

การเพิ่มศักยภาพการยับยั้งเชื้อแบงก์มันสำปะหลังสีชมพู ด้วยสารสกัดหยาบไคตินเนสและโปรติเอสร่วมกับเชื้อรา *Beauveria bassiana*

Increasing Exhibitor Potential Against Pink Cassava Mealybug Using Crude Extract of Chitinase and Protease with *Beauveria bassiana*

สุกานดา วิจิตพันธ์ุ์ สุภัทรรสร ทับศรี และ คณิต วิจิตพันธ์ุ์*

Sukanda Vichitphan, Supattarasorn Tabsri and Kanit Vichitphan*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพและศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

Department of Biotechnology and Fermentation Research for Value Added Agricultural Products, Faculty of Technology,
Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author: Email: kanvic@kku.ac.th

(Received: 15 June 2017; Accepted: 4 January 2018)

Abstract: Chitinase and protease produced from two effective entomopathogenic fungi (*Aspergillus flavus* isolate L21A and *Beauveria bassiana* isolate LARTC2, respectively), exhibited potential properties against pink cassava mealybug (*Phenacoccus manihoti*). In this study, *B. bassiana* isolate LARTC2 was selected to test the virulence of the entomopathogenic fungus supplemented with crude enzyme chitinase and crude protease against 3rd instar nymph of pink cassava mealybug in the laboratory. Virulence was evaluated by percent mortality and median lethal time (LT₅₀). The highest effective treatment was found from the condition by using crude enzyme of both chitinase and protease with spores of *B. bassiana* isolate LARTC2 for a 1 x 10⁷ spores/ml. The percent mortality at day 3 and LT₅₀ were 65.56 ± 4.55% and 2.52 days, respectively. The physical evaluation of dead pink cassava mealybug exposed with spores of *B. bassiana* isolate LARTC2 supplemented with crude chitinase and crude protease at day 3 showed the deterioration of insect and mycelium of fungus covering on the insect. The increasing mycelium with white spores of *B. bassiana* isolate LARTC2 on dead pink cassava mealybug was observed when this insect was incubated at 30 °C for 3 days. These results showed the potential of chitinase and protease in increasing the virulence of entomopathogenic fungi against pink cassava mealybug.

Keywords: Pink cassava mealybug, entomopathogenic fungi, chitinase, protease, *Beauveria bassiana*

บทคัดย่อ: การศึกษาคุณลักษณะเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู (pink cassava mealybug หรือ *Phenacoccus manihoti*) ก่อนหน้านี้นพบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus flavus* ไอโซเลท L21A และ โปรติเอสที่ผลิตจาก *Beauveria bassiana* ไอโซเลท LARTC2 มีศักยภาพนำไปใช้ในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นปัจจัยสำคัญในการทำลายเพลี้ยแป้งโดยเอนไซม์จะเข้าย่อยทำลายผนังลำตัวของเพลี้ยแป้งในขั้นตอนแรก จากนั้นราจะเจริญโดยใช้ของเหลวในตัวแมลงเป็นอาหารและทำลายเพลี้ยแป้งในที่สุด การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองนำสารละลายเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสที่ผลิตจากราทั้งสองชนิดมาใช้ร่วมกับสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิตร เพื่อเพิ่มความเสี่ยงในการทำลายตัวอ่อนวัยที่ 3 ของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ในระดับห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองพบว่าการใช้สารละลายเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอส ร่วมกับสารแขวนลอยสปอร์รา มีเปอร์เซ็นต์การตาย (percent mortality) ในวันที่ 3 เท่ากับ $65.56 \pm 4.55\%$ และมีค่า LT_{50} เท่ากับ 2.52 วัน ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายนี้มีค่าสูงกว่าการใช้เฉพาะสารละลายเอนไซม์หรือสารแขวนลอยสปอร์ราเพียงอย่างเดียว จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพบนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู และการเจริญของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 หลังการพ่นด้วยสารละลายเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสร่วมกับสารแขวนลอยสปอร์ราเป็นเวลา 3 วัน พบว่าแมลงถูกทำลาย และมีเส้นใยราปกคลุมตัวเพลี้ยแป้ง ภายหลังจากการนำเพลี้ยแป้งไปบ่ม 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเส้นใยราหนาแน่นขึ้นและสปอร์ของราสีขาวแทงทะลุออกมาและปกคลุมทั่วผนังลำตัวของเพลี้ยแป้ง สรุปได้ว่าสารละลายเอนไซม์ไคติเนสและโปรติเอสช่วยเพิ่มความเสี่ยงของราในการเข้าทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

