

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. ที่นำมาจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และสถาบันวิจัยและฝึกอบรม การเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ทั้งหมดจำนวน 58 ไอโซเลท สามารถที่จะทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่เหมาะสมได้จำนวน 41 ไอโซเลท โดยปรากฏแต่เส้นใยของเชื้อราซึ่งไม่สามารถสร้างโคนิเดียได้ และสามารถเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการทดสอบกับแมลงได้จำนวน 25 ไอโซเลท (ตาราง 6) โดยสามารถสร้างโคนิเดียบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในปริมาณที่มากพอสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมหนอนใยผัก

ตาราง 6 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในสภาพห้องปฏิบัติการ

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของอาหาร	อุณหภูมิ (°C)
1	Bb1	BCC14532	PDA	30
2	Bb2	BCC14841	PDA	25
3	Bb3	BCC16041	PDA	30
4	Bb4	BCC17599	PDA	25
5	Bb5	BCC18058	PDA	30
6	Bb10	BCC18059	MA	30
7	Bb13	BCC19012	PDA	30
8	Bb17	BCC22355	PDA	25
9	Bb18	BCC25950	PDA	30
10	Bb20	Bb.2637	PDA	25
11	Bb21	Bb.4591	PDA	30
12	Bb23	Bb.5335	PDA	25
13	Bb25	Bb.6241	PDA	30

ตาราง 6 (ต่อ)

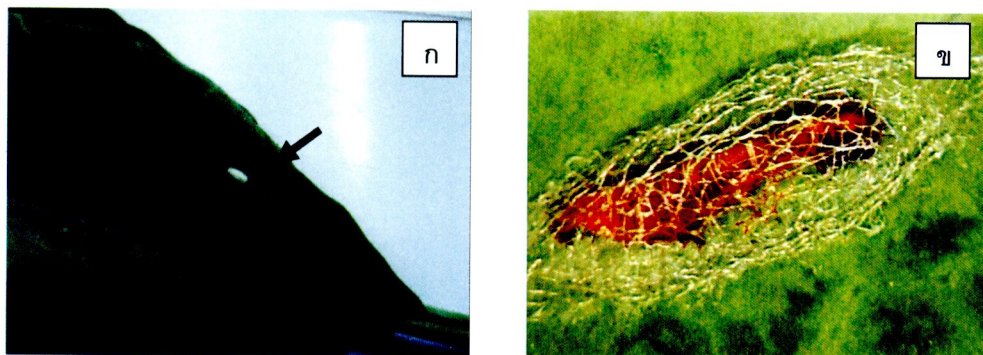
ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ชนิดของอาหาร	อุณหภูมิ (°C)
14	Bb28	B.7683	PDA	30
15	Ma2	BCC1399	PDA	25
16	Ma7	BCC1701	PDA	25
17	Ma9	BCC1707	PDA	25
18	Ma12	BCC1858	PDA	25
19	Ma16	BCC4810	PDA	30
20	Ma17	BCC4849	PDA	30
21	Ma19	BCC5797	MA	30
22	Ma22	BCC12636	PDA	30
23	Ma28	BCC22353	PDA	25
24	Ma29	M.6079	MA	30
25	Ma30	M.7965	MA	30

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อสาเหตุโรคแมลง

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. ในการกำจัดหนอนใยผัก

4.2.1 การเลี้ยง และเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก

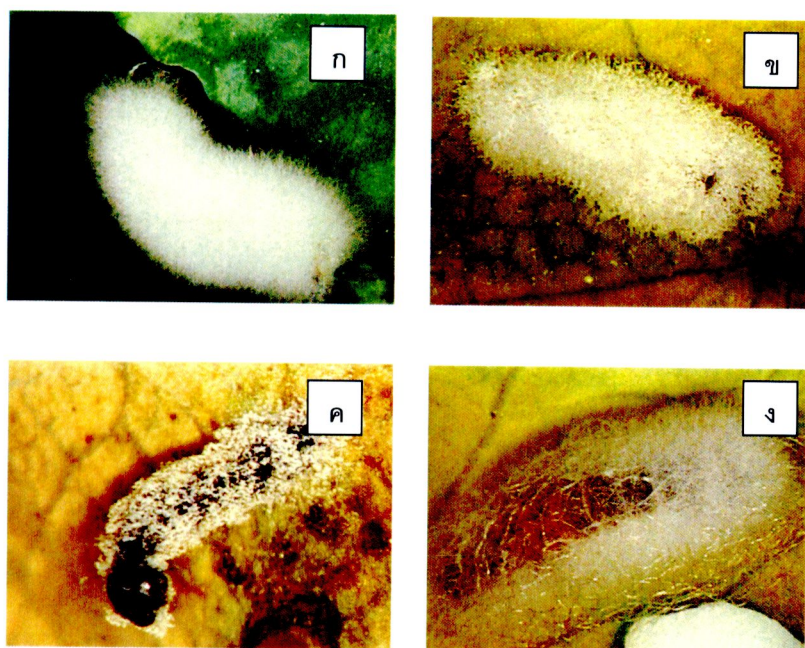
หนอนใยผักที่ใช้ในการศึกษาเก็บตัวอย่างจากแปลงเกษตรกรในเขต ต.สันผีเสื้อ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ ต.หนองหอยใหม่ อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ ซึ่งเป็นแหล่งในการเพาะปลูกผักตระกูลกะหล่ำ พบว่าบางแหล่งหนอนใยผักถูกแตนเบียนในธรรมชาติ เข้าทำลาย และเกิดติดเชื้อไวรัสบ้าง (ภาพ 11) ส่งผลให้ปริมาณแมลงฟ่อและแม่พันธุ์ลดลง แก้ไขปัญหานี้โดยการเก็บตัวอย่างหนอนใยผักเพิ่มเติม และคัดแยกแมลงโดยเลือกเฉพาะตัวที่แข็งแรง นำมาเลี้ยงเพิ่มปริมาณ



