บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เชื้อราในสกุล *Hypocrella* ได้รับความสนใจศึกษามาเป็นเวลากว่า 100 ปี เนื่องจากเป็นเชื้อราที่ก่อโรคในแมลงตามธรรมชาติ เชื้อราสกุลนี้จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Pyrenomycetes, Order Hypocreales, Family *Clavicipitaceae* (Hawksworth *et al*., 1995) ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อราสกุล *Hypocrella* ประมาณ 40 ชนิดทั่วโลก และมีประมาณ 15 ชนิดที่พบในประเทศไทย (Evans and Hywel-Jones, 1997) เชื้อราสกุล *Hypocrella* เป็นเชื้อราที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) ส่วนระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ถูกจัดเป็นสกุล *Aschersonia* ซึ่งการสืบพันธุ์ทั้งสองนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกัน (Petch, 1921, Dingley, 1954, Mains, 1959a, b) เชื้อราสกุลนี้เป็นปรสิตของแมลงในวงศ์ *Homoptera* สกุล *Lecaniidae* และ *Aleyrodidae* ซึ่งได้แก่ เพลี้ยหอย (scale insect) จึงมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงโดยชีววิธี เช่น *Aschersonia aleyrodis* ใช้ควบคุมและกำจัดเพลี้ยหอยและแมลงหวี่ขาว (Ramakers and Samson, 1984, Fransen, 1987) นอกจากนี้ *Hypocrella* บางชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น hypocrellin ซึ่งมีคุณสมบัติต้าน ไวรัส และมะเร็งได้ (Hudson *et al*., 1994, Diwu, 1995, Zhi-Jin *et al*., 1999)

สำหรับเชื้อรา *Hypocrella scutata* มีรายงานการพบเป็นครั้งแรกที่ประเทศสิงคโปร์โดย Petch (1921) ในประเทศไทย Srivichai and Hywel-Jones (1999) สำรวจพบเชื้อราชนิดนี้จากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส เชื้อราชนิดนี้มีความแตกต่างจากเชื้อราสายพันธุ์อื่นในสกุลเดียวกันโดยจะสร้าง stroma สีส้มหรือสีน้ำตาล เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ประมาณ 1 เซนติเมตรขึ้นไป

1. แยกเชื้อและคัดเลือกราแมลง *H. scutata* ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เชื้อราในสกุล *Hypocrella* ได้รับความสนใจศึกษามาเป็นเวลากว่า 100 ปี เนื่องจากเป็นเชื้อราที่ก่อโรคในแมลงตามธรรมชาติ เชื้อราสกุลนี้จัดอยู่ใน Phylum Ascomycota, Class Pyrenomycetes, Order Hypocreales, Family *Clavicipitaceae* (Hawksworth *et al*., 1995) ปัจจุบันมีรายงานการพบเชื้อราสกุล *Hypocrella* ประมาณ 40 ชนิดทั่วโลก และมีประมาณ 15 ชนิดที่พบในประเทศไทย (Evans and Hywel-Jones, 1997) เชื้อราสกุล *Hypocrella* เป็นเชื้อราที่มีระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (teleomorph) ส่วนระยะที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorph) ถูกจัดเป็นสกุล *Aschersonia* ซึ่งการสืบพันธุ์ทั้งสองนี้มีลักษณะทางพันธุกรรมที่มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกัน (Petch, 1921, Dingley, 1954, Mains, 1959a, b) เชื้อราสกุลนี้เป็นปรสิตของแมลงในวงศ์ *Homoptera* สกุล *Lecaniidae* และ *Aleyrodidae* ซึ่งได้แก่ เพลี้ยหอย (scale insect) จึงมีการนำมาใช้ควบคุมแมลงโดยชีววิธี เช่น *Aschersonia aleyrodis* ใช้ควบคุมและกำจัดเพลี้ยหอยและแมลงหวี่ขาว (Ramakers and Samson, 1984, Fransen, 1987) นอกจากนี้ *Hypocrella* บางชนิดสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น hypocrellin ซึ่งมีคุณสมบัติต้านไวรัส และมะเร็งได้ (Hudson *et al*., 1994, Diwu, 1995, Zhi-Jin *et al*., 1999)

สำหรับเชื้อรา *Hypocrella scutata* มีรายงานการพบเป็นครั้งแรกที่ประเทศสิงคโปร์โดย Petch (1921) ในประเทศไทย Srivichai and Hywel-Jones (1999) สำรวจพบเชื้อราชนิดนี้จากป่าพรุสิรินธร อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส เชื้อราชนิดนี้มีความแตกต่างจากเชื้อราสายพันธุ์อื่นในสกุลเดียวกันโดยจะสร้าง stroma สีส้มหรือ

