

บทที่ 6

สรุป

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสามารถที่จะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในสภาพห้องปฏิบัติการได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท (43.1 เปอร์เซ็นต์) โดยแบ่งเป็นเชื้อราสกุล *Beauveria* จำนวน 12 ไอโซเลท (48 เปอร์เซ็นต์) และ *Metarhizium* จำนวน 13 ไอโซเลท (52 เปอร์เซ็นต์) โดยเชื้อราทั้งหมดถูกนำไปทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตรพบว่าเชื้อรา *Beauveria* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 32.29-73.26 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง อยู่ในช่วง 16.67-66.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Metarhizium* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-144.74 ชั่วโมง และการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงอยู่ในช่วง 3.33-52.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากประสิทธิภาพของเชื้อราสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy) มีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy) มีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 และ BCC22353 โดยมีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-34.98 ชั่วโมง และ 73.26-144.74 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำตัวแทนทั้ง 2 กลุ่มมาทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลในการแบ่งกลุ่มที่ผ่านมาด้วยค่า LC_{50} พบว่าที่ 96 ชั่วโมง เชื้อรากลุ่ม high efficacy ทั้ง 2 สกุล คือ Bb.5335 และ BCC4849 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.66×10^6 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร และ 3.11×10^5 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร และเชื้อรากลุ่ม low efficacy ทั้ง 2 สกุล คือ BCC14841 และ BCC22353 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 9.44×10^6 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร และ 2.88×10^8 โคโคนิเดีย/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งยังแสดงผลสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงที่ทดสอบหาค่า LT_{50}

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 2 กลุ่มมาทดสอบเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อราจำนวน 8 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ คือ BCC17599, Bb.5335, BCC1707, BCC1858, BCC4810, BCC4849, BCC12636 และ BCC22353 ในขณะที่เชื้อราในสกุล *Beauveria* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC14841 และ Bb.2637 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้ เฉพาะเชื้อราไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) เพื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส พบว่าเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.58-181.05 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง

4.39-68.58 มิลลิลิตร/มิลลิกรัม ในขณะที่การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 50.24-55.24 มิลลิลิตร/มิลลิกรัม และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 54.41-57.93 มิลลิลิตร/มิลลิกรัม นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์โปรติเอสเกิดกิจกรรมก่อนเอนไซม์ไคตินเอส และอาจจะเสริมฤทธิ์กันในกระบวนการผ่านผนังลำตัวแมลง จากการศึกษาความสัมพันธ์ในเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์ไคตินเอสมีผลต่ออัตราการตายของแมลง โดยอาจจะมียับยั้งอื่น ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องในกระบวนการเกิดโรคของแมลงด้วย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการควบคุมแมลง และกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้แสดงความสัมพันธ์ และมีประสิทธิภาพดีกว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* จึงนำเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy ซึ่งมีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-41.03 ชั่วโมง จำนวน 3 ไอโซเลท คือ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่ม low efficacy ซึ่งมีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 112.63-144.74 ชั่วโมง จำนวน 3 ไอโซเลท คือ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 มาศึกษาความผันแปรของยีนไคตินเอส *chit42* (*chit1*) ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบว่ายีนไคตินเอส *chit42* (*chit1*) ที่ศึกษามีส่วนที่ใช้ในการแปลรหัส (exon) ขนาด 1,398 คู่เบส และส่วนของ intron สั้น ๆ อีก 3 ส่วน มีขนาด 101, 68 และ 80 คู่เบส ตามลำดับ โดยมีส่วนที่เหมือนกัน (conserve) คือ 5'GT และ 3'AG ในขณะที่ผลิตภัณฑ์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ *chit42-2* และ *chit42-3* เกิด SNPs หรือจุดกลายพันธุ์ ระหว่างเชื้อรา กลุ่ม high efficacy และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy นอกจากนี้ลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบน non-denaturing gel ของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* มีความแตกต่างกัน ซึ่งจุดกลายพันธุ์ดังกล่าวสามารถนำไปศึกษา และพัฒนาไปเป็นเครื่องหมายโมเลกุลอย่างง่ายในการใช้จำแนกกลุ่มของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนไผ่ฝัก และใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ต่อไป