คำสำคัญ: เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ราก่อโรคในแมลง ไคติเนส โปรติเอส *Beauveria bassiana*

คำนำ

มันสำปะหลังเป็นพืชที่ทำรายได้ให้ประเทศไทยเป็นลำดับ 4 รองลงมาจากยางพารา อ้อย และข้าว ซึ่งสามารถสร้างมูลค่าเข้าสู่ประเทศมากกว่า 6 หมื่นล้านบาทต่อปี ปัจจุบันการผลิตมันสำปะหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ถึง 2557 นั้น จะพบพื้นที่ในการเพาะปลูกและปริมาณผลผลิตที่ได้โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้น คิดเป็นร้อยละ 3.4 และ 8.4 ตามลำดับ ในขณะที่ผลผลิตต่อไร่โดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้นร้อยละ 4.4 (สถาบันอาหาร, 2558) หากวิเคราะห์สถานการณ์ในแต่ละปีจะพบปัญหาที่เกิดขึ้นในการปลูกมันสำปะหลัง คือการระบาดของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่รุนแรงและต่อเนื่องตั้งแต่ปลายปี พ.ศ. 2551 และต้นปี พ.ศ. 2552 และขยายพื้นที่อย่างรวดเร็วจนถึงปัจจุบันซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจในทุกภาคของพื้นที่ปลูกมันสำปะหลัง ในปี พ.ศ. 2559 ได้มีการทำระบบภูมิศาสตร์เพื่อสร้างแบบจำลองถิ่นอาศัย เพื่อทำนายพื้นที่ที่มีความเสี่ยงต่อการระบาดของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูเพื่อใช้ในการตัดสินใจและจัดการป้องกัน

การระบาด (รัฐาภวรรณ และ บุญจคุณ, 2559) แต่ก็ยังไม่สามารถลดการระบาดได้ เนื่องจากการกำจัดเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูนั้นทำได้ยาก เนื่องจากตามลำตัวของเพลี้ยแป้งสีชมพู ปกคลุมด้วย โปรตีน ไคติน แป้ง และไขมัน ทำให้ยากต่อการทำลาย การกำจัดเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูโดยทั่วไปใช้สารเคมีในการป้องกันและกำจัด แต่ปัญหาจากการใช้สารเคมีพวกนี้มีผลเสียมากมาย การใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพราะจุลินทรีย์หลายชนิดมีประสิทธิภาพในการทำลายสูง ทำลายเฉพาะแมลงศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมาย และปลอดภัยต่อผู้ใช้ ราก่อโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) เป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการกำจัดแมลง เนื่องจากราในกลุ่มนี้จะมี ความจำเพาะเจาะจงกับแมลงโดยตรง สามารถเข้าสู่ร่างกายของแมลงโดยทางทะลุผ่านเข้าทางผนังลำตัวแมลง และจะเจริญภายในตัวแมลง ทำลายเนื้อเยื่อและระบบต่าง ๆ ทำให้แมลงตาย (ทิพย์วดี, 2535) ปัจจุบันมีการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ รวมทั้งรา โดยเฉพาะกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยไคติน

โปรตีน และไขมันได้ เพื่อเชื่อมโยงกับความรุนแรงในการก่อโรคของจุลินทรีย์ก่อโรคในแมลงเนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการย่อยผนังลำตัวแมลงก่อนที่จะใช้สารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโต (St. Leger *et al.*, 1986a, b) มีรายงานการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตโดยรา *Aspergillus flavus* ในการผลิตเอนไซม์ที่ส่งออกนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้แก่ ไคตินเนส โปรตีนเอส และไลเปส เพื่อใช้ย่อยผนังชั้นนอกของแมลง ทำให้ราสามารถเข้าไปเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนภายในแมลงได้ (Isaka *et al.*, 2005; Firouzbakht *et al.*, 2015) ดังนั้นกลไกเบื้องต้นในการเข้าทำลายแมลงของราจะต้องมีการสังเคราะห์เอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอสเพื่อทำลายผนังลำตัวก่อนที่จะเข้าไปใช้สารอาหารในตัวแมลง ซึ่งจากกระบวนการนี้จะใช้เวลานาน งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการใช้สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอสที่ผลิตจากรา *Aspergillus flavus* ไอโซเลท L21A และ *Beauveria bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ที่ Tabsri *et al.* (2016) ได้ศึกษาค้นพบแล้วว่ามีความสามารถนำมาใช้ร่วมกับสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ในการทดสอบประสิทธิภาพและความรุนแรงเพื่อลดระยะเวลาในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