สีน้ำตาล เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ประมาณ 1 เซนติเมตรขึ้นไป ลักษณะของ stroma มีขอบบางตรงกลางนูนขึ้น มีลักษณะคล้ายโล่ มักพบอยู่ด้านบนของใบพืชในสกุล *Syzygium* ซึ่งได้แก่ หว้าหิน (*Syzygium tumida*) และหว้าน้ำ (*Syzygium oblatum*) และสร้างโคนิเดียรูปร่างรี หัวท้ายมน ซึ่งแตกต่างจากโคนิเดียของราในสกุล *Aschersonia* ที่มีรูปร่างรี หัวท้ายแหลม (fusiform) อยู่บน phialide

เชื้อราก่อโรคในแมลงนอกจากมีประโยชน์ในการควบคุมสมดุลของแมลงในธรรมชาติ และในการควบคุมศัตรูพืชด้วยชีววิธีแล้ว ราแมลงยังมีประโยชน์ทางด้านการแพทย์ โดยเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สำคัญ เช่น ถั่งเฉ้า (*Cordyceps sinensis*) เป็นราแมลงที่ใช้เป็นยาบำรุงร่างกายในประเทศจีน โดยมีสาร cordycepin ที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Bao *et al*., 1994) ราแมลงบางชนิดผลิตสารต่อต้านเชื้อไวรัส HIV และสารต้านมะเร็ง (Hudson *et al*., 1994, Diwu, 1995, Zhi-Jin *et al*., 1999) และสารต้านมาลาเรีย (Kittakoop *et al.*, 1999, Isaka *et al.*, 2001, Jaturapat *et al.*, 2001) การศึกษานี้สามารถเพาะแยกเชื้อราแมลง *H. scutata* ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ จึงได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ และฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากเชื้อรานี้ ซึ่งอาจพบสารต้านจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางด้านการแพทย์

ตรวจเอกสาร

ในช่วงศตวรรษที่ 16 และ 17 การผลิตผ้าไหมซึ่งเป็นสินค้าสำคัญของประเทศฝรั่งเศสและ อิตาลีได้รับความเสียหายจากการตายของตัวอ่อนหนอนไหม เนื่องมาจากสิ่งที่เรียกกันว่า muscardine มาจากภาษาอิตาเลียน “mascardino” หมายถึง ผลไม้ฉาบน้ำตาลที่มีกลิ่นคล้ายชะมด หรืออาจมาจากภาษาฝรั่งเศส “muscadin” หมายถึง ผลไม้ฉาบน้ำตาลและขนมกวนต่างๆ เนื่องจากลำตัวของแมลงที่ตายเปลี่ยนแปลงเป็นซากแข็ง สีขาวคล้ายผลไม้ที่ฉาบด้วยน้ำตาล ต่อมาในปี 1835 Agostino Bassi ค้นพบเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่เป็นสาเหตุของโรค white-muscardine ในตัวอ่อนหนอนไหม (Hywel-Jones, 2002) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับราแมลงในยุคแรกๆ เพื่อหาสาเหตุการเกิดโรคในแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ตัวอ่อนหนอนไหม และ ผึ้ง

ราแมลง (insect fungus) หมายถึงราที่เจริญเติบโตในแมลง อาจจะอยู่ร่วมกับแมลงที่มีชีวิต (Suh *et al.,* 2001) หรือทำให้เกิดโรคและสามารถฆ่าแมลงได้ (Demain, 1996) โดยราที่เจริญเติบโตในแมลงที่มีชีวิตนั้นจะอยู่ในรูปของเซลล์ยีสต์ซึ่งเรียกว่า yeast-like endosymbionts (YLSs) (Suh *et al.,* 2001) และจะสามารถเปลี่ยนรูปเป็นลักษณะที่มีเส้นใย (filamentous) ได้ ซึ่งจะเป็นลักษณะที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic) เช่นกัน แต่ในขณะที่อยู่ในรูปของ YLSs นั้นจำเป็นที่แมลงต้องมีชีวิต เนื่องจากปัจจัยสำคัญในการเจริญของ YLSs คือสารอินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากตัวแมลง จากการศึกษาของ Suh และคณะ (2001) พบว่า YLSs จะมีความจำเพาะต่อชนิดของแมลงที่อาศัย และ YLSs ส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษาจัดเป็นราในกลุ่ม filamentous ascomycetes (Euascomycetes) ไม่ใช่ true yeast (Saccharomycetes) ส่วน insect-pathogenic fungus จะเป็นราที่มี entomopathogenic activity คือสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อ (infect) และทำให้แมลงตายได้ โดยเชื้อราเหล่านี้จะสร้างสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เช่น *Beauveria bassiana* ผลิตสาร bassianolide ซึ่งเป็น

cyclodepsipeptide ที่เป็นพิษต่อตัวอ่อนหนอนไหม (Kanaoka *et al.*, 1975 อ้างโดย Demain, 1996) *Metarhizium anisopliae* ผลิตสาร peptido-lactone toxin ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแมลงที่รู้จักกันในชื่อ destruxins (Lee *et al.*, 1975 อ้างโดย Demain, 1996) ตัวอย่างของราที่ทำให้เกิดโรคในแมลง แสดงในตารางที่ 1

