การสำรวจและคัดเลือกเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหอยศัตรูพืช

Survey and Isolation of Fungi Genus *Aspergillus* with Molluscicidal Activity

อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข[1] ณัฐฐิญา กาญจนนิธิพัฒน์[1] ดาราพร รินทะรักษ์[1]
ปราสาททอง พรหมเกิด[1] ธิติยา สารพัฒน์[2] มโนรัตน์ สุดสงวน[2]
[1/]กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Abstract

Soils and snails were sampled from various regions in Thailand from October 2015 to September 2017. Totally 18 soil samples were collected. 17 isolates of *Aspergillus* were isolated: 2 isolates from Chiang Mai, 3 isolates from Chiang Rai, 5 isolates from Nakhon Ratchasima, 2 isolates from Khon Khaen, 1 isolate from Loei, 1 isolate from Chaiyaphum, 1 isolate from from Chumporn, and 2 isolates from Surat Thani. The inoculates were further enriched and tested for molluscicidal activity. It is indicated that lysate samples from two *Aspergillus* isolates (LO03 I1 and RC1-33-UN02) resulted in more than 90% snail mortalities. These cultures shall be preserved subsequently.

Key words: *Aspergillus*, pest snail, control, efficacy, screening, survey, molluscicidal activity

รหัสการทดลอง 03-05-59-01-01-00-07-59

บทคัดย่อ

ดำเนินการเก็บตัวอย่างดินและหอยในพื้นที่ภาคต่างๆ ของประเทศไทย ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2560 ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อราสกุล *Aspergillus* ได้จากตัวอย่างดินทั้งหมดรวม 17 ไอโซเลต ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ 2 ไอโซเลต เชียงราย 3 ไอโซเลต นครราชสีมา 5 ไอโซเลต ขอนแก่น 2 ไอโซเลต เลย 1 ไอโซเลต ชัยภูมิ 1 ไอโซเลต ชุมพร 1 ไอโซเลต สุราษฎร์ธานี 2 ไอโซเลต และนำมาเพิ่มปริมาณต่อในอาหารเหลวและทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหอยศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการ พบเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหอย (% mortality มากกว่า 90%) จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ LO03 I1 และ RC1-33-UN02 และจะทำการเก็บรักษาต่อไป

คำหลัก : เชื้อรา *Aspergillus* กำจัด หอยศัตรูพืช ประสิทธิภาพ คัดเลือก สำรวจ

คำนำ

การจัดการหอยศัตรูพืชโดยชีววิธี หมายถึง การใช้ศัตรูธรรมชาติ และวิธีทางไบโอเทคนิค ในการควบคุมหอยศัตรูพืช ศัตรูธรรมชาติที่สำคัญของหอยทากบก ได้แก่ ได้แก่ ผู้ล่า เชื้อก่อโรคและปรสิต ผู้ล่าที่สำคัญได้แก่ นก สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลงในอันดับ Diptera หอยนักล่า ตะขาบ กิ้งกือ โรคที่พบในหอยเกิดจากโปรโตซัว ราและแบคทีเรีย สำหรับปรสิตที่สำคัญได้แก่หนอนตัวกลม หนอนตัวแบน lung worm ด้วงดิน สปอโรซัว และตัวอ่อนของหิ่งห้อย (Sallam and El-Wakeil, 2012; Wilson, 2012; Barker, 2004)

