บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราบางไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แต่เจริญเติบโตเพียงเส้นใยเท่านั้นไม่สามารถที่จะสร้างโคนิเดียได้ ซึ่งอาจเกิดจากสภาพอากาศที่ไม่เหมาะสมกับเชื้อราบางไอโซเลททำให้เชื้อราต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะนั้น ๆ จึงเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ (Zimmermann *et al.*, 1994) Onofre *et al.* (2001) รายงานว่าการเปิดไฟตลอดเวลาช่วยให้การเจริญของเส้นใย และการงอกของโคนิเดียดีขึ้น เป็นการช่วยให้โคนิเดียของเชื้อรามีอัตราการรอด และมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Inglis *et al.*, 1995) จึงทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น แต่ในการทดลองครั้งนี้ให้แสงเพียง 10 ชั่วโมงต่อวันเท่านั้น ซึ่งใกล้เคียงกับการทดลองของ Welling *et al.* (1994) ที่รายงานว่าเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* เจริญเติบโตได้ดีที่มีแสง 8 ชั่วโมง สลับกับที่มืด 16 ชั่วโมง แต่อาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้อราบางไอโซเลทไม่สามารถสร้างโคนิเดียได้ โดยในการทดลองนี้เชื้อรา *Beauveria* spp. ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มี 41.7 เปอร์เซ็นต์ และเจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส มี 58.3 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มี 38.5 เปอร์เซ็นต์ และเจริญได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส มี 61.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Hallsworth and Magan (1999) ได้รายงานถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *M. anisopliae* ว่ามีช่วงอุณหภูมิของการเจริญที่กว้างมาก แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อรา *B. bassiana* มีช่วงอุณหภูมิของการเจริญที่แคบ และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่พบเพียง 41.7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น อีกปัจจัยหนึ่งที่ Kassa *et al.* (2008) กล่าวถึงคือส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อว่ามีผลต่อการผลิตโคนิเดียเมื่อเพาะเลี้ยงใน sabouraud dextrose broth (SDB) และในหางนม (whey) แสดงว่าส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโต แม้จะอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมก็ตาม แต่อาจจะผลิตโคนิเดียได้ในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ เช่นเดียวกับ Bidochka *et al.* (1990) รายงานว่าในอาหารที่ผสมด้วยกลูโคส กลีเซอรอล หรือ ทรีฮาโลส สามารถเพิ่มมวลสารของเส้นใยเชื้อรา และเกี่ยวข้องกับปริมาณของคาร์โบไฮเดรตที่เชื้อราเก็บไว้ในเส้นใย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่ใช้ potato dextrose agar (PDA) ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลเด็กซ์โตส และ malt agar (MA) ซึ่งมี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตเป็นหลัก พบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อราใน PDA ได้ 84 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ MA เลี้ยงเชื้อราได้เพียง 16 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นแสดงให้เห็นว่าปัจจัยด้านแสง อุณหภูมิ และส่วนประกอบในอาหาร มีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสาเหตุโรคแมลง

5.2.1 การเลี้ยง และเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

หนอนใยผักที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรในเขต ต.สันผีเสื้อ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ต.หนองหอยใหม่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ในช่วงหน้าหนาว ซึ่งเป็นแหล่งในการเพาะปลูกผักตระกูลกะหล่ำที่ไม่ใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงศัตรูพืชทำให้พบแตนเบียนเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะการเข้าทำลายของแตนเบียน *Cotesia plutellae* สอดคล้องกับการศึกษาของ Rowell *et al*. (2005) ที่สำรวจแตนเบียน *C. plutellae* ในแปลงปลูกผักตระกูลกะหล่ำแบบไม่ใช้สารเคมีในเขตภาคเหนือของประเทศไทยมีอัตราการเบียนหนอนใยผักสูงถึง 78 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงเดือนพฤศจิกายน

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงหนอนใยผักที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Clorox ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ช่วยลดอัตราการตายของหนอนใยผักลงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การเปลี่ยนใบคะน้าที่ใช้เป็นอาหารของหนอนใยผัก และกล่องเลี้ยงแมลงทุกวันช่วยลดการติดเชื้อไวรัสได้อีกด้วย Htwe *et al.* (2009) ได้แนะนำให้เลี้ยงหนอนใยผักด้วยอาหารเทียมในสภาพห้องปฏิบัติการเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ ทำให้เหมาะสมต่อการพัฒนาระยะต่าง ๆ ของหนอนใยผักที่จะนำไปใช้ประโยชน์