ราแมลงมีมากกว่า 700 ชนิด แต่มีไม่กี่ชนิดที่พบได้บ่อยและมีบทบาทสำคัญทางการเกษตร ได้แก่ *Beauveria* sp., *Metarhizium* sp., *Paecilomyces* sp., *Aschersonia* sp., *Verticillium* sp., *Entomophthora* sp. เป็นต้น (Samson, 1995, Moore-Landecker, 1996, Deshpande, 1999, Hywel-Jones, 2002)

ราแมลงที่ก่อโรคแบ่งอย่างกว้างๆได้ 2 ประเภท คือ (Hywel-Jones, 2002)

1. General, opportunistic pathogens เป็นราแมลงที่สามารถก่อโรคกับแมลงได้หลายชนิด สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยทั่วไป เช่น *B. bassiana, M. anisopliae, Paecilomyces fumosoroseus* และ *P. farinosus*

2. Fastidious pathogens เป็นราก่อโรคที่มีความจำเพาะกับแมลงบางชนิด ยากต่อการแยกเชื้อและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ส่วนใหญ่เป็นราแมลงใน family Clavicipitaceae

นอกจากนี้ยังอาจจัดแบ่งเป็นพวก obligate parasite (จำเป็นจะต้องมี host) หรือ เป็น saprotrophs แต่สามารถเป็นปรสิตในแมลงได้เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (Moore-Landecker, 1996)

ตารางที่ 1 ราที่ทำให้เกิดโรคในแมลงและ arthropods ที่พบบ่อย

Table 1 Some common fungi that parasitize insects and arthropods

Fungus	Hosts	Distribution
Metarhizium anisopliae (Deuteromycota)	many hosts (lepidoptera, coleoptera, orthoptera, hemiptera, hymenoptera)	worldwide
Beauveria bassiana (Deuteromycota)	all	worldwide
Hirsutella thompsonii (Deuteromycota)	arachnida (mites)	worldwide
Cordyceps militaris (Ascomycota)	many larvae and pupae of lepidoptera, some coleoptera and hymenoptera	worldwide
Nomuraea rileyi (Deuteromycota)	larvae and pupae of lepidoptera, coleoptera	worldwide
Paecilomyces farinosus (Deuteromycota)	many hosts (lepidoptera, diptera, homoptera, coleoptera, hymenoptera, arachnida)	worldwide
Verticillium lecanii (Deuteromycota)	several, especially aphids, scale insect	widespread, tropics and sub-tropics
Entomophthora, Erynia and similar fungi (Zygomycota)	various, often host-specific, e.g. *Entomophthora muscae* on housefly, *Erynia neoaphidis* on aphids	worldwide
Coelomomyces species (Chytridiomycota)	mosquitoes and midges; often host-specific	common

ที่มา: Deacon (1997)

ความสำคัญของราแมลง

จากยุคแรกๆของการศึกษาราแมลง เป็นไปในแนวทางการสืบหาสาเหตุการก่อโรคในแมลงและการป้องกันการเกิดโรคดังกล่าว แต่ปัจจุบันการศึกษาเรื่องนี้ได้เน้นไปในทางการนำราแมลงที่ถูกค้นพบมาใช้ประโยชน์ในด้านการควบคุมโดยชีววิธี (biological control) และเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

ราแมลงกับการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี

ในธรรมชาติราแมลงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ในปี 1900 เป็นปีที่ประสบความสำเร็จในการนำราแมลง *Aschersonia* sp. มาใช้ควบคุมแมลง citrus whitefly (Elander and Lowe, 1992) หลังจากนั้น การค้นคว้าเพื่อนำราแมลงมาใช้ในการควบคุมแมลงชนิดต่างๆ ก็มีเพิ่มขึ้น ในปี 1950 กลุ่มประเทศทางยุโรปตะวันออกได้เริ่มค้นคว้าเชื้อรา *B. bassiana* เพื่อใช้ควบคุมแมลง Colorado beetle ส่วนประเทศทางยุโรปตะวันตก ได้ศึกษาพัฒนาและการติดตามการก่อโรคของราแมลงในสภาพไร่นา รวมถึงการผลิตและวิธีการใช้ราแมลงในการควบคุมแมลง ในประเทศสหรัฐอเมริกา ได้มีการพัฒนาเทคนิคทางการควบคุมโดยชีววิธี เพื่อป้องกันการระบาดของแมลงศัตรูพืช เช่น การใช้ราแมลง *Entomophaga maimaiga* ในการควบคุมผีเสื้อกลางคืน ราแมลง *Lagenidium giganteum* หรือ *Coelomonomyces* ในการทำลายยุง (Moore-Landecker, 1996) ราแมลงบางชนิดได้นำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการค้า เป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ *B. bassiana* มีชื่อทางการค้า คือ Mycotrol® ใช้ควบคุม whiteflies (Jackson,1997) Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineat*a), European corn borer (*Ostrina nubialis*) (Elander and Lowe, 1992), ปลวก (*Coptotermes curvignathus*) (Sajap and Jan, 1990) และ pine caterpillar ในประเทศจีน (Moore-Landecker, 1996) ราแมลง *M. anisopliae* มีชื่อทางการค้า คือ Bio-Blast® และ Bio-Path® (Jackson, 1997) ใช้ควบคุมแมลง spittle bug (*Mahanarus posticata*) ของต้นอ้อย (Elander and Lowe,

