ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและการแยกยีนไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก

ผู้เขียน นายนราดร ฉุยฉาย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) กีฏวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ครุฑเมือง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจะอาศัยกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกในการผ่านผนังลำตัวแมลงและทำให้เกิดขบวนการเกิดโรคในแมลง เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยส่วนประกอบสำคัญในผนังลำตัวของแมลง เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง 2 ชนิดได้แก่ *Beauveria* spp. จำนวน 14 ไอโซเลท และ *Metarhizium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ถูกนำมาทดสอบหาระยะเวลา (LT_{50}) ที่ใช้ในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ที่ความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราสาเหตุโรคแมลงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 และ BCC4849 มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28 ถึง 34.98 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 และ BCC22353 มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 73.26 ถึง 144.74 ชั่วโมง และนำมาทดสอบหาความรุนแรง (LC_{50}) พบว่าในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงทั้งเชื้อรา *Beauveria* sp. และ *Metarhizium* sp. ได้แก่ไอโซเลท Bb.5335 และ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

BCC4849 มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.66×10^{6} และ 3.11×10^{5} โคนิเดีย/มิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม ถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบน colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 8 ใน 10 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยไอโซเลท BCC17599 มีขนาดของ clear zone ใหญ่ที่สุด ในขณะที่เชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC14841 และ Bb.2637 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเหลว พบว่าเชื้อราไอโซเลท Bb.5335 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดในวันที่ 11 เมื่อศึกษาต่อไปพบว่าเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันที่ 1 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสมีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นหลังกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด นอกจากนี้พบว่าทั้งเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงโดยเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* จึงนำเฉพาะเชื้อราสกุล *Metarhizium* มาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ด้วยเทคนิค Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 พบว่า 2 คู่ไพรเมอร์ คือ chit42-2 และ chit42-3 พบ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Metarhizium flavoviride* มีรูปแบบของ SSCP แตกต่างจากเชื้อรา *M. anisopliae* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงอาจจะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสเพียงอย่างเดียว อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เข้ามาร่วมด้วย นอกจากนี้ SNPs ที่พบมีศักยภาพสูงในการแยกระหว่างกลุ่มเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงกับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลงออกจากกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Screening and Isolation of Chitinase Gene from Entomopathogenic Fungi for Enhancing the Infection of Diamondback Moth Larvae

Author Mr. Naradorn Chui-Chai

Degree Master of Science (Agriculture) Entomology

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang	Advisor
Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Supamit Mekchay	Co-advisor
Lect. Dr. Patcharin Krutmuang	Co-advisor
Lect. Dr. Chartchai Kanongnuch	Co-advisor

ABSTRACT

Entomopathogenic fungi utilize the hydrolytic enzyme to breach through the cuticle of insects and to be caused of diseases. Chitinase and protease are the hydrolytic enzymes and play important roles in degradation of the major components of insect cuticle. Fourteen isolates of *Beauveria* spp. and eleven isolates of *Metarhizium* spp., entomopathogenic fungi were selected to screen for entomopathogenic efficiency to control the 2nd instar larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). The median lethal times (LT_{50}) were estimated at 10^8 conidia ml^{-1} concentration and revealed to be distinguishable into two groups. The top 5 effective fungi were BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 and BCC4849 showed the LT_{50} ranged from 26.28 to 34.98 h, while the 5 lowermost effective fungi were BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 and BCC22353 ranged from 73.26 to 144.74 h. Moreover, the virulence (LC_{50}) revealed that the highest efficacy of *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. were Bb.5335 and BCC4849 with the 96-h LC_{50} of 2.66×10^6 and 3.11×10^5 conidia ml^{-1} respectively. All isolates

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

were preliminary investigated for chitinase production on 15% (w/v) colloidal chitin agar. Eight of ten isolates were positive and the highest clear zone was detected in BCC17599 while 2 isolates, BCC14841 and Bb.2637, were negative. In addition chitinase production in liquid culture showed that Bb.5335 was the greatest chitinase activity at the 11-day cultivation. Further study revealed that all 8 positive isolates produced protease since 1 day of cultivation and chitinase activity tended to rise up after the highest protease activity. Moreover, chitinase and protease activities were associated with the insecticidal activities. However, *Metarhizium* isolates were higher insecticidal efficacy and hydrolytic enzyme activities than in *Beauveria* isolates. Especially, *Metarhizium* isolates were identified the polymorphisms of chitinase gene *chit42* (*chit1*) with Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique to compare among the top 3 effective isolates were BCC1399, BCC4810 and BCC4849 and the 3 lowermost effective isolates were BCC1707, BCC12636 and BCC22353. The result showed that the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were found by 2 primers as chit42-2 and chit42-3. Moreover, the SSCP banding pattern of *Metarhizium flavoviride* were different from *M. anisopliae*. The results indicated that the insecticidal effects of entomopathogenic fungi would not only directly involved with chitinase activity but also contribute with protease activity and other cuticle hydrolytic enzymes. Furthermore, SNPs represent high potential to separate between high and low efficacy of entomopathogenic fungi.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved