บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

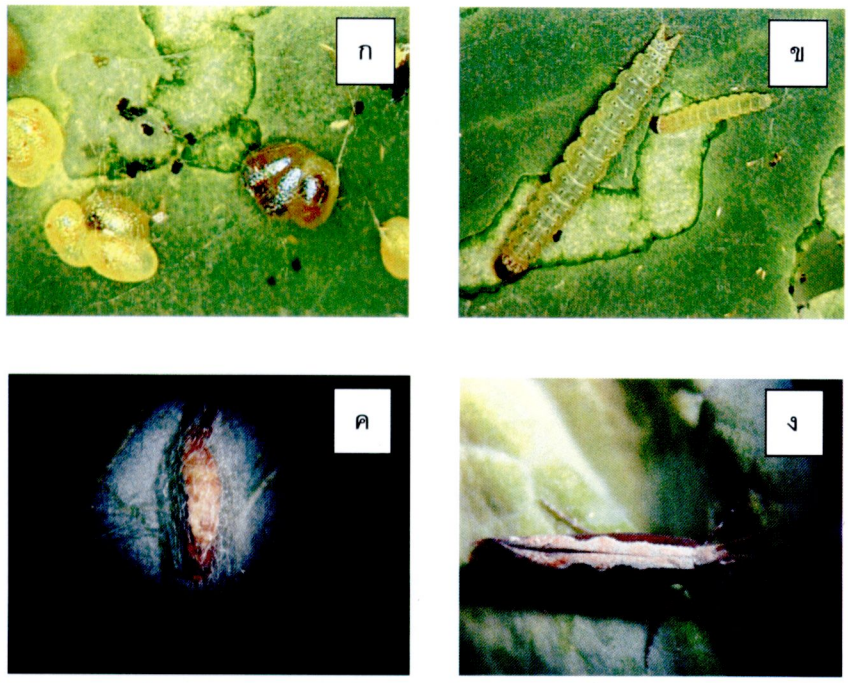
2.1 หนอนใยผัก (*Plutella xylostella* (Linnaeus), Lepidoptera: Plutellidae)

หนอนใยผัก เป็นศัตรูที่สำคัญของพืชตระกูลกะหล่ำในเขตอบอุ่น และเขตร้อน มีการแพร่กระจายไปทั่วโลก สามารถทำลายพืชได้อย่างกว้างขวางทั้งที่เป็นพืชธรรมชาติ และที่ปลูกเพื่อการเก็บเกี่ยว

ตัวเต็มวัยเพศเมียจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวหรือกลุ่มเล็ก ๆ ประมาณ 2-8 ฟอง บริเวณเส้นกลางใต้ใบ ลักษณะของไข่จะมีสีเหลืองขนาดเล็กกว่า 1 มิลลิเมตร และกลม หลังจากการฟักตัวหนอนจะมีสีเขียวใส และจะเปลี่ยนไปเป็นสีเขียวเข้มเมื่อเจริญเติบโต ส่วนหัวและท้ายเรียวแหลมเป็นแฉก ลำตัวปกคลุมไปด้วยขนสั้นสีดำคล้ายหนาม มีขาเทียม 5 คู่ หนอนใยผักอาจมีลำตัวยาวถึง 13 มิลลิเมตร เมื่อถูกรบกวนจะบิดตัวไปมาอย่างรวดเร็ว เคลื่อนที่ถอยหลัง และจะทิ้งตัวลงข้างล่างโดยใช้เส้นใย ขนาดลำตัวของหนอนวัย 1-4 มีขนาด 1.7, 3.5, 7.0 และ 11.2 มิลลิเมตร เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่ตัวหนอนก็จะสร้างเส้นใยเป็นดักแด้ ยึดเกาะกับใบ ลำต้น หรือฝักของพืช ในระยะเริ่มแรกดักแด้จะมีสีเขียวอ่อน หลังจากนั้นก็จะเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลเมื่อใกล้ออกจากดักแด้ ขนาดของดักแด้ยาวประมาณ 7-9 มิลลิเมตร และอยู่ในระยะดักแด้เฉลี่ย 8.5 วัน ตัวเต็มวัยเป็นผีเสื้อกลางคืนมีขนาดเล็ก 6-10 เซนติเมตร สีน้ำตาลปนเทา มีลายรูปสวมเหลี่ยม สีน้ำตาลอ่อนถึงสีขาว 3 จุดที่ขอบปีกด้านหน้า เมื่อเกาะนิ่งอยู่กับที่จะสังเกตเห็นว่ามีลักษณะคล้ายเพชร 3 เม็ดเรียงกันตรงกลางหลังจึงมักเรียกผีเสื้อชนิดนี้ว่า diamondback moth (ภาพ 1) ตัวเต็มวัยสามารถบินได้สูงถึง 2 เมตรจากพื้นดิน (IPM DANIDA, 2547; Capinera, 2000; Knodel and Ganehiarachchi, 2008) หนอนใยผักมีวงจรชีวิตขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและพืชอาหารที่เหมาะสม ตั้งแต่ระยะไข่ไปจนถึงตัวเต็มวัยใช้เวลา 23-38 วัน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส (Ahmad *et al.*, 2008; Golizadeh *et al.*, 2009) ตัวเต็มวัยมักผสมพันธุ์กันในช่วงเวลากลางคืน เพศเมียสามารถวางไข่ได้ในระยะเวลา 10 วันและวางไข่เฉลี่ย 150 ฟอง ตลอดช่วงอายุขัย ไข่จะฟักภายใน 5-6 วัน ระยะหนอนมีทั้งหมด 4 ระยะใช้เวลาประมาณ 21-30 วัน ตัวเต็มวัยเพศผู้จะมีอายุขัยสั้นกว่าเพศเมียเฉลี่ย 12 และ 16 วัน ตามลำดับ (Capinera, 2000; Knodel and Ganehiarachchi, 2008; Golizadeh *et al.*, 2009) ความเสียหายของพืชเกิดจากหนอนขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของหนอน และระยะการเจริญเติบโตของพืช โดยหนอนจะกินใบ

ตาดอก ดอกฝัก และส่วนอื่น ๆ ของลำต้นซึ่งสามารถที่จะแยกการเข้าทำลายของหนอนใยผักได้ โดยหนอนที่ฟักออกมาใหม่จะกินอยู่ในเนื้อเยื่อใบคล้ายหนอนชอนใบ เมื่อหนอนเจริญเติบโตได้สักระยะหนึ่งจะกัดกินใต้ใบพืช และกินเฉพาะเนื้อใบจึงเหลือแต่เส้นใบมองเห็นเป็นช่องหน้าต่าง (window type) โดยหนอนใยผักในรุ่นที่ 2 จะทำความเสียหายเป็นอย่างมาก (Rushtapakornchai and Vattanatangum, 1986; Wakisaka *et al.*, 1990; Capinera, 2000) ดังนั้นเกษตรกรไทยจึงมีแนวโน้มที่จะใช้ปริมาณสารเคมีในการกำจัดแมลงเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับพืชผัก (Jungbluth, 1996) ส่งผลให้หนอนใยผักซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่งของพืชผักเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในหลายกลุ่ม คือ organophosphate, synthetic pyrethroid และ insect growth regulator (Rushtapakornchai and Vattanatangum, 1986) ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกันกับที่มีรายงานการต้านทานของหนอนใยผักต่อสารเคมีกำจัดแมลงในประเทศมาเลเซีย (Syed, 1992) ในขณะที่ประเทศญี่ปุ่นมีการรายงานว่าหนอนใยผักเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม organophosphate, carbamate และ pyrethroid รวมทั้งยังเกิดการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Hama, 1992) เช่นเดียวกับประเทศบราซิลหนอนใยผักเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม organophosphate, carbamate และ pyrethroid (Branco and Gatehouse, 1997) นอกจากนี้ในประเทศออสเตรเลียหนอนใยผักยังเกิดการต้านทานต่อสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม pyrethroid (Endersby and Ridland, 2001)