เชื้อก่อโรคในหอย มีรายงานเกี่ยวกับเชื้อราเข้าทำลายไข่ของหอย เช่น *Pachonia chlamydosporium* เข้าทำลายไข่ของ *Deroceras reticulatum* และ *Arthrobotrys* sp. เข้าทำลายไข่ของ *Arion circumscriptus* กลุ่ม Microsporidia ที่มีรายงานได้แก่ *Steinhausia* sp. สามารถก่อให้เกิดโรคในหอย *Partula turgida* และ *Microsporidium novacastriensis* สามารถก่อให้เกิดโรคในหอย *D. reticulatum* กลุ่มแบคทีเรียที่มีรายงานว่าก่อโรคในหอยได้แก่ *Aeromonas hydrophila* ทำให้เกิดโรค leucodermia ในหอยและทาก เชื้อ *Bacillus pinottii* และ *Vibrio parahaemolyticus* สามารถก่อให้เกิดโรคในหอยน้ำ *Biomphalaria glabrata* เชื้อในสกุล *Escherichia Alcaligenes* และ *Bacillus* สามารถก่อให้เกิดโรคในหอย *Helix fram* สำหรับโปรโตซัวที่ก่อให้เกิดโรคในหอย *D. reticulatum* ได้แก่ *Tetrahymena rostrata* และ *T. limacis* หนอนตัวกลมที่มีประสิทธิภาพในการเป็นปรสิตและก่อให้เกิดโรคในหอยได้แก่ *Phasmarhabditis hermaphrodita* นอกจากนี้การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ร่วมกับหนอนตัวกลม *Rhabditis* sp. สามารถใช้ควบคุมหอย *Eobania vermiculata* ในประเทศอียิปต์ (Sallam and El-Wakeil, 2012; Wilson, 2012) ในประเทศไทย Chobchuenchom and Bhumiratana

(2003) ได้ทำการแยกเชื้อก่อโรคของหอยเชอรี่ *Pomacea canaliculata* พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* และ *P. aeruginosa* ทำให้หอยเชอรี่ตายอย่างน้อย 80% ภายในเวลา 72 ชั่วโมง

นอกจากนี้ราและแบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างสารประกอบที่มีฤทธิ์ฆ่าหอยได้ มีรายงานการเกี่ยวกับการค้นหาและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดหอยดังนี้ Stoessl *et al.* (1989) ได้สกัดสารกลุ่ม diterpenoid จาก *Cercospora traversiana* ซึ่งมีพิษต่อหอยและปลา ต่อมา Keller *et al.* (2002) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อราจากประเทศในทวีปยุโรป 57 ตัวอย่าง นำมาทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย (bactericidal) รา (fungicidal) ตัวอ่อน (larvicidal) หอย (molluscicidal) และ antioxidant พบว่า linoleic acid ที่ได้จากเชื้อรามีฤทธิ์ในการกำจัดหอยได้ หลังจากนี้ Gao *et al.* (2008) พบว่า *Bacillus thuringiensis* บางสายพันธุ์จากประเทศจีนมีความเป็นพิษต่อหอย *Oncomelania hupensis* หลังจากนั้น Chen *et al.* (2009) นำราเอนโดไฟต์สายพันธุ์ JJ18 จากพืช *Pseudolarix kaempferi* มาสกัดสารและทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าหอย ปรากฏว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัด *O. hupensis* ถัดมา Guo *et al.* (2010) และ Guo *et al.* (2011) ได้แยกเชื้อราจากบริเวณไรโซสเฟียร์ของพืช *Phytolacca acinosa* พบเชื้อราสายพันธุ์ SL-30 ซึ่งสารสกัดของมันมีประสิทธิภาพในการกำจัด *O. hupensis* และได้ทำการหาสารออกฤทธิ์ปรากฏว่าเป็นสารกลุ่ม Gliotoxin ล่าสุด Molloy *et al.* (2013) ได้แยกเชื้อ *P. fluorescens* CL145A ซึ่งมีประสิทธิภาพในการควบคุมหอย *Dreissena polymorpha* และ *Dreissena rostriformis bugensis*

การป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืชโดยการใช้สารเคมียังคงมีข้อจำกัด เนื่องจากสารเคมีอาจมีการตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย เช่น หอย ปลา แมลง และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในระบบนิเวศเกษตร สารเคมีบางชนิดมีผลกระทบต่อพืชปลูก ทำให้พืชปลูกหยุดการเจริญเติบโตและตายลง อีกทั้งไม่สามารถประยุกต์ใช้กับระบบเกษตรอินทรีย์ซึ่งไม่ใช้สารเคมีเลย ทำให้ต้องหาทางเลือกใหม่สำหรับการป้องกันกำจัดหอยทากบกศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมี หนึ่งในทางเลือกที่สามารถทำได้คือ การจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธี

การจัดการศัตรูพืชโดยชีววิธี จะใช้สิ่งมีชีวิตหรือผลผลิตจากสิ่งมีชีวิตไปกำจัดสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง ทั้งนี้เชื้อรามีความน่าสนใจที่จะนำมาใช้ เนื่องจากเชื้อรามีความหลากหลายทางชีวภาพสูง หลายชนิดสามารถสร้างสารเมตาโบไลต์ทุติยภูมิหลายชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลาย เช่น ต้านเชื้อแบคทีเรีย (anti-bacteria) ต้านเซลล์มะเร็ง (anti-cancer) ฆ่าแมลง(insecticide) และฆ่าหอย (molluscicide) ดังนั้นการศึกษานี้จะทำการค้นหาและคัดเลือกชนิดของเชื้อราสกุล *Aspergillus* ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดหอยทากบกศัตรูพืช ผลจากการศึกษานี้จะทำให้ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพนำไปพัฒนาต่อ สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการอ้างอิงเชิงวิชาการ และมีความจำเป็นต่อการนำไปใช้จัดการหอยทากบกศัตรูพืชโดยไม่ใช้สารเคมีหรือระบบเกษตรอินทรีย์ต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล่องพลาสติกขนาดต่างๆ กระดาษอเนกประสงค์
- เวอร์เนีย (เครื่องมือวัดขนาดเปลือกหอย)
- กล้องถ่ายรูปดิจิตอล
- เครื่อง PCR
- อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี
- ยาฆ่าหอย
- เครื่อง autoclave
- เครื่องอบความร้อน
- เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ

วิธีการ

1) เก็บตัวอย่างดินและหอย

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากระบบนิเวศและสิ่งแวดล้อมที่หอยอาศัยอยู่ บันทึกลักษณะของระบบนิเวศและชนิดหอยที่พบบริเวณนั้น เก็บตัวอย่างหอยดักดาน *Cryptozona* spp. หอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeas walkeri* และหอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis* เป็นหอยศัตรูพืชที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา

2) การคัดแยกเชื้อราและทดสอบประสิทธิภาพ

2.1) การคัดแยกเชื้อรา

ในการศึกษานี้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ Rose Bengal Agar ซึ่งถือเป็นอาหารคัดเลือก (selective medium) จุลินทรีย์กลุ่มรา (mold) ยีสต์และ actinomycetes (Martin, 1950; Guo et al., 2010) และ Nutrient agar ซึ่งถือเป็นอาหารเพิ่มจำนวน (enrich medium)

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal agar

Peptone	5	กรัม
Dextrose	10	กรัม
Monopotassium Phosphate	1	กรัม
Magnesium Sulfate	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม

นำสารมาชั่งและลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็นลงประมาณ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส เติมสารละลาย chloramphenicol (0.1 กรัม chloramphenicol ใน 4 มิลลิลิตร ethanol) ลงไป 4 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเหลว Rose Bengal broth ใส่สารตามสูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้านบน ยกเว้น agar และทำการเติมสารละลาย chloramphenicol เช่นเดียวกัน

สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar

Peptone	5	กรัม
beef extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	15	กรัม

นำสารมาชั่งและลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น ปรับ pH ให้เป็น 7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ 0.1 M NaOH

วิธีการคัดแยกเชื้อราดัดแปลงจาก Guo *et al.* (2010) โดยนำตัวอย่างดินที่เก็บได้มา 10 กรัมใส่ลงไปในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 มิลลิลิตร (หลอดนี้ถือว่ามีความเข้มข้น 10^{-1}) เจือจางทีละ 10 เท่า โดยนำสารจากหลอดความเข้มข้น 10^{-1} ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดดลองที่บรรจุน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ทำเช่นนี้จนได้ความเข้มข้น 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} จากนั้นนำสารไปเคลือบบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งในจานเพาะเชื้อดังนี้

- นำสารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} ไปเคลือบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar
- นำสารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรจากหลอดที่มีความเข้มข้น 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} ไปเคลือบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA)

หลังจากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-7 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเส้นใยของเชื้อราที่เจริญขึ้นมาถ่ายไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจานใหม่ จนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อราที่บริสุทธิ์ และนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบตาประกอบ สังเกตขนาด พื้นผิวของโคโลนี และลักษณะอื่นๆ

นำเชื้อราที่คัดแยกมาได้มาบ่มต่อใน Rose Bengal broth จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ออก นำส่วนน้ำใสมาปรับ pH ให้เป็นกลางด้วย 0.1 M NaOH หรือ 0.1 M HCl หลังจากนั้นนำไปเจือจางความเข้มข้น 100% 50% และ 25% และนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2.2) ทดสอบประสิทธิภาพ

นำหอยที่ได้จากในข้อ 13.1 ใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 13 x 13 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตร ภายในบรรจุดินหนา 5 เซนติเมตร กล่องละ 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 พ่นสารละลายจากเชื้อรา เข้มข้น 100%

กรรมวิธีที่ 2 พ่นสารละลายจากเชื้อรา เข้มข้น 50%

กรรมวิธีที่ 3 พ่นสารละลายจากเชื้อรา เข้มข้น 25%

กรรมวิธีที่ 4 พ่นสารละลาย 80% WP metaldehyde เข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร

กรรมวิธีที่ 5 พ่นน้ำเปล่า (กรรมวิธีควบคุม)

สังเกตและนับจำนวนหอยที่ตายหลังเวลาผ่านไป 24 48 72 และ 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบจำนวนหอยที่ตายด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม IRRISTAT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ 99%

นำเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูง (สารละลายทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมง) มาถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจานใหม่ รอจนเชื้อเจริญเต็มที่ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ทำการเตรียมเชื้อราเพื่อการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวตามวิธีการของ ATCC โดยนำหลอดพลาสติกขนาดเล็กบรรจุสารละลาย glycerol 10% นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และหลอดพลาสติกขนาดเล็กบรรจุสารละลาย skim milk 20% นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร กรณีของราที่สร้างสปอร์ ให้นำสปอร์มาเก็บรักษาในหลอดที่บรรจุ skim milk และราที่ไม่สร้างสปอร์ ให้นำสปอร์มาเก็บรักษาในหลอดที่บรรจุ glycerol และนำเก็บในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอการผลิตขยายต่อไป

<u>การบันทึกข้อมูล</u>

บันทึกลักษณะของโคโลนีเชื้อราที่แยกได้ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ สูตรอาหาร ความเข้มข้น อุณหภูมิ ประสิทธิภาพของเชื้อราในการทำให้หอยตายเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม

เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองตั้งแต่เดือนตุลาคม 2558 – กันยายน 2560 โดยเก็บตัวอย่างดินและหอยตามธรรมชาติและแปลงปลูกทั่วประเทศไทย นำมาแยกเชื้อและทดสอบ ณ กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา และกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

วางแผนการเก็บตัวอย่าง และได้อุปกรณ์สำหรับจัดเก็บตัวอย่าง จัดซื้อจัดหาอาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และเครื่องแก้วสำหรับใช้แยกเชื้อราได้

เก็บตัวอย่างดินและหอยในพื้นที่ภาคเหนือ ได้แก่จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา ได้ตัวอย่างดินทั้งหมด 5 ตัวอย่าง

ทำการแยกเชื้อราสกุล *Aspergillus* ได้จากตัวอย่างดินจังหวัดเชียงใหม่ 2 ไอโซเลต เชียงราย 3 ไอโซเลต นครราชสีมา 5 ไอโซเลต ขอนแก่น 2 ไอโซเลต เลย 1 ไอโซเลต ชัยภูมิ 1 ไอโซเลต ชุมพร 1 ไอโซเลต สุราษฎร์ธานี 2 ไอโซเลต และซึ่งจะดำเนินการเพิ่มปริมาณต่อในอาหารเหลวและทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหอยในห้องปฏิบัติการ และเก็บรักษาเชื้อราต่อไป

