

Thesis Title	Efficacy of Entomopathogenic Fungi and Their Pathogenicity on Fruit Fly and Two-spotted Spider Mite	
Author	Miss Thet Thet Mar	
Degree	Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)	
Thesis Advisory Committee	Prof. Dr. Saisamorn Lumyong	Advisor
	Asst. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul	Co-advisor
	Dr. Wasu Pathom-aree	Co-advisor

ABSTRACT

Pathogenic activity and potential efficacies of six entomopathogenic fungal strains locally isolated from naturally infected insect cadavers collected at four different locations in Chiang Mai province and two species of *Cordyceps* were evaluated in this study. Total of eight fungal isolates were evaluated for their pathogenicity on two different hosts in order to investigate their infectious efficacy in broad host ranges by using conidial suspension in both soil and plant. Though all isolates were pathogenic to both agricultural pests, *Metarhizium flavoviride*, *Paecilomyces lilacinus* and *Beauveria bassiana* (MF03) were highly virulence against the pupae of *Bactrocera* spp. based on the minimal concentration (LD₅₀) and lethal time to kill 50% of fruit fly (LT₅₀). In case of two-spotted spider mites, *Tetranychus*

urticae Koch, the most effective isolates were *M. flavoviride*, *P. lilacinus* and two isolates of *B. bassiana* (MF03 and MG03).

The suitable substrate for the aerial conidia production of native fungal isolates was selected by using five grains such as rice, wheat, rye, corn and sorghum. Spore productivity on sorghum yielded the maximum amount of spores for *P. lilacinus* MT02 and *M. flavoviride* CT01 whereas rice yielded the greatest amount of spore for *B. bassiana*, MF03. The quality control parameters; viability, purity and pathogenic activity of spores were also examined. Spore viability was over 80% for all isolates that had been inoculated for 60 days. Harvested conidial suspension of *P. lilacinus* obtained highest virulence against *Bactrocera* spp. at the concentration of (1×10^6 spore ml⁻¹). This is a promising strategy for the mass production of native entomogenous fungal strains in solid substrate with least production cost.

Eight entomogenous fungal isolates were screened their antibiotic activity in five liquid media by using agar-well diffusion method. Among all evaluated fungal strains, *C. militaris* and *M. flavoviride* did not produce any antimicrobial activities except *M. flavoviride* showed anti-yeast activity, *Candida albicans*, in PDB medium. Moreover, antifungal activity was not detected in *P. lilacinus*. All EPFs had no clear zone against *Collectotrichum* sp. and *Sclerotium solani*. Anti- *Staphylococcus aureus* activity was found only in *B. bassiana* (MG03) in 802C medium and *C. pseudomilitaris* in SMY and GSSM production media. The rest of the insect pathogenic fungi produced anti- *Bacillus cereus* and anti- *Proteus mirabilis* activity. Red pigment producing *B. bassiana* (MF03) and water extract of *P. lilacinus* displayed antibacterial activity towards Gram-negative bacteria, *P. mirabilis*. Only *C. pseudomilitaris* showed anti- *Ralstonia solanacearum* in SMY medium. From this

result, it is clear that the growth media plays an important role in the determination of antibacterial and antifungal activities without including insect-derived materials.

When all tested fungal isolates were detected for cuticle-degrading enzymes, chitinase was more activated in the supernatant from the culture in combination of 1.0% colloidal chitin with 0.8% glucose. Additionally, *P. lilacinus* produced highest protease activity followed by *M. anisopliae*.

Nevertheless dipicolinic acid is a known insecticidal secondary metabolite in insect pathogenic fungi but the occurrence of DPA from fungal extract of native *M. flavoviride* by high performance liquid chromatography is the very first report. The dipicolinic acid concentration was observed 43.72 mg/L at the retention time 0.132 min. The fungal extracts of four virulence strains were proved safety to vertebrate when *in vitro* cytotoxicity was investigated in Vero cell line (monkey kidney).

Keywords: entomopathogenic fungi, secondary metabolites, pathogenicity, cytotoxicity

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ประสิทธิผลของฟางที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงและความสามารถในการก่อโรคในแมลงผลไม้และไรแมงมุมสองจุด	
ผู้เขียน	นางสาวเทส เทส มาร์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ถ้ายอง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ผศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. วสุ ปฐมอารีย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษากิจกรรมที่ทำให้เกิดโรคและศักยภาพของราแมลงหกชนิดที่แยกได้จากซากแมลงที่ติดเชื่อตามธรรมชาติในพื้นที่สี่แหล่งในจังหวัดเชียงใหม่ และเชื้อรา *Cordyceps* จำนวนสองสายพันธุ์รวมทั้งหมดแปดไอโซเลต ทำการศึกษาความสามารถที่ทำให้เกิดโรคในแมลงและไรศัตรูพืช เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพในวงกว้างโดยใช้สปอร์แขวนลอยทดสอบในดินและพืช เชื้อราแต่ละไอโซเลตก่อโรคในแมลงและไรพืชทั้งสองชนิด รา *Metarhizium flavoviride* รา *Paecilomyces lilacinus* และรา *Beauveria bassiana* MF03 มีความรุนแรงในการก่อโรครับด้กด้แมลงวันผลไม้ (*Bactrocera* spp.) ด้วยระดับความเข้มข้นต่ำสุด (LD_{50}) และระดับการตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (LT_{50}) ในแมลงวันผลไม้ ในกรณีของไรแมงมุม *Tetranychus urticae* Koch ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ รา *M. flavoviride* รา *P. lilacinus* และสองไอโซเลตของรา *B. bassiana* MF03 และ MG03

คัดเลือกสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสปอร์ของราท้องถิ่นโดยใช้ธัญพืชห้าชนิด ได้แก่ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวไรน์ ข้าวโพด และข้าวฟ่าง พบรา *P. lilacinus* MT02 และรา *M. flavoviride* CT01 ผลิตสปอร์สูงสุดในข้าวฟ่าง ในขณะที่รา *B. bassiana* MF03 มีการสร้างสปอร์มากที่สุดในข้าว เมื่อทดสอบปัจจัยในการควบคุมคุณภาพของความสามารถในการอยู่รอด ความบริสุทธิ์ และกิจกรรมที่ทำให้เกิดโรคของสปอร์ พบสปอร์ราทุกไอโซเลตสามารถอยู่รอดมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มเป็นเวลา 60 วัน สปอร์แขวนลอยที่เก็บจากรา *P. lilacinus* ให้ความรุนแรงมากที่สุด ในแมลงวันผลไม้ที่ความเข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นวิธีที่มีแนวโน้มที่จะใช้ในการผลิตมวลของราแมลงสายพันธุ์ท้องถิ่นในสับสเตรทที่เหมาะสมโดยมีราคาต่ำ

คัดกรองการผลิตสารปฏิชีวนะของราแม่ลงทั้งแปดไอโซเลตในอาหารเหลวห้ำชนิดด้วยวิธี agar-well diffusion พบราแม่ลง *C. militaris* และรา *M. flavoviride* ไม่สร้างกิจกรรมการต้านจุลชีพ ยกเว้น *M. flavoviride* ที่ผลิตสารต่อต้านยีสต์ *Candida albicans* ในอาหาร PDB กิจกรรมการต้านราตรวจไม่พบใน *P. lilacinus* ซึ่งราแม่ลงทุกสายพันธุ์ไม่แสดงวงใสในการต้านรา *Collectotrichum* sp. และรา *Sclerotium solani* กิจกรรมการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบในรา *B. bassiana* MG03 ในอาหาร 802C และรา *C. pseudomilitaris* ในอาหาร SMY and GSSM ราแม่ลงที่เหลือสร้างกิจกรรมต้านเชื้อ *Bacillus* และเชื้อ *Proteus* ราที่ผลิตตรงควัดฤๅสีแดง *B. bassiana* MG03 และสารสกัดด้วยน้ำของรา *P. lilacinus* แสดงกิจกรรมการต้านแบคทีเรียแกรมลบคือเชื้อ *P. mirabilis* มีเพียง *C. pseudomilitaris* แสดงการต้าน *Ralstonia solanacearum* ในอาหาร SMY จากผลการทดลองนี้ เห็นได้ชัดเจนว่าอาหารที่ใช้ในการเจริญมีบทบาทสำคัญในการกำหนดกิจกรรมการต้านแบคทีเรีย และรา โดยไม่มีส่วนประกอบของแม่ลง

เมื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์สลายคิวติเคิลจากราแม่ลงท้องถิ่นทุกไอโซเลต พบว่าการสร้างไคตินเนสมากในอาหารที่มี colloidal chitin 1% ร่วมกับกลูโคส 0.8% นอกจากนี้ *P. lilacinus* ผลิตกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนสได้สูงสุด รองลงมาคือ *M. anispliae*

อย่างไรก็ตามกรด dipicolinic เป็นสารทุติยภูมิของราแม่ลงที่มีผลในการทำลายแม่ลง ซึ่งกรด dipicolinic ที่พบจากการสกัดจากอาหารที่ใช้เลี้ยงราท้องถิ่น *M. flavoviride* เป็นการรายงานครั้งแรก เมื่อวิเคราะห์ด้วย high Performance liquid chromatography พบว่าที่ retention time 0.132 นาที วัดปริมาณความเข้มข้นของกรด dipicolinic ได้ 43.72 มิลลิกรัมต่อลิตร สารสกัดจากเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความรุนแรงพิสูจน์ได้ว่ามีความปลอดภัยต่อสัตว์มีกระดูกสันหลังเมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero เซลล์ (เซลล์ไตลิง) ในห้องปฏิบัติการทดลอง

คำสำคัญ: ราแม่ลง สารทุติยภูมิ การทำให้เกิดโรค การเป็นพิษ