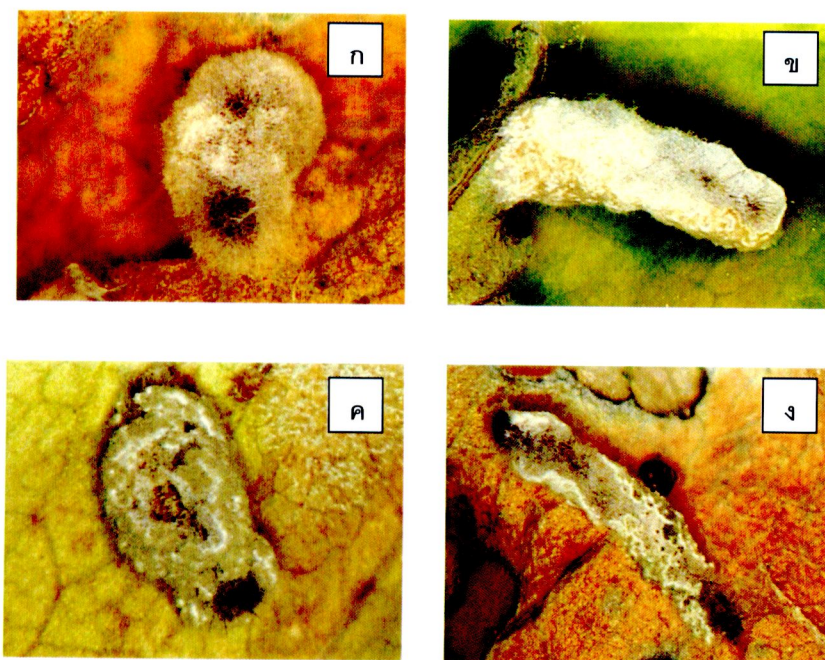
ภาพ 11 ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ในสภาพห้องปฏิบัติการ (ก) แตนเบียนเข้าทำลายหนอนใยผัก (ข) ลักษณะของหนอนใยผักที่ติดเชื้อไวรัสขณะเข้าดักแด้

4.2.2 การทดสอบเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนใยผัก

ในการทดสอบส่วนที่ 1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. จำนวน 25 ไอโซเลต (ตาราง 6) ถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ในสภาพอุณหภูมิห้อง (ภาพ 12, 13) พบว่าเชื้อรา *Beauveria* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 32.29-73.26 ชั่วโมง และเชื้อรา *Metarhizium* spp. มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-144.74 ชั่วโมง เมื่อนำประสิทธิภาพของเชื้อรามาพิจารณาในการคัดเลือกสามารถแบ่งกลุ่มของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 2 สกุล ออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) โดยเชื้อรากลุ่ม high efficacy มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-34.98 ชั่วโมง มีจำนวน 5 ไอโซเลต คือ BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 และ BCC4849 ในขณะที่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) โดยเชื้อรากลุ่ม low efficacy มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 73.26-144.74 ชั่วโมง มีจำนวน 5 ไอโซเลต คือ BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 และ BCC22353 (ตาราง 7)



ภาพ 12 ลักษณะของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ที่พบเชื้อราสกุล *Beauveria* เข้าทำลาย
(ก) ลักษณะเส้นใยที่ปกคลุมลำตัว (ข-ค) เส้นใยเชื้อราที่มีการสร้างโคนิเดียปกคลุมลำตัว
(ง) เส้นใยของเชื้อราขึ้นปกคลุมลำตัวหนอนใยผักในระยะเข้าดักแด้