ลักษณะโคโลนีของเชื้อราชนิดนี้มีสีขาว เหลือง หรือน้ำตาล สปอร์มีสีเขียว ดำ หรือน้ำตาล เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อ Rose Bengal Agar ภายใน 3 ถึง 5 วัน โดยมากพบระยะสิบพันธุ์แบบ

ไม่อาศัยเพศโดยจะสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ที่เรียกว่า conidiophore ซึ่งจะสร้าง conidia ซึ่งมีรูปร่างคล้ายน้ำพุ

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการฆ่าหอยในห้องปฏิบัติการ (Fig. 2) พบเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการฆ่าหอยเจดีย์ใหญ่ *Prosopeas walkeri* และหอยเจดีย์เล็ก *Lamellaxis gracilis* (Fig. 2) (% mortality มากกว่าหรือเท่ากับ 90%) จำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ LO03 I1 และ RC1-33-UN02 (Fig. 3) เชื้อราที่มีประสิทธิภาพปานกลางในการฆ่าหอย (% mortality ตั้งแต่ 50% ถึง 89%) จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ CH1-72-AS05 CR1-61-AS01 UNK01-Air CH1-62 และ CR1-61-AS02 จะทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไอโซเลตอื่นๆ และทำการระบุชนิดด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการเก็บตัวอย่างดินจากภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคใต้ ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง ได้เชื้อราทั้งหมด 17 ไอโซเลต นำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดหอยศัตรูพืช ได้เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูง จำนวน 2 ไอโซเลต และเชื้อราที่มีประสิทธิภาพปานกลาง จำนวน 5 ไอโซเลต ควรทำการวิจัยเพิ่มเติมเรื่องการทดสอบในโรงเรือน และการทดสอบในแปลง การผลิตขยายเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าของแปลงกล้วยไม้ สวนลุงผู้ใหญ่ ตำบลโพรงมะเดื่อ นครปฐม และสวนทีเออออร์คิด อำเภอท่ามะกา จังหวัดกาญจนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างหอยศัตรูพืช

เอกสารอ้างอิง

ATCC. Preservation and recovery of filamentous fungi. Tech bulletin no. 2.

Barker, G. M., editor. 2004. Natural Enemies of Terrestrial Molluscs. CABI publishing.

Chen, J., Han, B-X., Guo, S-B., Wang, Y., He, J., Zhou, X-K., Yang, X., and Han, F-A. 2009. Molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* of endophyte JJ18 from *Pseudolarix kaempferi* Gord. Pharmacognosy Research 1(6): 421-427.

Chobchuenchom, W., and Bhumiratana, A. 2003. Isolation and Characterization of Pathogens Attacking *Pomacea canaliculata*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 903–906.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. and Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.

Gao, M., Li, R., Dai, S., Wu, Y., and Yi, D. 2008. Diversity of *Bacillus thuringiensis* Strains from Soil in China and Their Pesticidal Activities. Biological Control 44: 380–388.

Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3): 307-321.

Guo, D., Chen, J., Du, X., and Han. B. 2010. Screening Of Molluscicidal Strain Against *Oncomelania hupensis* From Rhizosphere Of Medicinal Plant *Phytolacca acinosa* Roxb. Pharmacognosy Magazine 6(23): 159-165.

Guo, D., Chen, J., Liu, Y., Yao, H., Han, F-A., and Pan, J. 2011. A high-performance molluscicidal ingredient against *Oncomelania hupensis* produced by a rhizospheric strain from *Phytolacca acinosa* Roxb. Pharmacognosy Magazine 7(28): 277–283.

Katoh, K. and Standley, D. M. 2013. MAFFT Multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution 30(4): 772-780.

Korabecna, M. 2007. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. In Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, A. Méndez-Vilas, Editor. Formatex.