จากปัญหาความต้านทานสารเคมีกำจัดแมลงที่เกิดขึ้นกับหนอนใยผัก Talekar and Shelton (1993) ได้เสนอแนวทางอื่นในการควบคุมหนอนใยผัก คือ การเขตกรรม การใช้พืชต้านทาน การใช้ฟีโรโมน และการควบคุมโดยชีววิธี ซึ่งเป็นวิธีที่หลาย ๆ ประเทศนำไปปฏิบัติ และประสบความสำเร็จ เช่นประเทศนิวซีแลนด์มีการพัฒนาฟีโรโมนเพศเพื่อใช้ในการควบคุมหนอนใยผักเพศผู้ซึ่งให้ผลในการควบคุมหนอนใยผักดีกว่าเดิม (Suckling *et al.*, 2002) ในประเทศจีนใช้กระเทียม และผักกาดหอมปลูกแซมกับผักคะน้าสามารถลดปริมาณของหนอนใยผักได้ ซึ่งสามารถให้ผลในระยะยาว (Cai *et al.*, 2011) ในประเทศไทยมีการใช้แตนเบียน *Cotesia plutellae* ในการควบคุมหนอนใยผักในสภาพแปลง ซึ่งมีอัตราการเบียนถึง 74 เปอร์เซ็นต์ (Rowell *et al.*, 2005) ในประเทศเบนิน ซึ่งอยู่ในทวีปแอฟริกามีการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* ควบคุมหนอนใยผัก โดยทำให้เกิดอัตราการตายสูงถึง 94 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถลดความเสียหายของผลผลิตจากการเข้าทำลายของหนอนใยผักได้อีกด้วย (Godonou *et al.*, 2009)



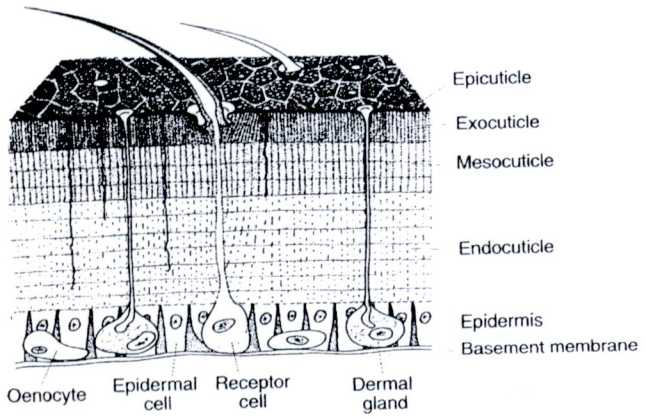
ภาพ 1 การพัฒนาระยะต่าง ๆ ของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella* (L.)) (ก) ระยะไข่ (ข) ระยะหนอน (ค) ระยะดักแด้ และ(ง) ระยะตัวเต็มวัย

2.2 ผนังลำตัวของแมลง

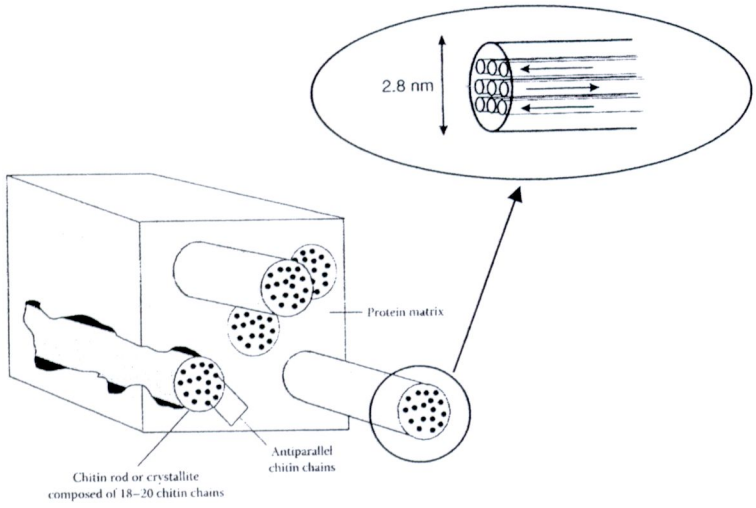
Romoser (1981); Chapman (1998); Triplehorn and Johnson (2005) ได้อธิบายว่าแมลงมีผนังลำตัวเพื่อช่วยในการปกป้องอวัยวะต่าง ๆ ที่อยู่ภายในลำตัว และช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำของร่างกาย รวมทั้งสร้างพลังงานจากการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ยึดเกาะกับผนังลำตัว มีลักษณะเป็นแผ่นแข็ง (sclerites) และมักเรียกว่าเป็นกระดูกภายนอกลำตัว (exoskeleton) นอกจากนี้แมลงยังมีกระดูกแข็งภายในลำตัว (endoskeleton) เป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อ ผนังลำตัวของแมลงสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชั้น (ภาพ 2) โดยผนังลำตัวชั้นนอก (cuticle) ถือว่าเป็นชั้นแรกที่ป้องกันอวัยวะภายในต่าง ๆ ไม่ให้ได้รับความเสียหายจากปัจจัยภายนอกร่างกาย

ผนังลำตัวชั้นนอกประกอบด้วยองค์ประกอบทางเคมีหลัก ๆ ไปด้วยไคติน (chitin) ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งลำตัว ซึ่งถูกหุ้มด้วยโปรตีน (protein metrix) ซึ่งมีอยู่ประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 3) (Klowden, 2002) และองค์ประกอบอื่น ๆ คือ ฟีนอล (phenol) ไขมัน และควินนิน (quinine) (Romoser, 1981; Klowden, 2002) โดยเฉพาะไคติน ซึ่งพบในชั้น procuticle เป็นโครงสร้างที่มีคุณสมบัติไม่สามารถละลายด้วยน้ำ กรดอ่อน ด่างแก่ แอลกอฮอล์ และสารละลายอินทรีย์ได้ (Klowden, 2002; Gullan and Cranston, 2005) จึงเป็นสารเคมีที่ทำให้ผนัง

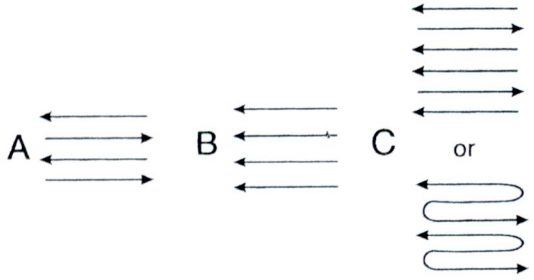
ลำตัวชั้นนอกของแมลงแข็งแรง (Triplehorn and Johnson, 2005) โดยไคตินที่พบในแมลงนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 แบบ คือ γ-chitin, β-chitin และ α-chitin โดย γ-chitin และ β-chitin พบในดักแด้ของด้วงบางชนิด และสัตว์มีกระดูกสันหลังบางชนิด นอกจากนี้ยังพบ γ-chitin ในส่วนของ peritrophic membrane ของแมลงบางชนิด ในขณะที่ α-chitin พบได้ในแมลงทั่วไป (Klowden, 2002) ซึ่งการจัดเรียงตัวของแท่งไคตินแบบ α-chitin จะแข็งแรงกว่าการจัดเรียงตัวของแท่งไคตินแบบ γ-chitin และ β-chitin (ภาพ 4) (Merzendorfer and Zimoch, 2003) อย่างไรก็ตามไคติน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทนทานแต่สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์หลายชนิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เช่น lipase, protease, esterase, aminopeptidase, carboxypeptidase A, N-acetylglucosaminidase และ chitinase เป็นต้น (St. Leger *et al.*, 1986b)



ภาพ 2 ภาพตัดขวางของผนังลำตัวของแมลง ที่ประกอบไปด้วยผนังลำตัวชั้นนอก (cuticle) ผนังลำตัวชั้นกลาง (epidermis) และผนังลำตัวชั้นใน (basement membrane) (Klowden, 2002)



ภาพ 3 แท่งไคติน (chitin chain) ประมาณ 20 แท่ง จับกันด้วยพันธะไฮโดรเจนเป็น chitin microfibril หนาประมาณ 2.8 นาโนเมตร และถูกหุ้มด้วยโปรตีนที่อยู่ในชั้น cuticle (Klowden, 2002)



ภาพ 4 การจัดเรียงตัวของแท่งไคติน (chitin chain) ในชั้น cuticle ของแมลง (A) การเรียงตัวของไคตินแบบ α-chitin (B) การเรียงตัวของไคตินแบบ β-chitin (C) การเรียงตัวของไคตินแบบ γ-chitin (Klowden, 2002)

2.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* ทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า white muscardine และสกุล *Metarhizium* ทำให้เกิดโรคที่เรียกว่า green muscardine จัดอยู่ใน subdivision Deuteromycotina; class Hyphomycetes (Tanada and Kaya, 1993) ซึ่งเป็นเชื้อราที่มีวงจรชีวิตที่ไม่สมบูรณ์โดยจะไม่