1992) แมลงสาบ (Jackson, 1997) และลดจำนวน leafhoppers และ froghoppers ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (Moore-Landecker, 1996) ราแมลง *Verticilium lecanii* ใช้ควบคุมเพลี้ย, whitefiles และแมลงอื่นๆ (Lisansky and Hall, 1983)

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราแมลง

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากราแมลง แสดงในตารางที่ 2

Hypocrellins A (HA) และ B (HB) คือ รงควัตถุ ที่แยกได้จากเชื้อราแมลง *Hypocrella bambusae* และ *Shiraia bambusicola* โดย *H. bambusae* เป็นปรสิตของ *Sinarundinaria* sp. ในประเทศจีนมีการนำสารนี้มาใช้นานมาแล้วในทางการแพทย์แผนโบราณ ลักษณะโครงสร้างบางส่วนของ HA และ HB เป็นอนุพันธ์ของ perylene quinonoid hypocrellin สามารถนำมาใช้เป็น phototherapeutic agent รักษาแผลที่ผิวหนังได้ (Nenghui and Zhiyi, 1992) นอกจากนั้นยังมีฤทธิ์ฆ่าเซลล์มะเร็งด้วย (Dong *et al.* 1987 อ้างโดย Nenghui and Zhiyi, 1992)

Krasnoff และคณะ (1996) ศึกษาสารสกัดที่ได้จากส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ *Aschersonia* sp. และนำมาทดสอบฤทธิ์การฆ่าแมลง โดยทดสอบกับ *Drosophila melanogaster* พบว่าสารที่แยกได้ คือ destruxins A4 และ A5 มีฤทธิ์ฆ่าแมลง โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 41 ppm และ 52 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า สาร destruxins มีความเป็นพิษต่อพืช มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Krasnoff *et al.*, 1996) ต้านไวรัส (Sun *et al.*, 1994) และ เป็นพิษต่อแมลง (Poprawski *et al.,* 1985)

Isaka และคณะ (2001) ศึกษาสารสกัดจากราแมลง *Cordyceps nipponica* BCC1389 และทดสอบการยับยั้งเชื้อมาลาเรียในหลอดทดลอง กับเชื้อ *Plasmodium falciparum* (k1, multidrug resistant strain) พบว่าสารที่แยกได้คือ codypyridones A และ B สามารถยับยั้งเชื้อ *P. falciparum* ได้โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.066 และ 0.037 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ พบว่าสารนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำมาก

Boonphong และคณะ (2001) ได้นำเอาเส้นใยของเชื้อ *Aschersonia tubulata* BCC1785 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดแยกสาร ศึกษาโครงสร้างของสารและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าสารที่แยกได้คือ dustanin และ 3β-acetoxy-15α, 22-dihydroxyhopane มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อวัณโรค *Mycobacterium tuberculosis* H37R9 โดยให้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ (minimum inhibitory concentration, MIC) เท่ากับ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 2 สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบในราแมลง

Table 2 Bioactive compounds from insect fungi

Fungus	Bioactive compounds	Activity	Reference
Hypocrella bambusae, Shiraia bambusicola	Hypocrellins A and B	Phototherapeutic, Antitumor	Nenghui and Zhiyi, 1992 Dong *et al.* 1987
Aschersonia sp.	Destruxins A4 and A5	Insecticide	Poprawski *et al.,* 1985 Krasnoff *et al.*, 1996
	Destruxins	Phytotoxic Antitumor Antiviral	Krasnoff *et al.*, 1996 Sun *et al.*, 1994
Aschersonia tubulata BCC1785	Dustanin3β-acetoxy-15α,22-dihydroxyhopane	Antimycobacterial	Boonphong *et al.,* 2001
Cordyceps nipponica BCC1389	Codypyridones A and B	Antimalarial	Isaka *et al.,* 2001

การศึกษาราแมลงในประเทศไทย

ราแมลงที่ถูกพบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อ 70 ปีก่อน คือ *Cordyceps* โดยพบเจริญบนตัวต่อขนาดใหญ่ (hornet) และได้ถูกส่งไปให้ Tom Petch จำแนกชนิด ได้เป็นเชื้อ *Cordyceps gentilis* (Ces.) Sacc. แต่ต่อมาได้จัดจำแนกใหม่เป็น *Cordyceps sphecocephala* (Klotzsch) Sacc. นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Isaria orthopterorum* Petch (*Beauveria* amorpha Hohn.) จากการเก็บตัวอย่างบนดอยสุเทพ (Hywel-Jones, 2002)