5.2.2 การทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนใยผัก

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. จำนวน 25 ไอโซเลทถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ในสภาพอุณหภูมิห้องด้วยความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อ *Beauveria* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 1.3-3.1 วัน และเชื้อรา *Metarhizium* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 1.1-6.0 วัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yoon *et al.* (1999) ที่เชื้อรา *B. bassiana* มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 1.3-3.6 วัน และเชื้อรา *M. anisopliae* มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 0.7-1.4 วัน (Silva *et al.*, 2003) เปรียบเทียบกับ Masuda (2000) ได้รายงานผลการทดสอบเชื้อรา *B. bassiana* กับหนอนใยผักว่าโคนิเดียของเชื้อราจะเริ่มแทงเข้าไปในตัวหนอนภายใน 7 ชั่วโมงแรก และสามารถที่จะทำให้หนอนตายได้ภายใน 15 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หนอนใยผักวัย 4 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ที่ 15 ชั่วโมง และตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ 11 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองครั้งนี้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หนอนใยผักวัย 2 ตาย 50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปอร์เซ็นต์ ที่ 26 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับการตายของหนอนใยผัก เช่น ระยะเวลาในการแทงผ่านผนังลำตัวแมลง ระยะการเจริญเติบโตของแมลง และอุณหภูมิ Loc and Chi (2007) ได้แสดงให้เห็นว่าหนอนใยผักอ่อนแอต่อเชื้อรา *Metarhizium* spp. มากกว่าเชื้อรา *Beauveria* spp. ซึ่งในการทดลองนี้เชื้อราสกุล *Metarhizium* ไอโซเลท BCC4849 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักมากที่สุด แตกต่างจากงานทดลองของ Godonou *et al.* (2009) รายงานว่าเชื้อรา *B. bassiana* มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงดีกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ในขณะที่อัตราการงอกของโคนิเดียในเชื้อรา *Beauveria* spp. บนหนอนใยผักมีอัตราที่สูงกว่าอัตราการงอกของโคนิเดียในเชื้อรา *Metarhizium* spp. แต่กลับมีประสิทธิภาพต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการงอกของเชื้อรา *Beauveria* spp. ใช้เวลามากกว่าเชื้อรา *Metarhizium* spp. ซึ่งอาจจะอธิบายด้วยผลการทดลองของ Hernandez *et al.* (2010) ที่ได้อธิบายถึงปรากฏการณ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ในการผลิตเอนไซม์ catalase ที่เกิดจากการควบคุมของยีน *cat1* ทำให้ระหว่างการงอกของเชื้อรามีการผลิตเอนไซม์ catalase ในปริมาณที่สูงส่งผลให้ hydrogen peroxide ไม่สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของเชื้อราได้ จึงทำให้ไม่มีน้ำ และออกซิเจนที่จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตต่อไปได้ ในทางตรงกันข้ามกลับเพิ่มความรุนแรงของเชื้อรา จึงทำให้ไม่สามารถเห็นเส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงออกมาได้ ในขณะที่ Sun *et al.* (2002) ได้แสดงให้เห็นว่าพบปริมาณโคนิเดียเฉลี่ยของเชื้อรา *M. anisopliae* บนปลวกในวันที่ 2-3 อยู่ในช่วง 1.95×10^{5}-35.68×10^{5} โคนิเดีย/มิลลิลิตร ในขณะที่เชื้อรา *B. bassiana* พบปริมาณโคนิเดียเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.77×10^{5}-9.53×10^{5} โคนิเดีย/มิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อรา *M. anisopliae* มีการงอกของโคนิเดียได้เร็วกว่าเชื้อรา *B. bassiana* ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบเส้นใยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. บนตัวแมลงในวันที่ 3 ในขณะที่พบเส้นใยของเชื้อรา *Beauveria* spp. บนตัวแมลงในวันที่ 4-5 อย่างไรก็ตามการทดลองของ Talaei-Hassanloui *et al.* (2006) รายงานว่าระยะเวลาการงอกของโคนิเดีย หรือความเร็วของการงอกโคนิเดียของเชื้อรา *B. bassiana* ไม่มีผลต่ออัตราการตายของหนอนใยผัก แสดงให้เห็นว่าโคนิเดียของเชื้อรา *Metarhizium* spp. แม้จะงอกเร็วแต่ไม่มีผลต่ออัตราการตายของหนอนใยผักจึงทำให้เชื้อราบางไอโซเลทมีประสิทธิภาพสูงกว่าเชื้อรา *Beauveria* spp. เช่น เชื้อราสกุล *Metarhizium* ไอโซเลท BCC4810 และ BCC4849 ในขณะที่บางไอโซเลทมีประสิทธิภาพต่ำกว่าเชื้อรา *Beauveria* spp. เช่นเชื้อราสกุล *Metarhizium* ไอโซเลท BCC12636 และ BCC22353