พบช่วงของการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual) แต่จะขยายพันธุ์โดยการสร้างโคนิเดียแทน ดังนั้นจึงเรียกเชื้อรากลุ่มนี้ว่า Fungi imperfecti (ทิพย์วดี, 2535; Boucias and Pendland, 1998)

2.3.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria*

Rehner (2005) ได้อธิบายลักษณะของเชื้อราสกุล *Beauveria* ว่าเป็นเชื้อราสกุลแรกที่พบว่าสามารถก่อให้เกิดโรคกับแมลงได้ โดยพบในอุตสาหกรรมการผลิตไหมช่วงศตวรรษที่ 18 และศตวรรษที่ 19 ซึ่งทำให้หนอนไหมเกิดเส้นใย และโคนิเดีย (conidia) ปกคลุมลำตัวจนเป็นสีขาวทั้งหมด เรียกว่า white muscardine หลังจากการค้นพบได้มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น และพบว่าเชื้อราชนิดนี้ยังสามารถใช้ควบคุมแมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจได้อีกหลายชนิด จึงถูกนำมาใช้เป็นหนึ่งในวิธีการควบคุมโดยธรรมชาติด้วยคุณลักษณะต่าง ๆ คือสามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วโลกโดยพบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติ มีแมลงอาศัยหลายชนิด และสามารถปรับตัวได้ดีในทุกสภาพ Boucias and Pendland (1998); Glare and Inwood (1998) ได้อธิบายลักษณะของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* ว่าลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีขาวไปจนถึงสีเหลืองอ่อน บางครั้งพบว่าเป็นสีแดง ส่วนของโคนิเดียมีลักษณะเหี่ยวแห้ง ใสไม่มีสี และมีรูปร่างกลมไปจนถึงรูปวงรี โดยก้านชูสปอร์รวมกันเป็นกลุ่มคล้ายกับปุยนุ่น บริเวณฐานของก้านชูสปอร์มีลักษณะพองขยายออกคล้ายกับขวดรูปชมพู่ ส่วนของก้านมีขนาดเรียวยาว และงอ ส่วนปลายแตกออกเป็นแฉกอย่างชัดเจน และมีโคนิเดียติดอยู่ที่ปลายสุด

2.3.2 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria*

ในปัจจุบันมีการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* ในการควบคุมแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆกันอย่างแพร่หลาย เช่นการใช้ควบคุมหนอนเจาะลำต้นอ้อยในรัฐเทกซัส ประเทศสหรัฐอเมริกา (Legaspi *et al.*, 2000) หนอนทำลายผักกะหล่ำ *Crocidolomia pavonana* (F.) ในประเทศอินโดนีเซีย (Trizelia and Nurdin, 2010) หนอนเจาะผลแอปเปิล *Synanthedon myopaeformis* ในประเทศแคนนาดา (Cossentine *et al.*, 2010) และปลวก จากประเทศสหรัฐอเมริกา และจีน (Wang and Powell, 2002) เป็นต้น ซึ่งการใช้เชื้อราสกุล *Beauveria* อย่างแพร่หลายมีมากขึ้นตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ทำให้ในอดีตเกิดการตั้งข้อสังเกตของ Steinhaus เมื่อปี 1975 ถึงความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีต่อมนุษย์ สัตว์มีกระดูกสันหลัง และพืชชนิดอื่น ๆ (Zimmermann, 2007a) ซึ่งปัจจุบันทำให้นักวิชาการหลาย ๆ ท่านทำการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้เชื้อราชนิดนี้กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มากขึ้นเช่นกัน ดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

สิ่งมีชีวิต	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ผู้ทำการทดลอง/ปี
1. ด้วงเต่า	จุ่มด้วงเต่าในสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^4-10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร	1. ด้วงเต่าในพื้นที่อ่อนแอต่อเชื้อรา 2. ด้วงเต่าจากพื้นที่อื่นมีความทนทานต่อเชื้อรา	Cottrell and Shapiro-Ilan, 2003
2. ผึ้ง	พ่นสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^8-10^9 CFU/กรัมใส่ในกรง และรังผึ้ง	มีอัตราการตายต่ำ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม	Al mazráawi, 2007
3. ด้วงเต่า 4. แมลงช้างปีกใส 5. แตนเบียนแมลงหวี่ขาว 6. แมลงหางดีด	พ่นด้วยสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร	ไม่ก่อให้เกิดโรคกับแมลงที่มีประโยชน์ และแมลงหางดีด	Thungrabeab and Tongma, 2007
7. นก	ผสมสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^9 โคนิเดีย/อาหารไก่ 1 กรัม	1. มีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ 2. พฤติกรรมปกติ 3. ไม่พบการงอกของเชื้อราในก้อนมูลที่ถ่ายออกมา	Haas-Costa *et al.*, 2010

2.3.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium*

ในช่วงปี 1878 และ ปี 1879 มีนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Metchnikoff ได้สังเกต และคัดแยกเชื้อราจากแมลงศัตรูพืช wheat cockchafer, *Anisoplia austriaca* ที่เป็นโรคโดยมีเส้นใยสีขาวขึ้นปกคลุมทั่วตัว ยกเว้นส่วนหัว หลังจากนั้นเส้นใยสีขาวจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม จึงเรียกว่า green muscardine (ทิพย์วดี, 2535; Tanada and Kaya, 1993) ลักษณะของโคโลนีขณะที่ยังอ่อนจะเป็นสีขาว หลังจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ก้านชูสปอร์เป็นช่อ และส่วนปลายสุดสามารถหลุดออกมาเพื่อสร้างเป็นโคนิเดียโดยจะต่อกันเป็นเส้นยาว และเกาะกันอยู่อย่างหนาแน่นจนเป็นแท่งคล้ายปริซึมอยู่บน

ก้านชูสปอร์ ลักษณะของโคนิเดียเป็นรูปทรงกระบอกหรือยาวเป็นวงรี มี 2 แบบ คือ โคนิเดียที่มีขนาดสั้น 3.5 ถึง 9 ไมโครเมตร และโคนิเดียที่มีขนาดยาว 9 ถึง 18 ไมโครเมตร (Tanada and Kaya, 1993; Zimmermann, 2007b)

2.3.4 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium*

การศึกษาด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสกุล *Metarhizium* เริ่มขึ้นครั้งแรกในปี 1968 ซึ่ง Schaerffenberg ได้ศึกษาความปลอดภัย และผลกระทบของการใช้เชื้อราต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Zimmermann, 2007b) หลังจากนั้นเป็นต้นมานักวิชาการหลาย ๆ ท่าน ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลกระทบของการใช้เชื้อราชนิดนี้กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มากขึ้น (ตาราง 2) เนื่องจากการใช้เชื้อราในการควบคุมแมลงศัตรูชนิดต่าง ๆ แพร่หลายมากยิ่งขึ้น เช่น ใช้ในการควบคุมเห็บ ในประเทศไทยและประเทศนามิเบีย (มาลี และกรกฎ, 2552; Hedimbi *et al.*, 2011) แมลงศัตรูป่าไม้ ในประเทศอินเดีย (Remadevi *et al.*, 2010; Bai *et al.*, 2010) แมลงวันผลไม้ ในประเทศไทย (นริศ และอนุชิต, 2551) ยุงก้นปล่องในประเทศแถบแอฟริกา (Scholte *et al.*, 2005) และหนอนเจาะสมอฝ้ายในประเทศอินเดีย (Kulkarni *et al.*, 2008) เป็นต้น

ตาราง 2 ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* กับสิ่งมีชีวิตชนิด ต่าง ๆ

สิ่งมีชีวิต	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ผู้ทำการทดลอง/ปี
1. Carabidae 2.Tenebrionidae 3. Formicidae 4. Ephydridae	ฉีดพ่นสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 5×10^{12} โคนิเดีย/เฮกแตร์	มีผลกระทบน้อยกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ (มีอัตราความเสี่ยงต่ำ)	Peveling *et al.*, 1999
5. แมลงหางดีด	จุ่มในสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^7 โคนิเดีย/มิลลิลิตร	มีความเป็นพิษต่ำต่อแมลงหางดีด	Dromph and Vestergaard, 2002
6. ผึ้ง	พ่น และเคลือบสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^{10} บนแถบพลาสติกในสภาพแปลง	ไม่พบผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของผึ้ง	Kanga *et al.*, 2003

ตาราง 2 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	วิธีการทดลอง	ผลการทดลอง	ผู้ทำการทดลอง/ปี
7. หนู	ให้ทางปากด้วยสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 2.2×10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร และให้สูดดมด้วยสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 1.1×10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร	ไม่พบอัตราการตาย และไม่พบอาการติดเชื้อใด ๆ	Mancebo *et al.*, 2005

2.3.5 การพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายในแมลงอาศัย

Batko (1974) ได้แบ่งกระบวนการพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแมลงอาศัยออกเป็น 6 ระยะดังนี้

1. Infection phase เป็นระยะที่โคนิเดียของเชื้อราจะงอก และเจาะทะลุผ่านผนังลำตัวของแมลง โดยใช้กระบวนการของเอนไซม์ เริ่มต้นจากโคนิเดียของเชื้อราตกลงบนผนังลำตัวแมลง เมื่อมีความชื้นที่เหมาะสมสปอร์จะเริ่มงอก โดยสร้างเป็น germ tube แทงทะลุผนังลำตัวเข้าไปตามรอยข้อต่อระหว่างปล้อง หรือข้อต่อรยางค์ต่าง ๆ อาจจะอาศัยเอนไซม์ ต่าง ๆ เช่น lipase เพื่อช่วยย่อยสลาย wax layer ซึ่งเป็นส่วนบนสุดของผนังลำตัวของแมลง เอนไซม์โปรติเอส (protease) และเอนไซม์ไคติเนส (chitinase) เพื่อช่วยย่อยสลายส่วนของเนื้อเยื่อ epidermis ทำให้ germ tube สามารถแทงทะลุผ่านเข้าไปถึง basement membrane ได้ (ทิพย์วดี, 2535) โดยจะเริ่มภายใน 7 ชั่วโมงแรก (Masuda, 2000)

2. Lipolytic phase และ localized development หลังจากที่โคนิเดียงอกผ่านเข้าไปภายในตัวแมลงได้แล้ว เชื้อรายังมีการเจริญเติบโตช้า และไม่สามารถแพร่กระจายตัวเองภายในลำตัวแมลงได้ เชื้อราจะผลิตเอนไซม์ lipase ย่อยก้อนไขมัน (fat body) ตามผนังลำตัวของแมลง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณตัวเองภายในลำตัวของแมลง

3. Colonization of host body เป็นระยะที่เชื้อรามีการสร้างเส้นใยภายในลำตัวของแมลงอย่างรวดเร็ว และพัฒนาไปเป็น hyphal body จำนวนมาก โดยใช้สารอาหารที่มีภายในลำตัวของแมลง

4. Proteolytic phase เมื่อภายในลำตัวของแมลงเต็มไปด้วย hyphal body เชื้อราจะผลิตเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อย่อยส่วนของกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของแมลงอย่างรวดเร็วทำให้

ลำตัวของแมลงเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ซึ่งเกิดจากหยดไขมันรวมกับเส้นใยของเชื้อรา ลักษณะดังกล่าวลำตัวของแมลงจะเต็มไปด้วยของเหลว อ่อนนุ่ม และเหี่ยวย่น

5. Phase of host's body mummification หลังจากเอนไซม์ย่อยส่วนต่าง ๆ ของแมลง ส่วนของ hyphal body ที่แขวนลอยอยู่ในของเหลวจะดูดซับของเหลวที่อยู่รอบ ๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และพัฒนาไปเป็นเส้นใย ทำให้ลำตัวของแมลงที่อ่อนนุ่มเปลี่ยนไปเป็นลำตัวที่แข็งและเป็นก้อน

6. Sporulation ในระยะนี้ยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วงเวลาคือ ช่วงแรก เส้นใยของเชื้อราแทงทะลุผนังลำตัวของแมลงออกไปเจริญเติบโตภายนอกลำตัว และพัฒนาไปเป็นก้านชูสปอร์ กับโคนิเดียโดยก้านชูสปอร์อาจเป็นสายเดี่ยว หรือแตกแขนง ที่ปลายของก้านชูสปอร์จะโป่งออกมีผนังกั้น และแยกตัวออกเป็นโคนิเดีย และถูกดีดออกจากก้านชูสปอร์ตกไปยังผนังลำตัวของแมลงตัวอื่นและงอกผ่านผนังลำตัว และเริ่มวงจรชีวิตใหม่อีก (ทิพย์วดี, 2535) และช่วงที่สอง Hyphal body หรือ กลุ่มเซลล์ที่คล้ายเส้นใยจะรวมกันเป็นกลุ่ม และพัฒนาไปเป็น resting zygospore

2.3.6 ลักษณะอาการของแมลงอาศัยที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา

ลักษณะของโรคสามารถเกิดขึ้นได้หลายรูปแบบ เช่น แมลงที่ถูกเชื้อเข้าทำลายโดยที่ไม่แทงทะลุผ่านผนังลำตัวเข้าไปจะสังเกตเห็นเฉพาะเส้นใยบริเวณภายนอกลำตัวของแมลงเท่านั้น และไม่แสดงอาการใด ๆ ออกมา โดยปกติแล้วในขณะที่เส้นใยของเชื้อราแทงผ่านส่วนของ cuticle จะทำให้บริเวณที่ผิวหนังปรากฏเป็นจุดสีดำ พร้อมกับแสดงอาการหยุดกินอาหาร กระวนกระวาย และระส่ำระสาย ลักษณะดังกล่าวอาจเกิดขึ้นร่วมกับอาการอ่อนแอ และเป็นอัมพาตของแมลงซึ่งอาจจะเกิดจากสารพิษที่เชื้อราผลิตออกมา ในระยะสุดท้ายของกระบวนการการก่อโรคของเชื้อราสีของลำตัวแมลงอาจจะเกิดการเปลี่ยนสี เช่นเชื้อราก่อโรค *Entomopthora* ทำให้ลำตัวแมลงเปลี่ยนเป็นสีเหลือง หรือสีดำ ในขณะที่เชื้อราก่อโรค *Sorosporella* ทำให้ลำตัวแมลงเปลี่ยนเป็นสีขาว หลังจากนั้นลำตัวของแมลงจะเริ่มแข็ง เนื่องจากถูกดูดน้ำ และสารอาหารจากตัวแมลงทำให้ตายในที่สุด เส้นใยที่แทงทะลุออกจากแมลงจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีต่าง ๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับการแสดงลักษณะเฉพาะของโคนิเดียของเชื้อชนิดนั้น ๆ เช่นลำตัวของแมลงที่ถูกปกคลุมด้วยโคนิเดียสีขาวอาจจะเกิดจากเชื้อราสกุล *Beauveria* หรือ *Hirsutella* ในขณะที่ลำตัวของแมลงที่ปกคลุมด้วยโคนิเดียสีเทา สีเหลือง หรือสีชมพู เกิดจากเชื้อราสกุล *Paecilomyces* และเชื้อรา *M. anisopliae* และ *Nomuraea rileyi* ทำให้ลำตัวของแมลงถูกปกคลุมด้วยโคนิเดียสีเขียว (มาลี, 2551; Boucias and Pendland, 1998)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

2.3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคของแมลงโดยเชื้อรา

การก่อโรคของเชื้อรากับแมลงนั้นจะมีความรุนแรงมากน้อยต่างกันขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ของเชื้อรา แมลง และพืช หรือเรียกว่า trithrophic ดังนั้นเชื้อราบางชนิดไม่สามารถใช้ควบคุมแมลงได้เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคดังนี้

1. สายพันธุ์ของเชื้อรา

เชื้อราแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงได้แตกต่างกัน ซึ่งเป็นลักษณะทางพันธุกรรม เชื้อราสายพันธุ์ใดทำให้แมลงเกิดโรคได้ขึ้นอยู่กับ

1.1 ความสามารถในการทำให้แมลงเกิดโรค (pathogenicity) คือ เชื้อราสามารถเข้าทำลายแมลงได้ และทำลายระบบภูมิคุ้มกันในตัวแมลงทำให้แมลงเป็นโรคตาย เชื้อราบางชนิดผลิตสารพิษที่รุนแรงทำให้แมลงตายเร็วขึ้น บางชนิดเพียงแค่ใช้แร่ธาตุ และสารอาหารในตัวแมลงเพื่อการเจริญเติบโตเท่านั้น หรือบางชนิดแมลงสามารถที่จะกำจัดเชื้อราออกจากตัวแมลงได้ ซึ่งความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับ สกุล และชนิดของเชื้อรานั้น ๆ