วัสดุที่มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. มาลี ตั้งระเบียบ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ใช้ในการผลิตสปอร์ และเอนไซม์โปรตีนเอส ส่วนรา *A. flavus* ไอโซเลท L21A ที่คัดแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (ภัทรภา, 2556) นำมาใช้ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส

2. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2

เลี้ยงราในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน หรือจนรา

เจริญและสร้างสปอร์ จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของรา โดยชะสปอร์ของ *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และปรับจำนวนสปอร์ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 8.15×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอส

เตรียมสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรตีนเอสตามวิธีของ Tabsri *et al.* (2016) โดยมีรายละเอียดดังนี้ นำสารแขวนลอยสปอร์รา *A. flavus* ไอโซเลท L21A และ *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 เติมนลงในอาหารเหลว Sabouraud's dextrose yeast extract (SDY) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสปอร์ของ *A. flavus* ไอโซเลท L21A ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ส่วนสปอร์ของ *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายไม่ซีเลียมของ *A. flavus* ไอโซเลท L21A พร้อมอาหารลงในอาหารเหลว basal salt broth 200 มิลลิลิตร ที่มี 2% (w/v) colloidal chitin เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ไคตินเนส ส่วนไม่ซีเลียมของ *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 พร้อมอาหารถ่ายลงในอาหารเหลว basal salt broth 200 มิลลิลิตร ที่มี 1% (w/v) skim milk powder เพื่อเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส จากนั้นนำไปเขย่าที่ 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 และ 12 วัน ตามลำดับ บ่มเหวี่ยงแยกเอาส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme) ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไคตินเนส 3.52 U/ml และเอนไซม์โปรตีนเอส 187.35 U/ml ไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *B. bassiana*

เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *B. bassiana* ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดขอนแก่น โดยมีขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *B. bassiana* ให้ได้ด้วยเดียวกัน โดยเริ่มจากการปลูกต้นมันสำปะหลังให้มีอายุ 2 เดือน แล้วใช้พริกแห้งแช่ในน้ำแช่เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา *B. bassiana* ลงบนยอดมันสำปะหลังต้นละ 2 ถึง 3 ถัง ปล่อยให้เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

สำปะหลังสีชมพูเจริญเติบโตบนต้นมันสำปะหลัง เป็นระยะเวลา 14 ถึง 16 วัน ซึ่งอยู่ในวัย 3 เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ภัทรภา, 2556)

5. ทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายเอนไซม์ไคตินเนส โปรติเอส และสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

การทดลองนี้ทำตามวิธีของ ภัทรภา (2556) มีการดัดแปลงเล็กน้อย โดยนำใบมันสำปะหลังที่ล้างจนสะอาดแล้วมาตัดเป็นชิ้นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.0 เซนติเมตร นำมาวางลงบนผิวหน้าแผ่นวุ้นเข้มข้น 0.7% (w/v) ในกล่องพลาสติกโดยหันด้านใต้ใบขึ้น จากนั้นแช่ตัวอ่อนวัยที่ 3 ของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ลงบนใบมันสำปะหลัง จำนวน 30 ตัวต่อ 1 กล่อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี จากนั้นเตรียมสารละลาย

เอนไซม์ไคตินเนส โปรติเอส และสปอร์ราของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ตามตารางที่ 1 โดยมีกรรมวิธีทั้งหมด 8 กรรมวิธี ดังนี้ T1 control (0.1% (v/v) tween 80) T2 (crude chitinase) T3 (crude protease) T4 (crude chitinase + crude protease) T5 (สปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2) T6 (สปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 + crude chitinase) T7 (สปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 + crude protease) และ T8 (สปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 + crude chitinase + crude protease) โดยกรรมวิธีที่มีสปอร์รามีความเข้มข้นสุดท้าย 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นพ่นสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ 1 มิลลิลิตร ของแต่ละกรรมวิธี โดยใช้หัวสเปรย์พ่นฝอยขนาดจุขวด 5 มิลลิลิตร มีระยะการสเปรย์ห่างจากกล่องพลาสติก 30 เซนติเมตร เก็บกล่องที่พ่นแล้วในกรงที่มีมุ้งลวดป้องกันแมลงที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู

Table 1. Composition of crude chitinase, crude protease and spores *Beauveria bassiana* isolate LARTC2 of treatment T1 to T8

Treatments	Spore suspension (8.15×10^7 spores/ml) (μl) ¹	Tween 80 (10% (v/v)) (μl) ²	0.1 M phosphate buffer pH 6.0 (μl)	Crude enzyme ³	
				Protease (μl)	Chitinase (μl)
T1 (0.1% (v/v) Tween 80)	-	10	990	-	-
T2 (crude chitinase)	-	10	590	400	-
T3 (crude protease)	-	10	590	-	400
T4 (crude chitinase + crude protease)	-	10	190	400	400
T5 (spores of <i>B. bassiana</i> isolate LARTC2)	122	10	868	-	-
T6 (spores of <i>B. bassiana</i> isolate LARTC2 + crude chitinase)	122	10	468	400	-
T7 (spores of <i>B. bassiana</i> isolate LARTC2 + crude protease)	122	10	468	-	400
T8 (spores of <i>B. bassiana</i> isolate LARTC2 + crude protease + crude chitinase)	122	10	68	400	400

¹ Final concentration is 1×10^7 spores/ml in 1 ml of each treatment

² Final concentration is 0.1 % (v/v) Tween 80 in 1 ml of each treatment

³ Activities of chitinase and protease are 3.52 U/ml and 187.35 U/ml, respectively

ที่ตายหลังจากพ่นเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 7 วัน โดยแยกเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่ตายในวันที่ 3 ออกมา บ่มเพื่อตรวจสอบการเข้าทำลายของสารละลายเอนไซม์ไคตินเอส โปรติเอส และสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 โดยใช้ฟูกันเขี่ยเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูที่ตายวางลงบนกระดาษชรองเบอร์ 1 ในจานแก้วปลอดเชื้อ เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตร ให้ความชื้นโดยใช้ฟองน้ำชุบน้ำกลั่นปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน สังเกตและบันทึกลักษณะการตายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู และลักษณะของราที่เจริญปกคลุมตัวเพลี้ยแป้งสีชมพู เปรียบเทียบผลการทดลองกับกรรมวิธี T1 นำข้อมูลที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การตาย (percent mortality) และวิเคราะห์หาระยะเวลาในการทำให้เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (median lethal time: LT_{50}) ด้วยวิธี probit analysis (Finney, 1971) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป StatPlus

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย (\%)} = \frac{\text{จำนวนเพลี้ยแป้งสีชมพูที่ตาย} \times 100}{\text{จำนวนเพลี้ยแป้งสีชมพูเริ่มต้น}}$$