เชื้อรา *M. anisopliae* ของด้วงแรดพบในประเทศไทยมานานแล้ว แต่ไม่ได้ตีพิมพ์เผยแพร่เป็นหลักฐาน โดยปี พ.ศ. 2500 อภิวัต อรุนินท์ เป็นผู้ค้นพบราเขียวบนตัวเต็มวัยของด้วงแรด บริเวณสถานีกสิกรรม บางเขน กรุงเทพฯ และ โสธร ประเสริฐผล ศึกษาพบการสร้างสปอร์ รูปร่างรี สีเขียวคล้ำ ปี พ.ศ. 2501 จิตธนา โกเมศ แยกเชื้อราเขียวจากด้วงแรดมะพร้าวเป็นชนิดสปอร์สั้น และมีการศึกษาวิธีการทำให้เกิดโรคกับหนอนด้วงแรด พ.ศ. 2521 มีรายงานการพบเชื้อราเขียวบนด้วงแรดที่ อำเภอสวี จังหวัดชุมพร และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งสร้างโคนิเดียยาว (มลิวัลย์ ปันยารชุน, 2525)

ในปี 1960 Roffey ได้บรรยายถึงการระบาดของราแมลง *Entomophaga grylli* ในประเทศไทย และ Trond Schumacher ได้เก็บรวบรวมราแมลงในกลุ่ม Ascomycetes 34 ชนิด มี 25 ชนิดเป็นชนิดใหม่ที่พบในประเทศไทย ต่อจากนั้น Hywel-Jones ได้เข้ามาศึกษาราแมลงในประเทศไทยเป็นเวลา 14 ปี พื้นที่ที่ทำการสำรวจ ได้แก่ ดอยอินทนนท์ และ ดอยสุเทพ จังหวัดเชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา อุทยานแห่งชาติเขาสก จังหวัดสุราษฎร์ธานี อุทยานแห่งชาติเขาหลวง จังหวัดนครศรีธรรมราช เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าฮาลา-บาลา และป่าพรุสิรินธร จังหวัดนราธิวาส สามารถเก็บรวบรวมราแมลงชนิดต่างๆ ได้ 321 ชนิด ซึ่งมีความหลากหลายมาก เป็นผลมาจากประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น มีอุณหภูมิ อากาศ และความชื้น เหมาะสมต่อการเจริญของรา (Hywel-Jones, 2002)

ราใน Order Hypocreales

Hypocrella scutata (Cooke) Sacc. เป็นราแมลงที่จัดอยู่ใน Order Hypocreales Phylum Ascomycota ราใน Order นี้มีขนาดค่อนข้างเล็ก และมีความสำคัญในทางการเกษตรมาก ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็น anamorphs หรือมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศพบเห็นได้บ่อยในระบบนิเวศน์ทางการเกษตร เป็นราก่อโรคในพืชเศรษฐกิจ เช่น *Fusarium oxysporum* และ *Gibberella* เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวเฉาของพืช *F. solani* (teteomorph: *Nectria haematococca*) ทำให้เกิดโรคเหี่ยวแห้งตายของต้นอ่อน โคน และรากเน่า (Rossman, 1996) เชื้อเหล่านี้แยกได้จากดิน เป็นพวก saprophyte เชื้อ *Calonectria* และ *Cylindrocladium* ก่อให้เกิดโรค Cylindrocladium black rot ในถั่วลิสง (Porter *et al.,* 1984 อ้างโดย Rossman, 1996) นอกจากเป็นสาเหตุของโรคพืชแล้ว ยังก่อให้เกิดโรคในพวกเห็ดที่เพาะปลูกด้วย นอกจากนี้ราใน Order นี้ยังมีความสำคัญ คือ เป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาด้วย เช่น cephalosporins ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม beta-lactam มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูง สร้างจากเชื้อ *Acremonium chrysogenum* สาร cyclosporin A ซึ่งเป็นยากดระบบภูมิคุ้มกัน (immune-suppressant drug) ผลิตจากเชื้อ *Tolypocladium niveum* ยานี้ช่วยในการปลูกถ่ายอวัยวะ และเพิ่มอัตราการรอดของผู้ป่วย (Rossman, 1996)

ราในกลุ่ม *Hypocreales* ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่อง โดยมีการศึกษาหาแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพใหม่ๆ เชื้อบางชนิดเป็นแหล่งของสารที่เป็นพิษ ซึ่งอาจพบปนเปื้อนอยู่ในอาหาร เช่นสาร trichothecenes จากเชื้อ *Fusarium* หรือ *Gibberella* สารพิษชนิดนี้พบปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์ เป็นสาเหตุให้สัตว์เจ็บป่วยและตายได้ (Lacey, 1985 อ้างโดย Rossman, 1996) ลักษณะเด่นที่สำคัญของราใน Order Hypocreales อีกอย่างคือ เป็นราที่เป็นปรสิต หรือก่อโรคในแมลง ซึ่งมีประโยชน์ในการ

นำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยชีววิธี ตัวอย่างราที่นำมาใช้อยู่ในสกุล *Hypocrea* (anamorph: *Trichoderma*) และ *Bionectria* (anamorph: *Clonostachys*) (Rossman, 1996)

ราใน genus *Hypocrella* เป็นราก่อโรคในแมลง ลักษณะทั่วไปของ stromata เป็นแบบ discoid หรือเป็นปุ่มคล้ายกระดุมมีขนาด 4 มิลลิเมตร (0.5-3 มิลลิเมตร) สูง 1.25 มิลลิเมตร อาจสูงถึง 2 มิลลิเมตร ผิวหน้าเกือบเรียบ ขอบเรียบมน บางครั้งพบลักษณะคล้ายสะดือตรงกลาง มี fibrillose hypothallus บางเป็นลักษณะไม่แน่นอน อาจพบเป็นผงๆอยู่ภายใน มีสีเหลืองแดง หรือเป็นสีเหลือง สีส้มซีดๆ อาจเป็นสีส้มเข้มหรือส้มแดง สร้าง perithecia เป็นรูปขวดชมพู่ (flask shaped) มีขนาด 0.35 มิลลิเมตร ลึกประมาณ 0.15 มิลลิเมตร asci ขนาด 140-180×8 ไมโครเมตร มี 4-8 สปอร์ ปกติทั่วไปมี 8 สปอร์ สปอร์มี ขนาด 8-12×2 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก ปลายมน หรือปลายทู่หรือเรียวด้านหนึ่ง หรืออาจเป็นรูปกลมแบนๆ *Hypocrella* เป็นช่วงการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในสกุล *Aschersonia* เท่านั้น (Petch, 1921)

H. scutata เป็นราแมลงสกุล *Hypocrella* สายพันธุ์หนึ่ง ที่มีลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร โค้งนูนตรงกลาง สูง 2 มิลลิเมตร ตรงกลางหนา ขอบบาง ผิวหน้าเรียบ พบเป็นสีน้ำตาลซีดหรือเป็นสีแดงน้ำตาลไม่สม่ำเสมอ หรือเป็นสีดำน้ำตาลซึ่งอาจพบบนพวกสมุนไพร อาจเป็นสีส้มสว่างในตัวอย่างที่สด ซึ่งมีสารพวกเรซิน (resin) เป็นองค์ประกอบ hypothallus มีลักษณะคล้ายแก้วแตก membrane จะทึบแสง ผิวหน้าแบน สีเหลืองน้ำตาลทึบ ตรงกลางเด่นขึ้นเป็นสีค่อนข้างเหลือง มีจุดทึบแสง สร้าง perithecia ค่อนข้างลึกลงไป มีลักษณะเป็นขวดชมพู่ มี 8 สปอร์ เป็นรูปทรงกระบอก ปลายมน ขนาด 3-6×1.5 ไมโครเมตร (Petch, 1921)

ปัจจัยที่ผลต่อการเจริญของราแมลง

ในธรรมชาติปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการก่อโรคของราแมลงขึ้นกับสภาวะของฤดูกาล ประกอบด้วย อุณหภูมิอากาศ ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และแสงแดด ซึ่งส่งผลทั้งตัวแมลงและราแมลง ในสภาวะที่อากาศอบอุ่น มีความชื้นสัมพัทธ์สูง

จะเหมาะสมต่อการงอกของสปอร์ของราแมลง ความหนาแน่นของประชากรแมลงก็มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายสปอร์ของราแมลง (Wolfe, 1981 อ้างโดย Moore-Landecker, 1996) แหล่งสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญของราแมลงในธรรมชาติมีอยู่ในตัวแมลง ซึ่งประกอบไปด้วย โปรตีน ไขมัน และไคติน (Samuels and Paterson, 1995, Moore-Landecker, 1996, Hywel-Jones, 2002)

ในระยะแรกของการศึกษาราแมลงในเขตร้อนชื้นโดย Petch และ Moureau ไม่มีรายงานการแยกและเลี้ยงเชื้อราแมลงในห้องปฏิบัติการ ต่อมา Kobayashi ชาวญี่ปุ่นได้พยายามแยกเชื้อ *Cordyceps* จากตัวอย่างที่ได้เก็บรวบรวมไว้ แต่ไม่ประสบความสำเร็จ ในที่สุด Harry Evans เป็นผู้ที่สามารถแยกเชื้อราแมลง *Gibellula* spp. ได้เป็นครั้งแรก (Hywel-Jones, 2002) หลังจากนั้นมีผู้แยกเชื้อราแมลงบนอาหารชนิดต่างๆ ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก *Hypocrella, Aschersonia* และ *Cordyceps* ดังตารางที่ 3