1.2 ความรุนแรงของเชื้อรา (virulence) คือ เชื้อราที่สามารถทำให้แมลงเกิดโรคและทำให้แมลงตายได้มาก หรือน้อยแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับ สกุล ชนิด และสายพันธุ์ ดังนั้นเชื้อราในสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันจึงทำให้แมลงเกิดโรค และตายได้แตกต่างกัน

2. ชนิดของแมลง

ผนังลำตัวของแมลงประกอบด้วยไคติน และโปรตีนในปริมาณที่แตกต่างกันไปในแมลงแต่ละชนิด ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการงอกของโคนิเดีย และการแทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง นอกจากนี้สารอาหารที่อยู่ภายในตัวแมลงที่มีปริมาณแตกต่างกันจะมีผลต่อการเจริญเติบโตต่อเชื้อรา องค์ประกอบเหล่านี้จึงเป็นตัวกำหนดความเฉพาะเจาะจงของเชื้อราต่อแมลงชนิดนั้น ๆ

3. พืช

พืชแต่ละชนิดมีลักษณะทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา และสารเคมีภายในพืช ที่แตกต่างกัน ความชื้นบริเวณใบพืช หรือการคายน้ำของพืช เป็นตัวช่วยให้เชื้อราเข้าทำลายแมลงได้ดี เพราะโคนิเดียของเชื้อราต้องการความชื้นในการงอก โดยความชื้นบริเวณใบพืช และความชื้นบริเวณผนังลำตัวแมลงมีผลต่อการงอกของสปอร์มากกว่าความชื้นในบรรยากาศ สัณฐานวิทยาของพืช เช่น รูปทรง เนื้อใบ ขนาดรูปร่างของใบ และทรงพุ่ม มีผลทำให้เชื้อราคงทนอยู่บนพืชได้นานขึ้น สำหรับสารเคมีภายในพืชส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในพืชบางชนิด เช่น ฝ้าย มีสาร terpenoid gossypol ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ - 3 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 248517
เลขเรียกหนังสือ

4. ตำแหน่ง และวิธีการเข้าสู่ตัวแมลง

ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราจะแตกต่างจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ โดยสามารถเข้าสู่ตัวแมลงได้ทางผนังลำตัว และเข้าได้ทุกส่วนของตัวแมลง เช่น หัว ตา ขา ปีก โดยเฉพาะตามรอยต่อของข้อ ปล้องของแมลง เช่น ปล้องอก ปล้องท้อง ปล้องขา และปล้องหนวด เป็นต้น แมลงที่มีผนังลำตัวหนาจะทนทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อราได้ดีกว่าแมลงที่มีผนังลำตัวอ่อนนุ่ม

5. สภาพแวดล้อม

ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และแสงอุตราไวโอเลต ล้วนมีผลต่อการทำให้แมลงเกิดโรค (มาลี, 2551)

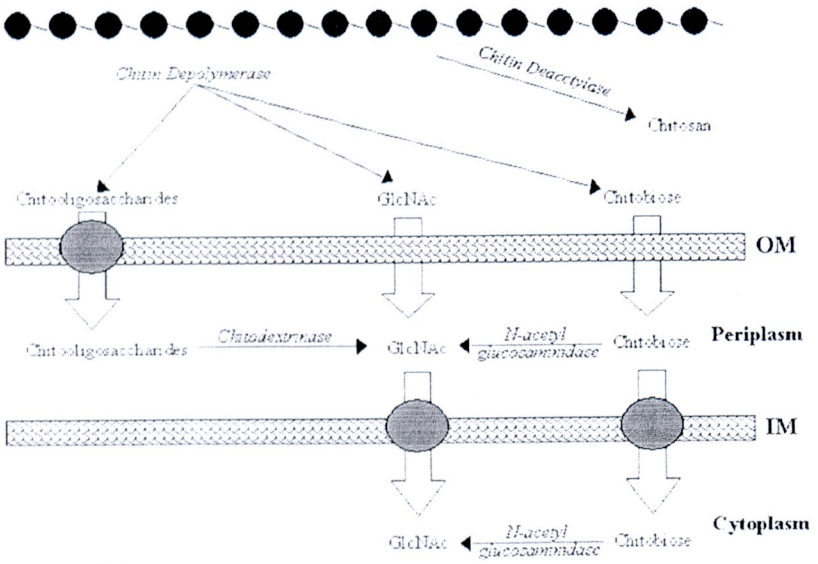
2.4 เอนไซม์ไคติเนส (Chitinase enzyme)

เอนไซม์ไคติเนสสามารถพบได้ทั่วไปในพืช แมลง เชื้อจุลินทรีย์ และสัตว์ โดยมีมวลโมเลกุลประมาณ 30 ถึง 120 kDa และค่า pI อยู่ในช่วง 3.0 ถึง 10.0 ส่วนค่า pH ที่เหมาะสมนั้นอยู่ในช่วง 3.5 ถึง 9 ซึ่งขึ้นอยู่กับสารตั้งต้นที่ใช้ (Koga *et al.*, 1999) ไคติเนสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ glycoside hydrolase มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า poly[1,4-(Nacetyl-b-D-glucosaminide)] glycanohydrolase มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ β-1,4-glycosidic ซึ่งเชื่อมต่อกับ N-acetlyglucosamine ของไคตินให้ได้เป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) (Henrissat, 1991, 1999; Merzendorfer and Zimoch, 2003; Andersen *et al.*, 2005) จำแนกตามระบบ NC-IUBMB enzyme number คือ EC 3.2 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม 3 คือกลุ่ม hydrolase โดยจะสลายพันธะ glycosidic (NC-IUBMB, 2011) จากการเปรียบเทียบของลำดับอะมิโนถึงตำแหน่ง catalytic domain สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ family 18 ที่ catalytic domain เป็น $(\beta/\alpha)_8$ ซึ่งพบในสิ่งมีชีวิตพวก eukaryote, prokaryote และ ไวรัส ส่วน family 19 ที่ catalytic domain เป็น $(\alpha\text{-helical})_{10}$ และ $(\beta\text{-sheet})_3$ ซึ่งพบในพืช และในเชื้อแบคทีเรีย *Streptomyces griseus* โดยเอนไซม์ไคติเนสยังสามารถจำแนกตามระบบของเอนไซม์ออกได้เป็น endo-chitinases (EC 3.2.1.1.4) ซึ่งจะตัดสายยาวของไคตินเป็นแบบสุ่มได้ N-acetyl glucosamine มวลโมเลกุลต่ำ exo-chitinase (EC 3.2.1.14) จะตัดสายไคตินได้ diacetylchitobiose ในขณะที่ βN-acetyl hexosaminidase (EC 3.2.1.52) จะตัดสายของ diacetylchitobiose, chitotriose และ chitotetraose ที่ได้จากการตัดสายไคตินจาก exo-chitinase และ endo-chitinase ก่อนหน้านั้นให้ได้เป็น N-acetyl glucosamine สำหรับ chitobiase (EC 3.2.1.30) จะตัดสายของ diacetylchitobiose โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อราจะอยู่ในกลุ่มของ family 18 ซึ่งประกอบด้วย 5 โดเมน หรือ 5 ส่วน คือ N-terminal signal peptide region, catalytic domain, serine/theronine-rich region, chitin-binding domain และ C-terminal extension region

เชื้อราส่วนใหญ่มักจะขาด 3 โดเมน คือ serine/theronine-rich region, chitin-binding domain และ C-terminal extension region แต่เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้อยู่โดยสลาย GlcNAc-GlcNAc และ GlcNAc-GlcN lingkage ด้วยน้ำ นอกจากนี้แล้วเอนไซม์ในกลุ่มนี้ยังไวต่อตัวยับยั้งคือ allosamidin (Henrissat, 1999; Robertus and Monzingo, 1999; Duo-Chuan, 2006; Matsumoto, 2006; Saguez *et al.*, 2008)

2.4.1 กระบวนการย่อยไคติน

Howard *et al.* (2003) ได้อธิบายถึงกระบวนการย่อยไคตินของพวกแบคทีเรีย และราว่า polymer ของไคตินถูกย่อยโดยเอนไซม์ไคติเนส {EC 3.2.1.14, poly[1,4-(N-acetyl-β-D-glucosaminide] glycanohydrolase} ได้เป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc), chitobiose และ chtiooligosaccharide ซึ่ง chtiooligosaccharide จะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปในส่วนของ periplasm โดยอาจจะผ่านทาง specific outer membrane porin และจะถูกย่อยให้เป็น GlcNAc โดยเอนไซม์ chitodextrinase ในขณะที่ chitobiose จะเคลื่อนที่ผ่านเข้าไปใน periplasm โดยผ่านทาง non specific porins และถูกย่อยให้เป็น GlcNAc โดยเอนไซม์ N-acetylglucosaminidase จากส่วนของ periplasmic บางส่วนของ chitobiose จะผ่าน inner membrane เข้าไปใน cytoplasm และถูกย่อยด้วยเอนไซม์ N-acetylglucosaminidase ของ cytoplasmic ให้เป็น GlcNAc ส่วน GlcNAc ที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ไคติเนสก็จะผ่านส่วนของ outer membrane และ inner membrane เข้าไปจนถึง cytoplasm ซึ่งเป็นบริเวณสุดท้ายที่สิ่งมีชีวิตมีการเผาผลาญสารประกอบเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิต (ภาพ 5)



ภาพ 5 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายไคติน (Howard *et al.*, 2003)

วิธีการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบื้องต้นของเชื้อราบนอาหารแข็งที่พบในการทดลองของ Maketon *et al.* (2008) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมไร *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) ที่พบบนต้นหม่อนโดยการใช้เชื้อราจากดินจำนวน 88 ตัวอย่าง ซากเพลี้ยจำนวน 75 ตัวอย่าง ซากปลวกจำนวน 220 ตัวอย่าง และซากมวนจำนวน 86 ตัวอย่าง โดยนำเชื้อรามาคัดเลือกเบื้องต้นจากการงอกของโคนิเดียเชื้อราในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ sabouraud dextrose agar with yeast (SDAY) หรือ semi-syntheic media ที่มีไรอาศัยอยู่ และนำไปทดสอบกับไรในระยะตัวอ่อน และตัวเต็มวัย เพื่อหาค่า LC_{50} ด้วยความเข้มข้น 2×10^{6}-2×10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร และค่า LT_{50} ที่ความเข้มข้น 2×10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำเชื้อราไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และไคติเนส ในอาหารแข็งโดยการวัดอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนี และอาหารเหลวโดยวัดกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท CKM-048 มีประสิทธิภาพในการควบคุมไรดีที่สุดโดยมีค่า LC_{50} อยู่ในช่วง 8.71×10^{6}-1.32×10^{7} โคนิเดีย/มิลลิลิตร และมีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 2.36-3.82 วัน เมื่อทดสอบเบื้องต้นบนอาหารแข็ง พบว่าเชื้อรามีอัตราส่วนระหว่างขนาด clear zone ของเอนไซม์โปรติเอส และขนาดโคโลนีของเชื้อรา เท่ากับ 1.36 และมีอัตราส่วนระหว่างขนาด clear zone ของเอนไซม์ไคติเนส และขนาดโคโลนีของเชื้อรา เท่ากับ 1.09 แสดงให้เห็นว่าเชื้อราไอโซเลทนี้สามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดได้ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 0.0475 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดในวันที่ 7 เท่ากับ 0.1056 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับการวัดอัตราส่วนในวิธีการของ Nopparat *et al.* (2007) ได้นำเชื้อราในดินจำนวน 145 ไอโซเลท จากจังหวัดกาญจนบุรีมาคัดเลือกโดยใช้อัตราส่วนสูงสุดระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนี และความสามารถในการย่อยฟอสเฟตในอาหารเหลว โดยนำเชื้อราทั้งหมดมาทดสอบบนอาหารแข็ง pikrovskaya agar ที่เติม rose bengal ความเข้มข้น 0.003 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตส (phosphatese) พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อราที่มีอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีสูงสุด ได้จำนวน 30 ไอโซเลท โดยวิธี z test เพื่อนำไปทดสอบในอาหารเหลวในการคัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ฟอสฟาเตสสูงสุด พบว่ามีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ SA07P3332, SA22P3406, SA14P2418 และ SA19P2120

ในขณะที่วิธีการวัดอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีในเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นวิธีที่พบมากในการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย เช่นการทดลองของ Sridevi and Mallaiah (2008) ได้ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* จำนวน 26 ไอโซเลท จากปมรากของ *Sesbania sesban* โดยวัดขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีของ

เชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบบนอาหารแข็ง (chitin agar) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อแสดงเป็นอัตราส่วน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ในอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ ทุก ๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Rhizobium* ไอโซเลท strain 1 มีอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีสูงสุด คือ 2.25 และมีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด คือ 1.10 ยูนิต/มิลลิลิตร เช่นเดียวกับ Hatami *et al.* (2008) ได้ศึกษาความสามารถในการย่อยเซลลูโลส (cellulose) ของเชื้อแบคทีเรียจากดินที่อยู่ในป่า จำนวน 15 ตัวอย่าง และในแปลงเกษตรกรรม จำนวน 15 ตัวอย่าง บนอาหารแข็งที่มี carboxy metyl cellulose เป็นองค์ประกอบ โดยวัดขนาดของ clear zone ของแบคทีเรียหลังจากหยด hexa decyl trimetyl anonium bromide ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปแล้ว 20 นาที และวัดขนาดของโคโลนี พบว่าค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี ในตัวอย่างดินที่ได้จากแปลงเกษตรกรรมเท่ากับ 2.10 และตัวอย่างดินที่ได้จากป่า เท่ากับ 1.60 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียในดินที่ได้จากแปลงเกษตรกรรมมีความสามารถในการย่อยเซลลูโลสดีกว่าเชื้อแบคทีเรียในดินที่ได้จากป่า

Fang *et al.* (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) โดยนำยีนไคติเนส *Bbchit1* จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bb0062 มาเชื่อมต่อกับ promoter จากเชื้อรา *Aspergillus nidulans* ได้ยีนใหม่ คือ *gpd-Bbchit1* ซึ่งมีการผลิตไคติเนสได้มากขึ้นกว่าเดิม จากนั้นจึงนำกลับเข้าไปใส่ในจีโนมของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bb0062 ตามเดิม พบว่าเมื่อนำไปพ่นทดสอบกับเพลี้ยอ่อน เปรียบเทียบกับเชื้อราที่ไม่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรม (*B. bassiana* ไอโซเลท Bb0062) สามารถลดค่า LC_{50} และค่า LT_{50} ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การใช้น้ำกรองที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท M408 ในอาหารเหลวที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบมาศึกษาการเจริญเติบโต และกระบวนเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหนอนใยผักด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ของเอนไซม์ไคติเนส คือ 600, 400, 200, 100 และ 50 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ที่เคลือบบนใบคะน้า พบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ความเข้มข้น 600 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร สามารถลดกิจกรรมการกินอาหาร และทำให้หนอนใยผักมีอัตราการตายสูงสุด 67.89 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักลดลง 75 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งลดปริมาณไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังลำตัวหนอน 69 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นน้ำกลั่น (Wu *et al.*, 2010) ในขณะที่ Wiwat *et al.* (2000) ได้ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเบื้องต้นบนอาหารแข็งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* จำนวน 150 ไอโซเลท เพื่อใช้ควบคุมหนอนใยผัก พบว่ามีจำนวน 14 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็งที่มีไคตินเป็นองค์ประกอบ เมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวที่มี colloidal chitin ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* ไอโซเลท HD-1 (G) มีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด คือ

19 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียในไอโซเลทที่มีกิจกรรมสูงสุด (HD-1 (G)) และเชื้อแบคทีเรียในไอโซเลทที่ไม่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส (wa-p-2) มาเปรียบเทียบค่า LC_{50} พบว่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 4.93×10^{4} และ 1.32×10^{5} สปอร์/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท HD-1 (G) ยังทำให้ส่วนของ epithelial cell ในหนอนใยผักมีลักษณะเปลี่ยนไปคือ ยืดยาว และบวม เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

2.5 เอนไซม์โปรติเอส (Protease enzyme)

โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโน ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ในสาย polypeptide สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ endopeptidase ซึ่งแยกพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนที่เกิดจากการรวมตัวของสาย polypeptide และ exopeptidase ซึ่งจะแยกเฉพาะที่ส่วนปลายสุดของกรดอะมิโน หรือทำการย่อย oligopeptides ขนาดเล็ก (Rovensky *et al.*, 2009) จำแนกตามระบบ NC-IUBMB enzyme number คือ EC 3.4 ซึ่งอยู่ในกลุ่ม 3 คือกลุ่ม hydrolase โดยจะสลายพันธะเปบไทด์ (NC-IUBMB, 2011) สามารถพบได้ทั่วไปในพืช สัตว์ และเชื้อจุลินทรีย์ (Nirmal *et al.*, 2011) จากความแตกต่างของ active site และรูปแบบของการทำงานเอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 8 กลุ่ม คือ asparagine protease, aspartic protease, cysteine protease, glutamic protease, metallo protease, serine protease, threonine protease และ unknown โดยเอนไซม์กลุ่ม serine protease เป็นกลุ่มที่ใหญ่ และถูกนำมาศึกษามากที่สุด (Yike, 2011) โดยในกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงมีการศึกษาเอนไซม์ subtilisin-like (Pr1) และ trypsin-like (Pr2) มากที่สุด ซึ่งอยู่ในกลุ่ม serine protease (St. Leger *et al.*, 1987a; Cole *et al.*, 1993; St. Leger, 1995)

Dias *et al.* (2008) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease คือ Pr1 และ Pr2 ในเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท CG425 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมมอดเจาะผลกาแฟ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากที่ pH 5.5 หรือมากกว่า เมื่อมี cuticle ของมอดเจาะผลกาแฟเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ Mohanty *et al.* (2008) รายงานว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอส Pr1 จากเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท 892 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีตัวชักนำ (inducer) ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ Pr1 และ Pr2 คือ cuticle ของแมลง 3 ชนิด คือ *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* และ *Culex quinquefasciatus* นอกจากนี้ยังมี gelatin casein, peptone และ BSA มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายของยุง เมื่อนำเชื้อราความเข้มข้น 3.48×10^{3} โคนิเดีย/มิลลิลิตร มาทดสอบแล้วทำให้ยุงมีอัตราการตายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2008) พบว่าเมื่อนำเฉพาะเอนไซม์โปรติเอส Pr1 ที่ได้จากวิธีการ recombinant DNA ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาผสมกับเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท Bb0062 ฉีดพ่นบนเพลี้ยอ่อน

Myzus persicae สามารถเพิ่มความรุนแรงในการควบคุม โดยค่า LC_{50} ลดลง 1.5-2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นเชื้อรา *B. bassiana* เพียงอย่างเดียว และยังพบอีกว่าหากนำเฉพาะเอนไซม์โปรติเอส Pr1 มาฉีดพ่นแมลงกลับไม่มีความแตกต่างของอัตราการตายกับชุดควบคุมซึ่งเป็นน้ำกลั่น ในขณะที่ Castellanos-Moguel *et al.* (2007) ได้นำเอนไซม์โปรติเอส Pr1 และ Pr2 ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อรา *Paecilomyces fumosoroseus* ในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยซูโครส กลูโครส peptone และ yeast extract (SGPYE) จำนวน 3 ไอโซเลท คือ EH-506/3, EH-503/3 และ EH-502/3 มาทดสอบกับตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวระยะที่ 2 *Trialeurodes vaporariorum* โดยใช้ความเข้มข้นของเชื้อราที่ 4.7×10^{2}-4.7×10^{6} โคนิเดีย/มิลลิลิตร และนำใบถั่วแขก *Phaseolus vulgaris* ที่มีตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวมาทำการกำหนดจุดบริเวณที่ตัวอ่อนแมลงหวี่ขาวระยะที่ 2 ปรากฏด้วยปากกา จากนั้นนำใบถั่วแขกด้านที่มีแมลงหวี่ขาวไปลอยอยู่บนสารแขวนลอยของโคนิเดียเชื้อราแล้วย้ายไปวางบนอาหารแข็ง Knop's agar ทิ้งไว้ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าไอโซเลท EH-506/3 มีประสิทธิภาพในการควบคุมดีที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.1×10^{3} โคนิเดีย/มิลลิลิตร และมีกิจกรรมของเอนไซม์ Pr1 มากที่สุด ที่ 120 ชั่วโมง เท่ากับ 745.7 ยูนิตPr1/มิลลิลิตร ซึ่งเหมาะสำหรับนำไปเป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมเกี่ยวกับความรุนแรงของเชื้อรา *P. fumosoroseus* ซึ่งไม่สอดคล้องกับงานทดลองของ Gillespie *et al.* (1998) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์โปรติเอส Pr1 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของเอนไซม์ Pr1 และระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (LT_{50}) โดยทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส Pr1 ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 19 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบ cuticle จากตัวอย่างแมลง คือดักแด้ของ tobacco hornworm (*Manduca sexta*) ปีก และส่วนท้องของตั๊กแตนตัวเต็มวัย *Schistocerca gregaria* และหาค่า LT_{50} ในการเข้าควบคุมตั๊กแตน *S. gregaria* แล้ววิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสอง นอกจากนี้ยังพบว่า Pr1 มีความจำเพาะเจาะจงกับตัวอาศัยอีกด้วย

2.6 การควบคุมหนอนใยผัก และการศึกษาความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงกับกิจกรรมของเอนไซม์

Loc and Chi (2007) ได้ศึกษาหาประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* และเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท *M.a* (OM1-R), *M.a* (OM3-STO), *B.b* (VL1-SCL) และ *B.b* (OM2-SDO) โดยฉีดพ่นเชื้อราที่มีความเข้มข้น 10^{7} โคนิเดีย/มิลลิลิตร กับหนอนใยผักวัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ ห้องเรือนกระจก และในแปลงกะหล่ำดอก พบว่าไอโซเลท *M.a* (OM3-STO) ซึ่งเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* ทำให้เกิดอัตราการตายสูงที่สุด ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับ Crymax® 35WP ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus thuringinesis* var. *kurstaki* และ Atabron 5 EC ซึ่งมีสารออกฤทธิ์คือ

chlorfluazuron และอยู่ในกลุ่มของ insect growth regulator ที่ใช้เป็นการค้า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* มีประสิทธิภาพดีกว่าในการควบคุมหนอนใยผัก โดย Jun (2000) ได้ศึกษาหาประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* และ *Nomuraea rileyi* ไอโซเลท FI63, FI1248, FI1186, FI985, FI1037 และ FI610 กับหนอนใยผักวัย 2-3 ในสภาพห้องปฏิบัติการโดยการทาเชื้อราที่มีความเข้มข้น 10^8 ลงบนใบคะน้าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตรทั้งสองด้านเพื่อทำการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถทำให้เกิดอัตราการตายมากที่สุด พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลท FI1248 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักโดยทำให้เกิดอัตราการตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าไอโซเลทอื่น ๆ โดยในวันที่ 9 ด้วยความเข้มข้น 10^2-10^7 โคนิเดีย/มิลลิลิตร มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.03×10^5 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 10^5, 10^6 และ10^7 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 4.97-7.81 วัน แต่ในบางสถานที่ ที่มีการศึกษาประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักโดยใช้เชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ Bba5644, Bba5645, Bba5653, Bba5654, Bba5655 และ Bba14 และเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Ma178 และ Ma 182 กับหนอนใยผักวัย 3 ด้วยการจุ่มหนอนลงในสารแขวนลอยโคนิเดียความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พบว่าเชื้อรา *B. bassiana* มีประสิทธิภาพในการควบคุมดีกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* โดยมีอัตราการตาย ซึ่งเป็นค่ากลางอยู่ที่ 69 เปอร์เซ็นต์ และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Godonou *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของนักวิชาการหลาย ๆ ท่านเกี่ยวกับระยะเวลาที่ทำให้แมลงตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ (LT_{50}) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ด้วยความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร โดยแสดงผลในตาราง 3

ตาราง 3 การหาค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ด้วยความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

ลำดับ	ค่า LT_{50} (วัน)	
	Metarhizium	***Beauveria***
1	4.97[2*]	1.3-3.6[1]
2	0.7-1.4[3]	1.1-1.21[3]
3	-	1.57-4.50[4]
เฉลี่ย	0.7-1.4	1.32-3.10