5.3 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ผนังลำตัวของแมลงประกอบด้วยโครงสร้างไคตินเป็นองค์ประกอบหลัก และถูกห่อหุ้มด้วย protein matrix (Chapman, 1998; Klowden, 2002; Gullan and Cranston, 2005) ในการแทง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ทะลุผ่านผนังลำตัวแมลงนั้นเชื้อราต้องการเอนไซม์เพียงปริมาณเล็กน้อยเท่านั้นในการผ่านผนังลำตัวเข้าไป (St. Leger *et al.*, 1996a) ในการทดลองนี้ได้ตั้งข้อสังเกตถึงความชัดเจนของ clear zone ที่เกิดขึ้นจากการย่อยไคตินของเชื้อราในแต่ละไอโซเลทว่าอาจจะสามารถบ่งบอกถึงการมีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเบื้องต้นได้ แต่จากการทดลองของ Gupta *et al.* (1991) ที่ทดสอบการผลิตเอนไซม์ของเชื้อรา *M. anisopliae* บนอาหารแข็งที่ผสมด้วย cuticle ของหนอน *Galleria mellonella* และ *Trichoplusia ni* แสดงให้เห็นว่ายังมีเอนไซม์ หรือเมตาบอไลท์ (metabolite) ตัวอื่นที่สามารถย่อยผนังลำตัวแมลงได้อีก เช่น esterase และ chymoelastase เช่นเดียวกับ Roberts *et al.* (1992) ได้รายงานว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงผลิตเมตาบอไลท์ตัวอื่น ๆ ซึ่งมีศักยภาพเป็นตัวควบคุมแมลงได้ เช่น สารอินทรีย์ที่เป็นพิษ และกลุ่มของ depsipeptide อย่างไรก็ตามการวัดขนาดของ clear zone โดยแสดงอยู่ในรูปของอัตราส่วนระหว่าง clear zone และขนาดของโคโลนี อาจจะไม่สามารถบ่งชี้ปริมาณเอนไซม์ที่แท้จริงได้ ซึ่ง Draganova *et al.* (2010) ได้แสดงให้เห็นถึงความผันแปรของขนาดโคโลนีในเชื้อรา *Beauveria* spp. ที่ใช้ควบคุมมอดเจาะเปลือกไม้ (bark beetle) มีความผันแปรของขนาดโคโลนีตั้งแต่ 17.7-34 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับในเชื้อรา *M. anisopliae* มีความผันแปรของขนาดโคโลนีตั้งแต่ 4.69-6.33 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ mungbean agar (MU) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (สุภัสสา, 2550) ในขณะที่ Shah *et al.* (2005) ได้รายงานถึงอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนี (growth rate) ในเชื้อรา *M. anisopliae* อยู่ในช่วง 4.1-4.19 มิลลิเมตร/วัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Parker *et al.* (2003) ได้แสดงถึงอัตราการเจริญเติบโตของโคโลนีในเชื้อรา *Beauveria* spp. ซึ่งอยู่ในช่วง 0.36-1.18 มิลลิเมตร/วัน (เฉลี่ย 0.87 มิลลิเมตร/วัน; n=19) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นการแสดงปริมาณการสร้างเอนไซม์โดยการวัด clear zone อาจไม่สามารถระบุปริมาณที่แท้จริงได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้สามารถที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไคติเนสในเชื้อราเชิงคุณภาพได้ ซึ่งสามารถระบุถึงความสามารถของเชื้อราในการย่อยไคตินเท่านั้น โดยจะปรากฏเป็น clear zone (Nopparat *et al.*, 2007; Maketon *et al.*, 2008)