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Aschersonia placenta* และ *Hypocrella raciborskii* โดย Ibrahim และคณะ (1993) ซึ่งได้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของอุณหภูมิ pH และอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการงอก การเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา พบว่า Tween 70 ความเข้มข้น 0.1 % จะช่วยเร่งการงอกของเชื้อ *A. placenta* สภาวะที่เหมาะสมในการงอกและการเจริญของเชื้อนี้อยู่ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และ pH ช่วง 5.0-6.0 เชื้อจะสามารถเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (semisolid media)ได้ดีกว่าในอาหารเหลว (liquid media) และอาหารที่ให้ผลการเจริญสูงที่สุด คืออาหารที่ผสมฟักทอง รองลงมา คือมะละกอและมันเทศ ฟักทองนอกจากให้ผลการเจริญสูงสุดแล้วยังพบการสร้างสปอร์จำนวนมากที่สุดด้วย รองลงมาคือ มันสำปะหลัง

ตารางที่ 3 อาหารต่างๆที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อราแมลงในห้องปฏิบัติการ

Tabla 3 Media used for cultivation of insect fungi in laboratory.

Fungus	Media	Purpose of study	Reference
Aschersonia placenta	pumpkin, papaya, sweet potato, radish, tapioca	growth and sporulation	Ibrahim *et al.,* 1993
Hypocrella raciborskii	pumpkin, papaya, sweet potato, radish, tapioca	growth and sporulation	Ibrahim *et al.,* 1993
Hypocrella discoidea	potato carrot agar	growth	Hywel-Jones and Evans, 1993
Aschersonia sp.	Sabouraud' s dextrose broth	mycelial growth	Krasnoff *et al.,* 1996
	Czapek-dox broth plus bactopeptone 0.5 %	production of destruxins	
Aschersonia tubulata BCC1785	potato dextrose broth	mycelial growth	Boonphong *et al.,* 2001
Cordyceps nipponica BCC1389	potato dextrose agar	mycelial growth	Isaka *et al.,* 2001
	minimum salt medium	production of antimalarial	

Hywel-Jones และ Evans (1993) พบว่า ถึงแม้เชื้อรา *Hypocrella* spp. จะจัดอยู่ในกลุ่ม entomopathogenic fungi และเป็น obligate pathogens ในพวก homopteran hosts ในการเลี้ยงราพวกนี้ไม่จำเป็นต้องใช้อาหารพิเศษในการเพาะเลี้ยง โดย ascospores หรือโคนิเดีย ของ *H. discoidea* จะงอกภายในเวลา 48-72 ชั่วโมง บนอาหารเลี้ยงเชื้อราทั่วๆไป โดยโคโลนีที่เจริญบนอาหาร potato carrot agar เจริญช้ามาก มีขนาดโคโลนี 0.6 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลา 2 เดือน และอาจโตขึ้นถึง 1.0 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ โคโลนีเริ่มต้นมีสีส้มน้ำตาล และซีดลงจนออกสีขาวและมีเส้นใยราเจริญงอกออกมา

Hywel-Jones (2002) ได้ทำการแยกเชื้อราแมลงที่เก็บรวบรวมตัวอย่างในประเทศไทยกว่า 1500 isolates โดยใช้อาหาร potato dextrose agar (PDA) ราแมลงที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Cordyceps* subgroup สปอร์ของราแมลงจะสามารถงอกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อในระยะเวลา 12-48 ชั่วโมง หรืออาจจะนานกว่านั้นในบางชนิด เช่น ascospores ของ *Cordyceps variabilis* จะงอกหลังจากเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 เดือน (Hodge *et al.,* 1998) อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของราแมลง อาหารที่ใช้เลี้ยงราแมลง ได้แก่ PDA, malt extract agar (MEA) และ Sabouraud's dextrose agar (SDA) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ช่วยส่งเสริมการเจริญ เช่น ความชื้น ซึ่งมีความจำเป็นต่อการงอกของสปอร์และการเจริญ อุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญของราแมลงส่วนใหญ่ประมาณ 2-3 สัปดาห์ (Hywel-Jones, 2002)

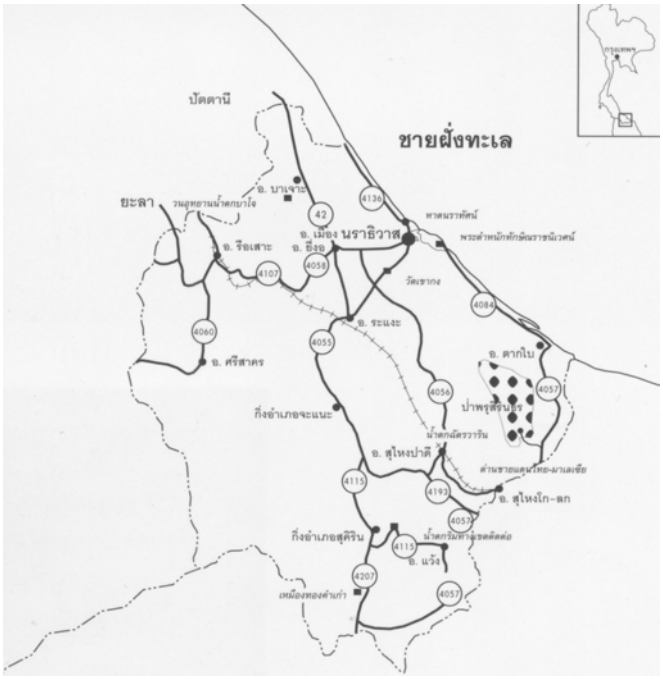
จากรายงานการศึกษาราแมลง *Aschersonia* sp. เพื่อการผลิตสาร destruxins โดยเลี้ยงเชื้อราแมลงให้เจริญในอาหาร SDA ที่เติมยีสต์ (yeast) 1.0 % เลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว Sabouraud' s dextrose broth (SDB) เลี้ยงต่อเป็นเวลา 16 วัน ได้เป็นหัวเชื้อ เพื่อถ่ายใส่ในอาหาร Czapek-dox broth (CDB) ที่เติม bactopeptone 0.5 % เลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องเขย่า