[1] Yoon *et al.*, 1999

[2] Jun, 2000; * ความเข้มข้น 1×10^7 โคนิเดีย/มิลลิลิตร

[3] Silva *et al.*, 2003

[4] Lihong *et al.*, 2009

Sassá *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส และความรุนแรงของเชื้อรา โดยหาอัตราการตายของมอดเจาะผลกาแฟ *Hypothenemus hampei* จากการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลง *B. bassiana* ความเข้มข้น 2.5×10^7 จำนวน 30 ไอโซเลท มาควบคุม และวัดกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสทุกไอโซเลท พบว่าอัตราการตายอยู่ในช่วง 3.33-83.33 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส ซึ่งอยู่ในช่วง 0-1,510.835 ยูนิต/มิลลิลิตร สอดคล้องกับ สืบศักดิ์ (2539) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่สามารถทำลายไข่ไส้เดือนฝอยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอยได้ 66.6 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่สามารถทำลายไข่ไส้เดือนฝอย พบว่าอาจไม่มีความสัมพันธ์กันแต่น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเข้าไปในไข่ได้ เนื่องจากผนังไข่ไส้เดือนฝอยมีไคตินเป็นองค์ประกอบ ในขณะที่ Gupta *et al.* (1994) ได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตาย ค่า LT_{50} และกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 5 ไอโซเลท โดยจุ่มหนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง *Galleria mellonella* และหนอนคืบกะหล่ำ *Trichoplusia ni* ในสารแขวนลอยของเชื้อราที่ความเข้มข้น 6×10^7 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ endochitinase, chymoelastase, chymotrypsin, esterase และ N-acetyl glucodaminidase พบว่าในการศึกษาส่วนของเอนไซม์ endochitinase นั้นมีความสัมพันธ์กัน

การทดลองด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) ของ Fang *et al.* (2009) ในการควบคุมหนอนกินไขผึ้ง *G. mellonella* ด้วยการตัดต่อยีนของเอนไซม์โปรติเอส Pr1 รวมกับยีนเอนไซม์ไคติเนส *Bbchit1* (CDEP1:Bbchit1) เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์โปรติเอส Pr1 (CDEP1) และเอนไซม์ไคติเนส *Bbchit1* (Bbchit1) เพียงอย่างเดียว ซึ่งทั้งหมดถูกควบคุมโดย promoter ที่ได้จากเชื้อรา *Aspergillus nidulans* โดยมีชุดควบคุมเป็นเชื้อรา *B. bassiana* ที่ไม่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรม แสดงให้เห็นว่า CDEP1:Bbchit1 สามารถลดค่า LT_{50} ได้ 24.9 เปอร์เซ็นต์ และค่า LC_{50} ได้ 60.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ CDEP1 สามารถลดค่า LT_{50} ได้ 12.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถลดค่า LC_{50} ได้ ส่วน Bbchit1 สามารถลดค่า LC_{50} ได้ 28.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสังเกตในการทดลองของ St. Leger *et al.* (1996) ว่าเอนไซม์ไคติเนสจะผลิตออกมาในปริมาณที่ต่ำมากขณะที่เริ่มแทงทะลุผ่าน cuticle และจะมีปริมาณเอนไซม์มากขึ้นเมื่อมีเอนไซม์โปรติเอสเกิดขึ้นในกระบวนการ เช่นเดียวกับงานทดลองของ St. Leger *et al.* (1987b) ที่ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ที่ย่อย cuticle ของแมลงวัน *Calliphora vomitoria* และ tobacco horn worm (*Manduca sexta*) จากเชื้อรา *M. anisopliae* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส Pr1, Pr2, esterase, aminopeptidase

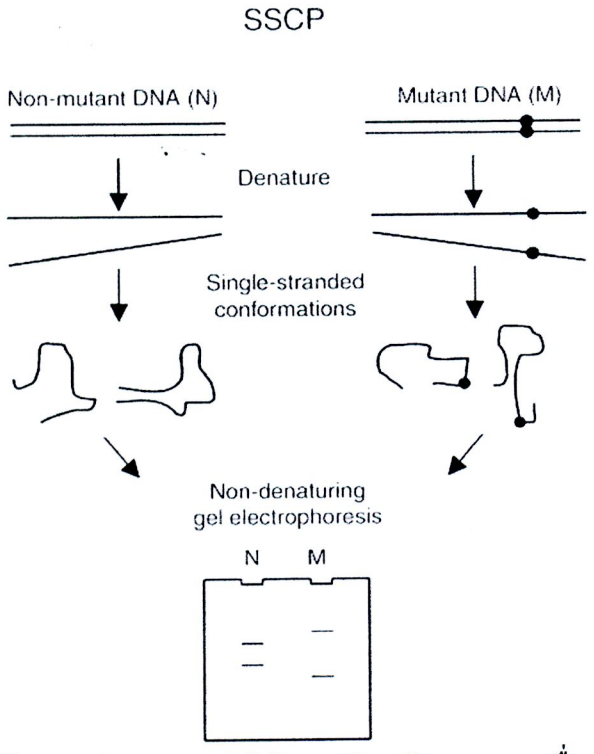
และ N-acetylglucosaminidase (exochitinase) เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแทงเส้นใยเชื้อราผ่าน cuticle ของแมลงโดยเอนไซม์โปรติเอสจะผลิตก่อนเอนไซม์ไคติเนส

2.7 เทคนิคเอสเอสซีพี (SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism)

เอสเอสซีพีเป็นเทคนิคที่ง่ายที่สุดในการช่วยตรวจสอบเพื่อหาจุด หรือบริเวณเล็ก ๆ ที่เกิดการเปลี่ยนแปลง เช่นการแทนที่ การถูกลบ การแทรก หรือการสลับที่ของลำดับเบส โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ที่เปลี่ยนแปลงของโครงสร้าง gDNA (genomic DNA) หรือ cDNA (complementary DNA) สายเดี่ยว (single-stranded) บนตัวกลาง คือโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis) (ภาพ 6) ที่อุณหภูมิประมาณ 5 องศาเซลเซียส การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคนี้มีข้อจำกัด คือควรใช้ดีเอ็นเอที่มีความยาวขนาดน้อยกว่า 300 คู่เบส ดังนั้นจึงใช้ร่วมกับวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง คือ ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR) เรียกว่า PCR-SSCP เป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็ว ง่าย และมีราคาถูก โดยจะตรวจสอบความผันแปรของชิ้นดีเอ็นเอในช่วง หรือบริเวณที่ต้องการซึ่งใช้ไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดขอบเขตของชิ้นดีเอ็นเอนั้น ประสิทธิภาพการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของลำดับชิ้นดีเอ็นเอ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ รวมทั้งปริมาณของ GC ที่ประกอบในชิ้นดีเอ็นเอ อุณหภูมิของเจล ส่วนประกอบของเจลส่วน ประกอบของบัฟเฟอร์ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (Hayashi, 1991; Vorechovsky, 2005)

Kuo *et al.* (2005) ได้ศึกษาหาจุดกลายพันธุ์ (SNPs) โดยเทคนิค PCR-SSCP บนยีน internal spacer 2 (ITS2) ในกลุ่มของเชื้อราสกุล *Cordyceps* จำนวน 7 ไอโซเลท ที่ใช้เป็นอาหาร และยารักษาโรคในเอเชีย คือ BCC1386, ARSEF4870, ARSEF5689, CCRC36421, BCC1519, CCRC32221 และ BCC1443 เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อราที่ใช้เป็นยารักษาโรค พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 5 ใน 7 ไอโซเลท ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ 5.8SR และ ITS4 ซึ่งมีขนาด 334 คู่เบส และ 400 คู่เบส ตามลำดับ อาจจะมีศักยภาพนำไปใช้ตรวจสอบจุดกลายพันธุ์ และจำแนกชนิดของเชื้อรา เช่นเดียวกับ Hegedus and Khachatourians (1995) ได้พัฒนาเทคนิคการจำแนกชนิด และความแตกต่างของเชื้อรา *Beauveria* spp. จากตั๊กแตน *Melanoplus sanguinipes* จำนวน 37 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค PCR-SSCP และไพรเมอร์ทั้งหมด 3 คู่ คือ P1-P3, P1-P5 และ P1-P6 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ P1-P3 เมื่อถูกนำมาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Alu*I, *Hae*III และ *Taq*I เกิดความผันแปรของยีนจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ P1-P3 มาตรวจสอบจุดกลายพันธ์ด้วย

เทคนิค SSCP ปรากฏว่าสามารถนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Beauveria* spp. และตรวจสอบความแตกต่างได้ชัดเจนเฉพาะในเชื้อรา *B. bassiana* เท่านั้น



ภาพ 6 หลักการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอสายเดี่ยวบน non-denaturing gel electrophoresis (Gasser *et al.*, 2007)