นอกจากนี้พบว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* ไอโซเลท Bb.5335 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสดีที่สุดในวันที่ 11 ของการเลี้ยงในอาหารเหลว นอกจากนี้เชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยงในอาหารเหลว และมีกิจกรรมสูงสุดในช่วงวันที่ 9-11 ซึ่งแตกต่างกับผลการทดลองของ Dhar and Kaur (2010) ที่เลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana* ในอาหารที่มีเคซีนเป็นส่วนประกอบ พบว่ามีกิจกรรมสูงสุดในช่วงวันที่ 4-6 แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบในอาหารสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสจะเกิดขึ้นหลังจากการมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากส่วนประกอบของผนัง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ลำตัวแมลงประกอบไปด้วยโปรตีนมากกว่าครึ่งหนึ่งของน้ำหนักแห้งของผนังลำตัว (Klowden, 2002; Nation, 2008) และยังประกอบไปด้วยไคติน ฟีนอล และไขมัน (Nation, 2008) ดังนั้นเอนไซม์โปรติเอสน่าจะเกี่ยวข้องโดยตรงในกระบวนการย่อยโปรตีนบริเวณผนังลำตัวแมลง และอาจจะมีบทบาทสำคัญในการช่วย หรือส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสทำลายผนังเซลล์ลำตัวของแมลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ St. Leger *et al.* (1986b)

นอกจากนี้ในการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบในครั้งนี้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็งได้ตั้งแต่วันที่ 1 ในขณะที่ในอาหารเหลวเชื้อราเริ่มผลิตเอนไซม์ไคติเนสในวันที่ 7 ซึ่งผลการทดลองไม่สอดคล้องกันอาจจะเกิดจากวิธีการทดสอบที่ต่างกันคือในสภาพปกติ และในสภาพของเหลว อาจจะอธิบายได้จากงานทดลองของ Purwanto *et al.* (2009) ที่แสดงให้เห็นว่าความเร็วรอบที่เพิ่มขึ้นในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวนั้นสามารถเพิ่มปริมาณของเชื้อรา โดยเป็นการเพิ่มปริมาณออกซิเจนเข้าไปในอาหารเหลว (Abd-Aziz *et al.*, 2008) ทำให้เชื้อราเจริญได้ดี และเร็วขึ้น ดังนั้นหากเพิ่มความเร็วรอบในการเลี้ยงเชื้อรามากกว่า 200 รอบ/นาที วันที่เริ่มผลิตเอนไซม์ไคติเนสอาจจะเร็วขึ้นจากเดิม นอกจากนี้ปริมาณของคาร์บอน และไนโตรเจนที่อยู่ในอาหารแข็ง และอาหารเหลวที่ต่างกัน มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส (Dhar and Kaur, 2009)

5.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งพบว่าระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 25 ไอโซเลท ซึ่งอยู่ในช่วง 26.28-144.7 ชั่วโมง นั้นมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราบนตัวแมลงอยู่ในช่วง 3.33-66.67 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีความสำคัญต่อกระบวนการเข้าควบคุมแมลง แสดงว่ามีเอนไซม์โปรติเอส และไคติเนสเกี่ยวข้องในขณะที่เส้นใยของเชื้อรา *M. anisoplise* แทงผ่านผนังลำตัวแมลง *Calliphora vomitoria* และ *Manduca sexta* (St. Leger *et al.*, 1987b) ในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด และได้พบความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง และกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์โปรติเอส เช่นเดียวกับ Dias *et al.* (2008) พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่อผนังลำตัวของมอดเจาะผลกาแฟในสภาพห้องปฏิบัติการ ในขณะที่ Roberts *et al.* (1992) รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสสำคัญที่สุดในกระบวนเจาะผ่านผนังลำตัวแมลง ส่วนเอนไซม์ไคติเนสมีความสำคัญรองมา แต่ในการทดลองของ Gupta *et al.* (1994) ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ระหว่างอัตราการตาย ค่า LT_{50} และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อรา *B. bassiana* ในการควบคุม *Galleria mellonella* และ *Trichoplusia ni* พบว่ามีความสัมพันธ์กัน เช่นเดียวกับ Gupta *et al.* (1994) พบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตาย ค่า LT_{50} และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส ของเชื้อรา *B. bassiana* นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสทำงานร่วมกัน (St. Leger *et al.*, 1986b) ดังผลการทดลองนี้ที่พบว่าค่า LT_{50} ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในวันที่ 7-9 หลังจากนั้นจะพบความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในวันที่ 11 และ 17-19 เนื่องจากโครงสร้างไคตินถูกห่อหุ้มด้วย protein matrix (Chapman, 1998; Klowden, 2002; Gullan and Cranston, 2005) ดังนั้นเอนไซม์โปรติเอสน่าจะย่อยโปรตีนก่อนจนเหลือแต่โครงสร้างไคติน ตามด้วยการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส

5.5 การศึกษายีนไคติเนส

จากการศึกษายีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ในเชื้อรา *Metarhizium* spp. ด้วยวิธีการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ genomic DNA และ complementary DNA จากฐานข้อมูลใน gene bank ด้วยโปรแกรม DNAMAN 4.0 ทำให้ทราบว่าส่วนของ exon (coding) มีขนาด 1,398 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนของ intron ที่แทรกอยู่จำนวน 3 ส่วน แต่ละส่วนมีขนาด 101, 68 และ 80 คู่เบส โดยมีส่วนที่เหมือนกัน (conserve) คือ 5'GT และ 3'AG คล้ายกับการรายงานของ Bogo *et al.* (1998) เกี่ยวกับยีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ในส่วนของ open reading frame (ORF) หรือส่วนของ exon มีขนาด 1,521 คู่เบส ซึ่งมีความแตกต่างกับการทดลองครั้งนี้ประมาณ 123 คู่เบส ซึ่งอาจจะเกิดจากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการเปรียบเทียบข้อมูลที่ต่างกัน ในขณะที่ส่วนของ intron และส่วนที่เหมือนกัน คือ 5'GT และ 3'AG พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ในการศึกษาความผันแปรของยีนไคติเนสด้วยเทคนิค PCR-SSCP นั้น พบ SNPs ในคู่ไพรเมอร์ chit42-2 และ chit42-3 โดยปรากฏชัดเจนในกลุ่มของเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งทั้งกลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy มีแถบแบนดีเอ็นเอหลักร่วมกันอยู่ 1 แถบ และมีการปรากฏแถบแบนดีเอ็นเออีก 1 แถบ ในตำแหน่งที่แตกต่างกันซึ่งปรากฏในคู่ไพรเมอร์ chit42-2 เช่นเดียวกันในคู่ไพรเมอร์ chit42-3 มีแถบแบนดีเอ็นเอหลักร่วมกันอยู่ 2 แถบ และมีการปรากฏแถบแบนดีเอ็นเออีก 1 แถบในตำแหน่งที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ เป็นบริเวณที่มีการแปลรหัสทางพันธุกรรมเกี่ยวกับการควบคุมการแสดงออกของยีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของเชื้อราในการควบคุมหนอนใยผัก โดยในการทดลองนี้พบความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสกุล *Metarhizium* สอดคล้องกับ Gupta *et al.* (1994) ที่ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า LT_{50} และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส ของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ใช้ควบคุมหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง *Galleria mellonella* และหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* เช่นเดียวกับงานทดลองของ Boldo *et al.* (2009) พบว่าปริมาณของเอนไซม์ไคติเนสที่ถูกควบคุมด้วยยีนไคติเนส *chi2* จากเชื้อรา *M. anisopliae* มีความสัมพันธ์กับระยะเวลา (LT_{50}) ในการเข้าควบคุมมวนแดงฝ้าย แสดงให้เห็นว่ายีนไคติเนส *chti42* (*chit1*) จากเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการคัดเลือกเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณหรือกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสได้ ในขณะที่กลุ่มของเชื้อรา *M. flavoviride* มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวแตกต่างกับกลุ่มของเชื้อรา *M. anisopliae* แต่ไม่มีความแตกต่างภายในชนิดเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าส่วน coding ของเชื้อรา *M. flavoviride* อาจจะอยู่ตำแหน่งอื่นของเส้นดีเอ็นเอ และบริเวณที่ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ อาจจะเป็นส่วนของ non-coding เนื่องจากไม่พบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวระหว่างกลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy สอดคล้องกับการศึกษาของ Screen and St. Leger (1999) ได้ทำการศึกษาส่วน coding ในยีนไคติเนส *chi1* จากเชื้อรา *M. flavoviride* ซึ่งไม่อยู่ในบริเวณที่ทำการศึกษายีนไคติเนสในครั้งนี้ จากความแตกต่างของแถบดีเอ็นสายเดี่ยวของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* อาจจะนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อราได้ (Hegedus and Khachatourians, 1995; Kuo *et al.*, 2005) ดังนั้นหากทำการศึกษายีนไคติเนสของเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวนหลาย ๆ ชนิด ด้วยเทคนิค PCR-SSCP อาจจะไม่เหมาะสม ซึ่ง Enkerli *et al.* (2009) ได้รายงานถึงวิธีการตรวจสอบยีนไคติเนสด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* ว่าเป็นวิธีที่อาจจะนำไปใช้กับเชื้อราสกุล *Metarhizium* ชนิดอื่น ๆ ได้ในคราวเดียวกัน จึงเป็นวิธีการที่สะดวกมากขึ้นในการนำไปใช้ประโยชน์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved