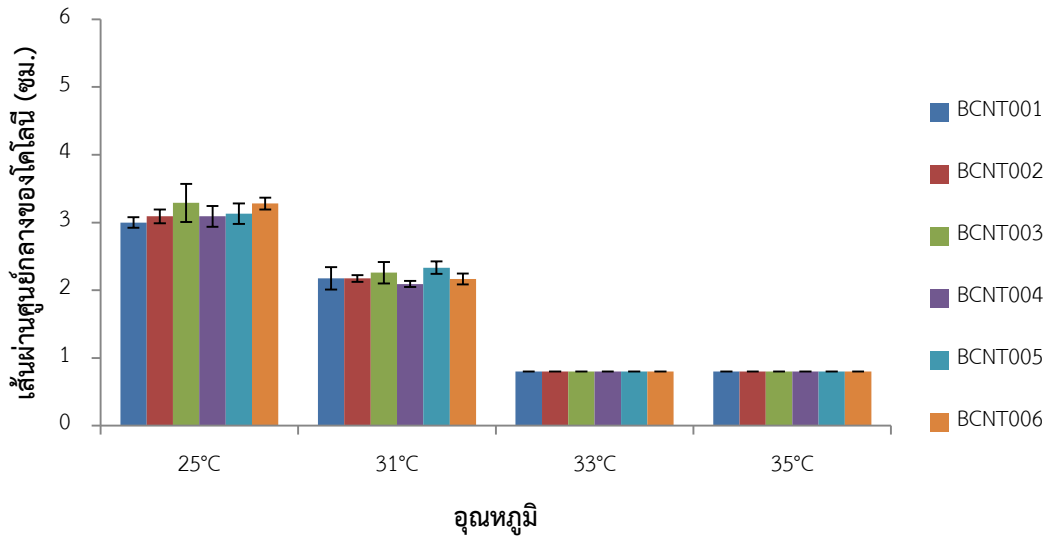
Zhu, Z., et al. 2016. A new approach for breeding low-temperature-resistant *Volvariella volvacea* strains: Genome shuffling in edible fungi. Biotechnology and Applied Biochemistry. 63: 605-615.

Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. Biocontrol Science and Technology. 17: 553-596.

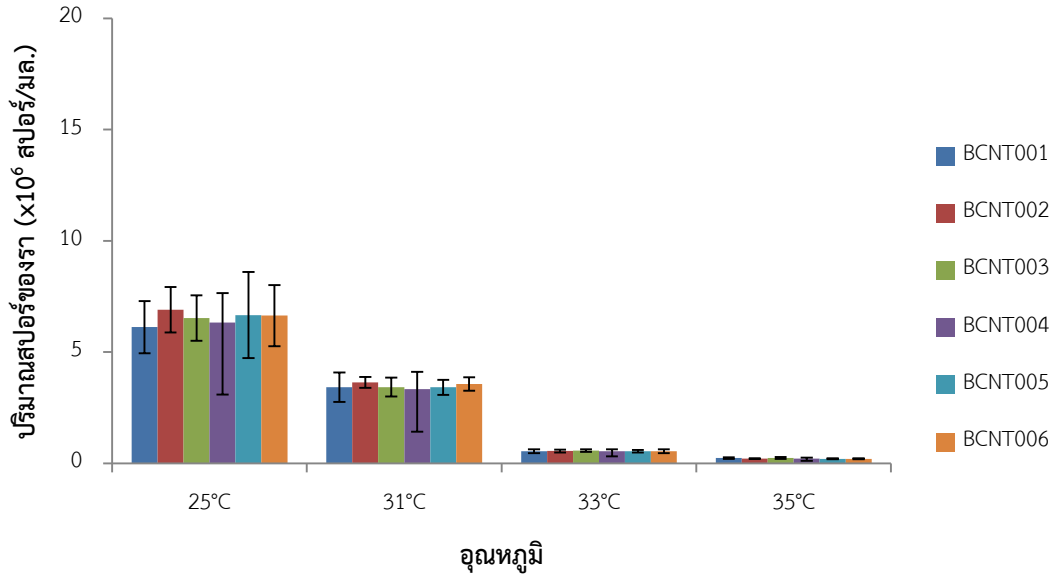
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 1 เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเฉลี่ย ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ 2 จำนวนสปอร์ของราไอโซเลท BCNT001-BCNT006 หลังจากบ่มที่ 25 31 33 และ 35°C เป็นเวลา 7 วัน ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย ±SE จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ภาคผนวก ข

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 1 จุลชีพที่ใช้ในการศึกษา

สปีชีส์	**ไอโซเลท**	**แหล่งที่มา**
Beauveria bassiana	BCNT001	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BCNT002	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BCNT003	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BCNT004	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BCNT005	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BCNT006	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	TISTR3617	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
	BCC22355	สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
	BDOAE001	กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
Metarhizium spp.	Wangthong 1	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	Wangthong 4	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	Visead 1	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
Xanthomonas oryzae pv. *oryzae*	BB288	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
	BB292	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
Xanthomonas oryzae pv. *oryzicola*	BLS	กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 2 ข้อมูล *B. bassaiana* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมการข้าว

ไอโซเลท	ชนิดของแมลง	สถานที่เก็บแมลง	เชื้อราที่แยกได้จากอาหาร SDA-Dodine50	ระยะแมลง	พันธุ์ข้าว	ระยะข้าว	พิกัด	วันที่เก็บตัวอย่าง	วันที่แยกราได้
BCNT001	เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*)	นางดาเรศ ม.11 ต.ท่าชัย อ.เมือง จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	ปทุมธานี 1	ออกรวง	47P 0620578 UTM 1676185	23 ก.พ. 2558	เม.ย. 2558
BCNT002	แมลงหล่า (*Scotinophara coarctata*)	นางแหม่ว ม.3 ต.ท่าชัย อ.เมือง จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	กข41	ออกรวง	47P 0620397 UTM 1676541	20 ก.พ. 2558	เม.ย. 2558
BCNT003	แมลงหล่า (*Scotinophara coarctata*)	ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ม.2 ต.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	กข31	แตกกอ	47P 0622327 UTM 1680445	26 ม.ค. 2558	เม.ย. 2558
BCNT004	เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*)	ศูนย์วิจัยข้าวชัยนาท ม.2 ต.เขาท่าพระ อ.เมือง จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	ชัยนาท 1	แตกกอ	47P 0622327 UTM 1680445	26 ม.ค. 2558	เม.ย. 2558
BCNT005	แมลงหล่า (*Scotinophara coarctata*)	นายชำนาญ ม.2 ต.หนองน้อย อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	กข47	ออกรวง	47P 0608617 UTM 1680506	30 มี.ค. 2558	เม.ย. 2558
BCNT006	เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*)	ต.หนองหม้อ อ.ตาคลี จ.ชัยนาท	*Beauveria* sp.	ตัวเต็มวัย	กข31	ออกรวง	47P 0635275 UTM 1686925	30 มี.ค. 2558	เม.ย. 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

ใช้ Potato dextrose agar ของบริษัท Merck KGaA (Germany)

Sabouraud dextrose agar ที่ผสม 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรของ dodine (SDA-D50)

ส่วนประกอบ

Dextrose (Glucose)	40	กรัม
Peptone	10	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

Dodine ความเข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ใส่ส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้น dodine ลงในหม้อ ต้มให้ส่วนผสมเข้ากันทั้งหมด
2. เทใส่ flask
3. นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที
4. รอให้อาหารอุ่นประมาณ 45-50°C แล้วเติม dodine 1 ไมโครลิตรต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร

Sabouraud dextrose agar ผสม Yeast extract (SDAY)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ส่วนประกอบ

Dextrose (Glucose)	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ใส่ส่วนผสมทั้งหมด ลงในหม้อ ต้มให้ส่วนผสมเข้ากันทั้งหมด
2. เทใส่ flask
3. นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

Sabouraud Dextrose Broth ผสม Yeast extract (SDBY)

ส่วนประกอบ

Dextrose (Glucose)	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

1. ใส่ส่วนผสมทั้งหมด ลงในหม้อ ต้มให้ส่วนผสมเข้ากันทั้งหมด
2. เทใส่ flask
3. นำไป autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวญาณิศา วงศ์วานิช เกิดเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2534 ที่จังหวัดชุมพร สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพฤกษศาสตร์ จากภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2557 ซึ่งได้รับการสนับสนุนทางการศึกษาจากทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษาในการศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University