

13 JAN 2003



**STUDIES ON PATHOGENICITY OF LOCAL ISOLATE OF
NOMURAEA RILEYI AGAINST *SPODOPTERA LITURA***

PHORNPOJ SRISUKCHAYAKUL

~

With compliments
of

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล
.....

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (MICROBIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2002**

ISBN 974-04-2482-1

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH

P 5750

2002

C.2

Copyright by Mahidol University

4136990 SCMI/M : MAJOR : MICROBIOLOGY ; M.Sc.(MICROBIOLOGY)

KEY WORDS : *NOMURAEA RILEYI*/ *SPODOPTERA LITURA*/

GERMINATION / CUTICLE-DEGRADING ENZYMES

PHORNPOJ SRISUKCHAYAKUL : STUDIES ON PATHOGENICITY OF LOCAL ISOLATE OF *NOMURAEA RILEYI* AGAINST *SPODOPTERA LITURA*. THESIS ADVISORS : SOMSAK PANTUWATANA, Ph.D., AMARET BHUMIRATANA, Ph.D., CHANPEN WIWAT, Ph.D., 103 P. ISBN 974-04-2482-1

Studies on pathogenesis of the fungal isolate, *N. rileyi* against *Spodoptera litura* were carried out through the examination of thin sections of infected larvae under a light microscope. The conidia of fungal isolate germinated on the larval integument of *S. litura* ca. 20 to 24 h and penetrated the cuticle within 48 h. The invasion hyphae converted to hyphal bodies after reaching the haemocoel. The multiplication of hyphal bodies occurred throughout all tissues of insect larvae within 6 to 6.5 days after inoculation. Noninvasion hyphal bodies converted to invasion mycelia. The conidiophores emerged from insect cadavers, were observed at 7 days after inoculation, and subsequently whole cadavers were completely covered by green conidia. The complete development cycle of *N. rileyi* in *S. litura* larvae was accomplished in approximately 8 to 9 days. Attempts to determine effects of culture media on the virulence of *N. rileyi* were carried out. The 4th passage of serial transfer of conidia on SMAY medium, whose ability to produce yeast-like hyphal bodies was lost, exhibited the reduction in virulence against larvae of *S. litura*. In addition, the deficiency in sporulation of these conidia on insect cadavers was observed after the 8th passage onward as opposed to those conidia derived from FMAY medium that could sustain their virulence and spore production. It was found that the major fatty acid compositions of fish soluble extract, which were palmitic acid and oleic acids, could induce the germination of conidia and spore production of *N. rileyi*. The conidia derived from FMAY medium retained their capability of germination, so that the germination of conidia was more rapid than those derived from SMAY medium. Protein patterns expressed during the germination of conidia were compared with the virulent and attenuated strains, using SDS-PAGE. The virulent strains displayed the additional two distinct bands from those of attenuated strains. These unknown extra bands were found to have molecular weights of approximately 43 and 25.04 kDa, while the structure of proteins was still unknown. Studies on the relationship of cuticle-degrading enzymes to the virulence of *N. rileyi* suggested that the protease was probably the important factor in penetration of the larval integument, while the other cuticle-degrading enzymes, i.e., chitinases and lipases, were presumably essential for the development of *N. rileyi*.

4136990 SCMI/M : สาขาวิชา: จุลชีววิทยา; วท.ม. (จุลชีววิทยา)

พรพจน์ ศรีสุขชยะกุล : การศึกษาการก่อโรคของเชื้อรา *Nomuraea rileyi* ที่แยกได้ภายในประเทศต่อหนอนกระทู้ผัก (STUDIES ON PATHOGENICITY OF LOCAL ISOLATE OF *NOMURAEA RILEYI* AGAINST *SPODOPTERA LITURA*). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : สมศักดิ์ พันธุ์วัฒนา, Ph.D., อมเรศ ภูมิรัตน์, Ph.D., จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์, Ph.D. 103 หน้า. ISBN 974-04-2482-1

จากการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการก่อโรคของเชื้อรา *Nomuraea rileyi* ในหนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* นั้นพบว่าสปอร์ส่วนใหญ่ของเชื้อราจะใช้เวลาในการงอกประมาณ 20 ถึง 24 ชั่วโมง โดย germ tube จะแทงผ่านผนังลำตัวของหนอนภายในระยะเวลา 2 วันหลังจากที่ได้รับเชื้อ เส้นใยของเชื้อราจะแทงเข้าสู่ haemocoel จากนั้นเส้นใยของเชื้อราก็จะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบยีสต์ และต่อมาอีกประมาณ 3 วัน ยีสต์จะเปลี่ยนรูปร่างกลับไปเป็นเส้นใยอีกครั้งหนึ่ง เพื่อแทงทะลุออกจากผนังลำตัวของหนอน เส้นใยสีขาวจะเจริญแผ่กระจายปกคลุมตัวหนอนแล้วสร้างสปอร์สีเขียว ซึ่งกระบวนการเหล่านี้จะใช้เวลาทั้งสิ้นประมาณ 8-9 วันหลังจากที่ได้รับเชื้อ จากการศึกษาถึงองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อาจมีผลต่อความสามารถของเชื้อราในการฆ่าหนอนพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SMAY มีผลต่อการสร้างสปอร์ของเชื้อราโดยทำให้เชื้อราสร้างสปอร์ลดลง และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนี้ยังมีผลทำให้ความสามารถในการฆ่าหนอนของเชื้อราลดลงหลังจากที่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารชนิดนี้เป็นระยะเวลาานอีกด้วย ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร FMAY ให้ผลในทางตรงกันข้าม ซึ่งเป็นผลมาจาก ส่วนประกอบของกรดไขมันที่มีอยู่ในน้ำสกัดจากปลา ซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร FMAY โดยพบว่า ส่วนประกอบดังกล่าวมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการงอกและการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *N. rileyi* เป็นเหตุให้สปอร์ของเชื้อราที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร FMAY นั้นยังคงคุณสมบัติในการงอกจึงทำให้สามารถงอกได้เร็วกว่า สปอร์ของเชื้อราที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร SMAY นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการงอกของสปอร์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่า virulent strain มีการสร้างโปรตีนที่แตกต่างจาก attenuated strain ซึ่งจากการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่แตกต่างกันเหล่านั้นพบว่ามิขนาดเท่ากับ 43 และ 25.04 kDa ในขณะที่โครงสร้างของโปรตีนดังกล่าวยังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจน ส่วนผลการศึกษา บทบาทของ cuticle degrading enzymes ต่อความสามารถในการฆ่าหนอนพบว่าเอนไซม์ protease น่าจะมีส่วนช่วยในการแทงผ่านลำตัวของหนอน ในขณะที่เอนไซม์ chitinases และ lipases นั้นเชื่อว่าอาจจะมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราเท่านั้น