Keller, C., Maillard, M., Keller J., and Hostettmann, K. 2002. Screening of European Fungi for Antibacterial, Antifungal, Larvicidal, Molluscicidal, Antioxidant and Free-Radical Scavenging Activities and Subsequent Isolation of Bioactive Compounds. Pharmaceutical Biology 40(7): 518-525.

Martin, J. P. 1950. Use of Acid, Rose Bengal, and Streptomycin in the Plate Method for Estimating Soil Fungi. Soil Science 69: 215-232.

Molloy, D. P., Mayer, D. A., Gaylo, M. J., Morse, J. T., Presti, K. T., Sawyko, P. M., Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., Laruelle, F., Nishikawa, K. C., and Griffin, B. H. 2013. *Pseudomonas fluorescens* strain CL145A – A Biopesticide for the Control of Zebra and Quagga Mussels (Bivalvia: Dreissenidae). Journal of Invertebrate Pathology 113: 104–114.

Ronquist, F. and Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19(12): 1572-1574.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4(4): 406-425.

Sallam, A., and El-Wakeil, N. 2012. Biologicaland Ecological Studies on Land Snails and Their Control, Integrated Pest Management and Pest Control - Current and Future Tactics. Soloneski, S. Editor. InTech.

Stoessl, A., Cole, R. J., Abramowski, Z., Lester, H. H., and Towers, G. H. N. 1989. Some Biological Properties of Traversianal, a Strongly Molluscicidal Diterpenoid Aldehyde from *Cercospora traversiana*. Mycopathologia 106: 41-46.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution 28: 2731-2739.

Wilson, M. J. 2012. Chapter XIII Pathogens and Parasites of Terrestrial Molluscs. In Manual of Techniques in Invertebrate Pathology. Elsevie

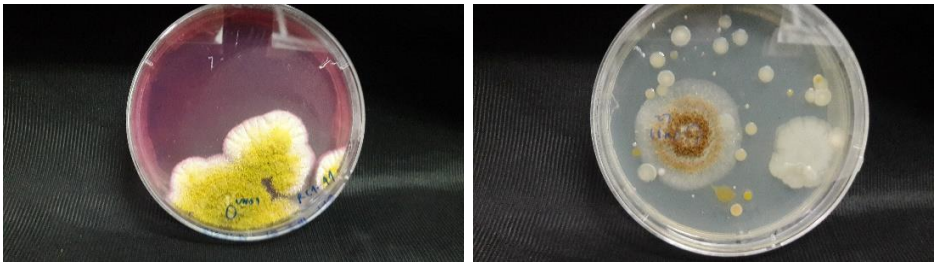

Figure. 1 Morphology of *Aspergillus* and other fungal colonies in this study.

Figure. 2 *Prosopeas walkeri* (left) and *Lamellaxis gracilis* (right) in molluscicidal screening of *Aspergillus* suspensions

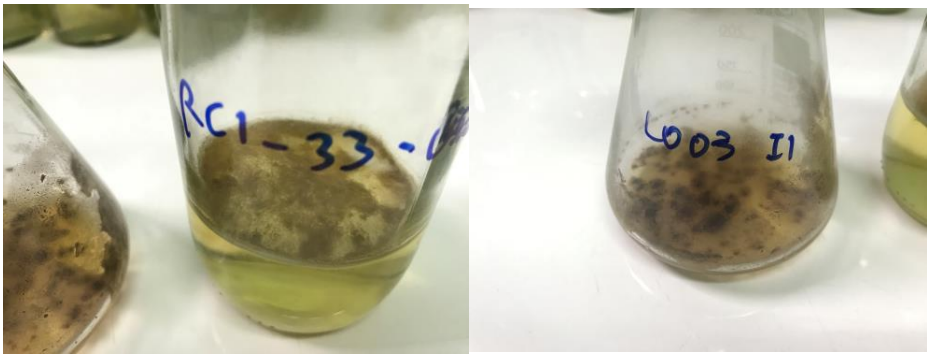

Figure. 3 The Aspergillus isolates with high molluscicidal activities (>90% snail mortality within 24 hours): RC1-33-UN02 (left) and LO03-I1 (right).