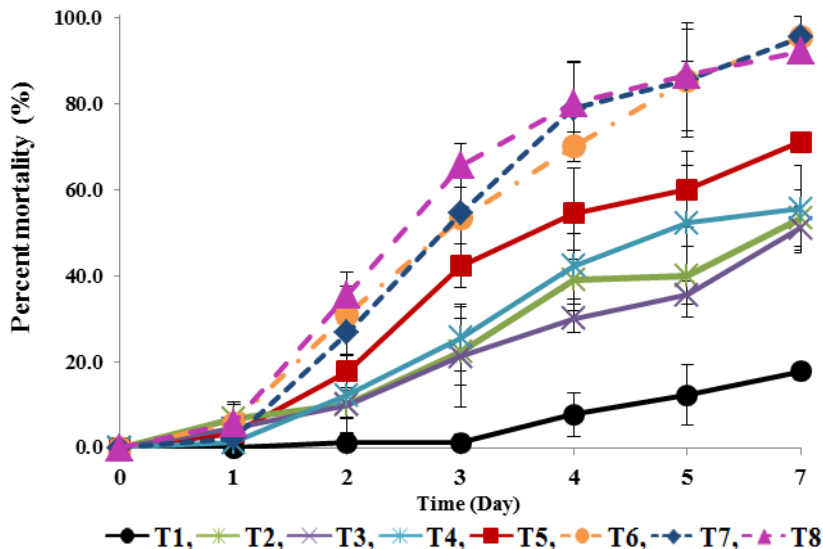


Figure 1. Percent mortality of 3rd instar nymph of pink cassava mealybug after exposed with treatment T1 to T8 for 7 days: T1 = 0.1% (v/v) tween 80, T2 = crude chitinase, T3 = crude protease, T4 = crude chitinase + crude protease, T5 = spores of *B. bassiana*, T6 = spores of *B. bassiana* + crude chitinase, T7 = spores of *B. bassiana* + crude protease and T8 = spores of *B. bassiana* + crude chitinase + crude protease

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดสอบในห้องปฏิบัติการวางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics 17.0

ผลการศึกษาและวิจารณ์

1. ผลการทดสอบความสามารถของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเอสและ โปรติเอสในการเข้าทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูในระดับห้องปฏิบัติการ

ผลการทดสอบสารแขวนลอยสปอร์ของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเอสและ โปรติเอสในการเข้าทำลายตัวอ่อนวัยที่ 3 ของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ฉีดพ่นด้วย 0.1% (v/v) Tween 80 (T1) เป็นเวลา 7 วัน ดังแสดงในภาพที่ 1 พบว่าทุกกรรมวิธี มีเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยแป้งสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้

ในการทดสอบ แต่กรรมวิธีที่มีสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ใช้ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอส (T6, T7, T8) มีอัตราเร็วในการตายสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ โดยดูได้จากความชันของเส้นกราฟในช่วง 1-4 วัน เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ของวันที่ 3 หลังการฉีดพ่น ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูของกรรมวิธี T2-T8 อยู่ในช่วง $21.11 \pm 10.47 - 65.56 \pm 4.55\%$ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงกว่ากรรมวิธี T1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ ส่วนกลุ่มที่ใช้เฉพาะสารละลายเอนไซม์ (T2-T4) มีเปอร์เซ็นต์การตายต่ำกว่า กลุ่มที่มีสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ แม้ว่าในกลุ่มที่มีสารแขวนลอยสปอร์รา (T5-T8) ไม่พบเปอร์เซ็นต์การตายที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$ แต่อย่างไรก็ตามกรรมวิธี T8 ที่มีสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ทั้งสองชนิด (ไคตินเนสและโปรติเอส) มีความสามารถในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูได้สูงที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ $65.56 \pm 4.55\%$ และจากการหาค่าระยะเวลาในการทำให้เพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LT_{50}) ดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า กลุ่มของสารแขวนลอยสปอร์รา

B. bassiana ไอโซเลท LARTC2 ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตร ที่ใช้ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอส (T8) มีค่า LT_{50} น้อยที่สุด เท่ากับ 2.52 วัน หมายความว่าเพลี้ยแป้งสีชมพูถูกทำลายได้เร็วที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การตายที่มีค่าสูงที่สุดสรุปได้ว่าสารละลายเอนไซม์ช่วยเพิ่มความรุนแรงของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ortiz *et al.* (2010) ได้หาความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนที่สังเคราะห์จาก *B. bassiana* ที่เลี้ยงในอาหารต่างชนิดกัน ในการทำลายหนอนผีเสื้อกินใบฝรั่ง (*Galleria mellonella*) พบว่าเปอร์เซ็นต์การตายที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่ราผลิตได้ และจากรายงานของ Pelizza *et al.* (2012) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างราก่อโรคกับกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส โดยทดสอบราก่อโรค 59 ไอโซเลท พบว่า *B. bassiana* ไอโซเลท LPSC1067 สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงสุด และมีความสามารถในการทำลายตักแตนซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตาย 97.7% และใช้ระยะเวลาในการเข้าทำลายตักแตน 3.19 วัน และจากรายงานของ Zhang *et al.* (2011) ได้คัดเลือกรา *B. bassiana* จากตัววงเปลือกแข็ง *Dendroctonus valens* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด 12 ไอโซเลท และพบว่า *B. bassiana* ไอโซเลท Bb1801 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงและสามารถ

Table 2. Percent mortality of 3rd instar nymph of pink cassava mealybug at day 3 after exposed with T1 to T8¹ and LT_{50} of 1×10^7 spores/ml of *B. bassiana*

Treatments	Percent mortality (%) $\pm$ SD	LT_{50} (day) (95% fiducial limits)
T1 (0.1% Tween 80)	1.11 ± 1.72^a	-
T2 (crude chitinase)	21.11 ± 10.47^b	6.54 (6.12-6.96)
T3 (crude protease)	22.22 ± 6.89^b	6.17 (5.43-6.91)
T4 (crude chitinase + crude protease)	25.56 ± 6.89^b	5.61(4.82-6.40)
T5 (spores of <i>B. bassiana</i>)	42.22 ± 4.55^c	4.46 (4.05-4.87)
T6 (spores of <i>B. bassiana</i> + crude chitinase)	54.44 ± 9.58^{cd}	3.18 (2.66-3.70)
T7 (spores of <i>B. bassiana</i> + crude protease)	53.33 ± 0.00^{cd}	3.13 (3.02-3.24)
T8 (spores of <i>B. bassiana</i> + crude chitinase + crude protease)	65.56 ± 4.55^d	2.52 (2.40-2.64)

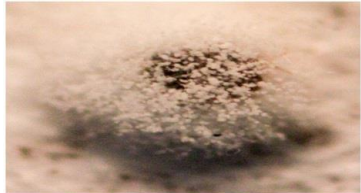
¹ Different superscripts within the same column indicate significant differences ($P < 0.05$)

ทำให้ด้วง *D. valens* ตาย 100% มีค่า LT_{50} 4.6 วัน ที่ความเข้มข้น 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Fang *et al.* (2009) ได้ทำการตัดต่อยีนโปรติเอสและไคตินเนสเข้าไปในยีนของ *B. bassiana* เพื่อให้ผลิตเอนไซม์ทั้งสองชนิดเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองพบว่าสามารถเพิ่มความรุนแรงของรา *B. bassiana* ในการทำลาย *G. mellonella* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และ Fan *et al.* (2010) ได้รายงานการตัดต่อยีนของไคตินเนสเข้าไปใน *B. bassiana* ซึ่งทำให้มีการสังเคราะห์ไคตินมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมทำให้ศักยภาพในการทำลายไคตินที่เป็นส่วนประกอบที่ผนังของแมลงได้เพิ่มขึ้น

2. ผลการศึกษาลักษณะทางกายภาพของเพลี้ยแป้งบนลำปะหลังสีชมพูที่ตายหลังการทดสอบความสามารถของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ร่วมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอสในการเข้าทำลาย

ผลการศึกษาลักษณะการทำลายเพลี้ยแป้งบนลำปะหลังสีชมพู หลังจากการฉีดพ่น 3 วัน และการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 บนเพลี้ยแป้งบนลำปะหลังสีชมพู เมื่อนำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสของกรรมวิธี T1, T4, T5 และ T8 (ตารางที่ 3) สรุปได้ว่าการฉีดพ่น 3 วัน กรรมวิธี T5

Table 3. Physical and morphological changes of 3rd instar nymph of pink cassava mealybug after 3 days exposed to treatment T1, T4, T5 and T8 and the growth of *B. bassiana* isolate LARTC2 after incubated at 30 °C for 3 days

Treatments	3 days after exposure	After 3 days of incubation
T1 (0.1% Tween 80)		
T4 (crude chitinase + crude protease) ¹		
T5 (spores of <i>B. bassiana</i>) ²		
T8 (spores of <i>B. bassiana</i> + crude chitinase + crude protease)		

¹ Activities of chitinase and protease are 1.40 U (400 µl) and 74.94 U (400 µl), respectively.

² Spore concentration is 1×10^7 spores/ml

ที่มีเฉพาะสารแขวนลอยสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 และ T8 ที่มีสารแขวนลอยสปอร์ราพร้อมกับสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอส มีผลทำให้ผนังลำตัวของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูถูกทำลายและมีเส้นใยราเริ่มปกคลุมตัวเพลี้ยแป้ง โดยเฉพาะ T8 ผนังลำตัวถูกทำลายมากกว่า ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่สารละลายเอนไซม์ไคตินเนส และโปรติเอสที่เติมเข้าไปจะย่อยผนังลำตัวแมลงก่อนโดยไม่ต้องรอให้ราสร้างเองซึ่งต้องใช้เวลา นานกว่า ซึ่งแตกต่างจาก T1 และ T4 ที่ผนังลำตัวของเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูยังสมบูรณ์ และราเจริญไม่ชัดเจน เมื่อนำไปบ่มเป็นเวลา 3 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า T5 และ T8 ผนังลำตัวถูกทำลายมากขึ้น เนื่องจากราใช้อาหารในตัวเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู โดยสังเกตเห็นเส้นใยและสปอร์ของราสีขาว *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 แทงทะลุออกมา และปกคลุมผนังลำตัวของเพลี้ยแป้งเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลของสารละลายเอนไซม์เพิ่มความเร็วในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูของการทดลองข้างต้น และสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์โปรติเอสและไคตินเนส สามารถเพิ่มความรุนแรงของรา *B. bassiana* ในการทำลายผนังชั้นนอกของแมลง ทำให้ราสามารถทำลายและเข้าไปเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนภายในแมลงได้อย่างรวดเร็ว (Fan *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2009; Firouzbakht *et al.*, 2015; Ortiz *et al.*, 2010) จากรายงานของ El-Sinary (2002) และ Quesada *et al.* (2006) พบว่าแมลงที่ได้รับเชื้อก่อโรคเข้าไป 3-5 วัน เส้นใยของราจะเจาะเข้าไปในตัวแมลงและปลดปล่อยเอนไซม์ไคตินเนสมาขัดขวางการสร้างไคติน ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนหลังการฟ้น 2 วัน โดยเส้นใยของราจะเข้าไปทางหลอดลม เยื่อผิวหนังบาง ๆ และผิวหนังกำพืดของเซลล์ หลังจาก 3 วัน ราที่เข้าไปในตัวแมลงจะเจริญสร้างเส้นใยแผ่กระจายจนเต็มตัวแมลงแย่งแร่ธาตุอาหาร และทำลายอวัยวะรวมถึงกลไกต่าง ๆ ในระบบตัวแมลง และหลังจาก 4 วัน ที่แมลงได้รับเชื้อราก่อโรค แมลงจะตาย 100%

สรุป

จากการใช้สารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอสจากราที่มีศักยภาพในการทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตจากรา *A. flavus* ไอโซเลท L21A และรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 ตามลำดับ ร่วมกับสปอร์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 พบว่าสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอสสามารถเพิ่มประสิทธิภาพและความรุนแรง ลดระยะเวลาในการเข้าทำลายเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพูของรา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2 อย่างมีนัยสำคัญ เป็นไปได้ว่าสารละลายเอนไซม์ไคตินเนสและโปรติเอสที่เติมลงไปจะเริ่มทำงานโดยการย่อยผนังของแมลงในขั้นตอนแรกทันที โดยไม่ต้องรอให้ราสร้างสารละลายเอนไซม์ทั้งสองชนิดมาเพื่อย่อยผนังแมลง ทำให้ลดระยะเวลาในการเข้าทำลายแมลงโดยที่ราจะแทงเส้นใยเข้าสู่ตัวแมลง และทำให้แมลงตายในที่สุดได้อย่างรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ทุนอุดหนุนปี พ.ศ. 2556 มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยการหมักเพื่อเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบคุณ ผศ.ดร.มาลี ตั้งระเบียบที่ให้ความอนุเคราะห์รา *B. bassiana* ไอโซเลท LARTC2

เอกสารอ้างอิง

- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. เอกสารทางวิชาการ. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 205 หน้า.
- ภัทรภา พิมพ์พันธ์. 2556. การคัดเลือกเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเพลี้ยแป้งสีชมพู (*Phenacoccus manihoti*) ในมันสำปะหลัง.

- วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.
มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. 79 หน้า.
- รัชฎาภรณ์ เงินกลิ่น และ เบญจคุณ แสงทองพราว. 2559.
ระบบสารสนเทศเพื่อการตัดสินใจและการ
จัดการเพลี้ยแป้งมันสำปะหลังสีชมพู
Phenacoccus manihoti Matile-Ferrero
(Hemiptera: Pseudococcidae) ในภาคตะวันออก
และภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออกของประเทศไทย. วารสารเกษตร 32(3): 357-368.
- สถาบันอาหาร. 2558. อุตสาหกรรมมันสำปะหลังของไทย.
(ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: http://fic.nfi.or.th/foodsectordatabank-all2_detail.php?cat=8&type=1 (มีนาคม 2558).
- El-Sinary, N.H. 2002. Influence of the
entomopathogenic fungus, *Beauveria
bassiana* (Balsamo) on the mature larvae of
the potato tuber moth, *Phthorimaea
operculella* (Zeller) under different degrees
of temperature and relative humidity.
Mansoura University Journal of Agricultural
Sciences 27(8): 4151-4161.
- Fan, Y., X. Pei, S. Guo, Y. Zhang, Z. Luo, X. Liao and
Y. Pei. 2010. Increased virulence using
engineered protease-chitin binding domain
hybrid expressed in the entomopathogenic
fungus *Beauveria bassiana*. Microbial
Pathogenesis 49(6): 376-380.
- Fang, W., J. Feng, Y. Fan, Y. Zhang, M.J. Bidochka,
R.J. St. Leger and Y. Pei. 2009. Expressing
a fusion protein with protease and chitinase
activities increases the virulence of the
insect pathogen *Beauveria bassiana*.
Journal of Invertebrate Pathology 102(2):
155-159.
- Finney, D.J. 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge
University Press, Cambridge, 333 p.
- Firouzbakht, H., A. Zibaei, H. Hoda and M.M.
Sohani. 2015. Purification and
characterization of the cuticle-degrading
proteases produced by an isolate of
Beauveria bassiana using the cuticle of
predatory bug, *Andrallus spinidens*
Fabricius (Hemiptera: Pentatomidae).
Journal of Plant Protection Research 55(2):
179-186.
- Isaka, M., P. Kittakoop, K. Kirtikara, N.L. Hywel-Jones
and Y. Thebtaranonth. 2005. Bioactive
substances from insect pathogenic fungi.
Accounts of Chemical Research 38(10):
813-823.
- Ortiz, U.A., L. Riveiro-Miranda, C. Santiago-Alvarez
and E. Quesada-Moraga. 2010. Insect-toxic
secreted proteins and virulence of the
entomopathogenic fungus *Beauveria
bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology
105(3): 270-278.
- Pelizza, S.A., L.A. Eliades, M.C.N. Saparrat, M.N.
Cabello, A.C. Scorsetti and C.E. Lange.
2012. Screening of Argentine native fungal
strains for biocontrol of the grasshopper
Tropidacris collaris: relationship between
fungal pathogenicity and chitinolytic
enzyme activity. World Journal of
Microbiology and Biotechnology 28(4):
1359-66.
- Quesada-Moraga, E., A. Ruiz-Garcia and C.
Santiago-Álvarez. 2006. Laboratory
evaluation of entomopathogenic fungi
Beauveria bassiana and *Metarhizium
anisopliae* against puparia and adults of
Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae).
Journal of Economic Entomology 99(6):
1955-1966.
- St. Leger, R.J., R.M. Cooper and A.K. Charnley.
1986a. Cuticle-degrading enzymes of
entomopathogenic fungi: cuticle

- degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. Journal of Invertebrate Pathology 47(2): 167-177.
- St. Leger, R.J., A.K. Charnley and R.M. Cooper. 1986b. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. Journal of Invertebrate Pathology 47(3): 295-302.
- Tabstri, S., K. Vichitphan and S. Vichitphan. 2016. Characterization of chitinase and protease production from entomopathogenic fungi against pink cassava mealybug. pp. 381-391. *In*: Proceeding of The National and International Graduate Research Conference 2016 (NIGRC KKU-2016). Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand.
- Zhang, L., Y. Liu, J. Yao, B. Wang, B. Huang, Z. Li, M. Fan and J. Sun. 2011. Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) isolates as potential agents for control of *Dendroctonus valens*. Insect Science 18(2): 209-216.
-