(rotary shaker) (Krasnoff *et al.,* 1996) Boonphong และคณะ (2001) เลี้ยงราแมลง *A. tubulata* สายพันธุ์ BCC1785 ในอาหาร PDB ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาสารที่สกัดจากเซลล์ ส่วนราแมลง *Cordyceps nipponica* สายพันธุ์ BCC1389 สามารถเจริญได้ในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเลี้ยงไว้เป็นเวลา 8 วัน แต่ในการเลี้ยงเพื่อจะทดสอบสารที่เชื้อราผลิตนั้นจะใช้อาหาร minimum salt medium ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 29 วัน (Isaka *et al.,* 2001)

ป่าพรุสิรินธร

ป่าพรุเป็นป่าไม่ผลัดใบ เกิดอยู่ในบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำขัง ป่าพรุสิรินธรตั้งอยู่ที่อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส เดิมมีชื่อว่า ป่าพรุโต๊ะแดง ตามชื่อคลองโต๊ะแดงที่ไหลผ่านพรุแห่งนี้ ป่าพรุสิรินธรนับเป็นป่าพรุที่สมบรูณ์และกว้างใหญ่ที่สุดในจำนวนป่าพรุที่เหลืออยู่ในประเทศไทย มีพื้นที่ในเขตอนุรักษ์ประมาณ 125,000 ไร่ ครอบคลุมพื้นที่บางส่วนของ อำเภอตากใบ อำเภอสุไหงปาดี และ อำเภอสุไหงโกลก จังหวัดนราธิวาส (ภาพที่ 1 A) ป่ายังคงมีความอุดมสมบูรณ์แบบดั้งเดิมหลงเหลืออยู่ประมาณ 57,000 ไร่ มีสภาพเป็นป่าดิบชื้นในที่ลุ่มน้ำขัง ภูมิอากาศเป็นแบบคาบสมุทร มีปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งปีประมาณ 2,560 มิลลิเมตร อุณหภูมิเฉลี่ย 27.6 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยประมาณ 80% มีระยะเวลาที่ฝนทิ้งช่วงเพียง 3 เดือน คือตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ถึง เมษายน

ความหลากหลายทางชีวภาพและความมหัศจรรย์ของระบบนิเวศภายในป่าพรุผืนนี้เป็นแรงจูงใจให้นักวิทยาศาสตร์แขนงต่างๆเข้ามาศึกษาค้นคว้าและดำเนินงานวิจัยอย่างต่อเนื่อง Srivichai และ Hywel-Jones (1999) นักราวิทยาแห่งศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติได้สำรวจพบเชื้อราแมลง *Hypocrella scutata* บนใบหว้าหินและหว้าน้ำ จากแปลงปลูกหน้าศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธรแห่งนี้ (ภาพที่ 2)



(A)

(B)

ภาพที่ 1 แผนที่แสดงอาณาเขตป่าพรุสิรินธร (A) และศูนย์วิจัยและศึกษาธรรมชาติป่าพรุสิรินธร (B)

Figure 1 A map showing Sirindhorn Peatswamp Forest territory (A) and Sirindhorn Peatswamp Forest Research and Nature Study Center (B)

ที่มา: การท่องเที่ยวแห่งประเทศไทย (2541)

ภาพที่ 2 แปลงปลูกหว้าหิน (*S. tumida)* ที่ทำการเก็บตัวอย่าง ราแมลง *H. scutata*

Figure 2 *H. scutata* collecting site at *S. tumida* plantation

วัตถุประสงค์

2. ศึกษาผลของอาหารและอุณหภูมิต่อการเจริญของราแมลง *H. scutata*
3. ศึกษาผลของอาหารและระยะเวลาในการเลี้ยงต่อการสร้างสารต้านจุลินทรีย์ของราแมลง *H. scutata*
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากราแมลง *H. scutata*
5. ศึกษาความเป็นพิษเบื้องต้นของสารสกัดหยาบจากราแมลง *H. scutata* โดยวิธี brine shrimp cytotoxicity test