ภาพ 13 ลักษณะของหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ที่พบเชื้อราสกุล *Metarhizium* เข้าทำลาย
(ก-ข) ลักษณะของเส้นใยเชื้อราที่กำลังเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเขียวย่น (ค-ง) ลักษณะของ
เส้นใยเชื้อราที่กำลังสร้างโคนิเดียปกคลุมลำตัวหนอนใยผัก

ตาราง 7 ค่า LT_{50} ในการทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25.2 ± 2.4 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 23.07 ± 0.3 % RH (ภาคผนวก จ)

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	LT_{50} (ชั่วโมง) $\pm$ SE ¹	ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95%	ระดับของประสิทธิภาพ
1	Ma2	BCC1399	41.03 ± 11.02^{ab2}	19.65-60.30	Medium
2	Ma7	BCC1701	52.05 ± 4.02^{ab}	28.42-71.15	Medium
3	Ma9	BCC1707	112.63 ± 25.62^{cdc}	87.65-176.87	Low
4	Ma12	BCC1858	86.69 ± 3.97^{bcd}	70.70-101.05	Low
5	Ma16	BCC4810	31.04 ± 0.87^a	19.65-41.43	High
6	Ma17	BCC4849	26.28 ± 2.28^a	7.09-40.25	High
7	Ma19	BCC5797	62.80 ± 16.36^{abc}	37.93-94.21	Medium
8	Ma22	BCC12636	117.33 ± 14.18^{dc}	89.11-185.28	Low
9	Bb1	BCC14532	57.31 ± 14.66^{ab}	37.89-73.83	Medium
10	Bb2	BCC14841	73.26 ± 14.72^{abcd}	54.98-91.32	Low
11	Bb3	BCC16041	56.95 ± 2.57^{ab}	42.07-69.82	Medium
12	Bb4	BCC17599	34.98 ± 2.31^{ab}	17.80-48.60	High
13	Bb5	BCC18058	41.20 ± 8.47^{ab}	13.01-63.55	Medium
14	Bb10	BCC18059	49.50 ± 4.41^{ab}	32.91-63.51	Medium
15	Bb13	BCC19012	49.94 ± 18.91^{ab}	36.12-61.71	Medium
16	Ma28	BCC22353	144.74 ± 9.33^{abc}	55.66-240.70	Low
17	Bb17	BCC22355	62.46 ± 8.31^c	42.50-79.76	Medium
18	Bb18	BCC25950	38.21 ± 3.32^{ab}	26.27-49.51	Medium
19	Bb20	Bb.2637	33.18 ± 8.63^{ab}	11.73-49.58	High
20	Bb21	Bb.4591	64.15 ± 23.42^{abc}	27.62-56.03	Medium
21	Bb23	Bb.5335	32.29 ± 6.76^{ab}	16.43-45.02	High
22	Bb25	Bb.6241	38.24 ± 6.34^{ab}	24.47-50.19	Medium
23	Ma29	M.6079	71.00 ± 1.57^{abcd}	55.48-84.66	Medium
24	Bb28	B.7683	47.59 ± 19.62^{ab}	31.15-60.61	Medium
25	Ma30	M.7965	47.79 ± 7.09^{ab}	33.31-60.74	Medium
P value			0.000**		

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

ตาราง 8 อัตราการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) บนลำตัวหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25.2±2.4 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 23.07±0.3 % RH

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	การเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%)±SE ¹
1	Ma2	BCC1399	10.00±5.77 ^{abc2}
2	Ma7	BCC1701	20.00±10.00 ^{abcd}
3	Ma9	BCC1707	10.00±10.00 ^{abc}
4	Ma12	BCC1858	52.87±12.47 ^{abcd}
5	Ma16	BCC4810	6.67±3.33 ^{ab}
6	Ma17	BCC4849	23.33±8.82 ^{abcd}
7	Ma19	BCC5797	33.33±6.67 ^{abcd}
8	Ma22	BCC12636	4.17±4.17 ^{ab}
9	Bb1	BCC14532	45.00±10.41 ^{abcd}
10	Bb2	BCC14841	40.00±26.46 ^{abcd}
11	Bb3	BCC16041	66.67±6.67 ^d
12	Bb4	BCC17599	55.00±16.07 ^{abcd}
13	Bb5	BCC18058	43.33±17.64 ^{abcd}
14	Bb10	BCC18059	60.00±20.00 ^{cd}
15	Bb13	BCC19012	46.67±17.64 ^{abcd}
16	Ma28	BCC22353	3.33±3.33 ^a
17	Bb17	BCC22355	65.70±7.20 ^d
18	Bb18	BCC25950	48.53±9.35 ^{abcd}
19	Bb20	Bb.2637	16.67±12.02 ^{abcd}
20	Bb21	Bb.4591	27.77±4.00 ^{abcd}
21	Bb23	Bb.5335	56.67±6.67 ^{bcd}
22	Bb25	Bb.6241	16.67±6.67 ^{abcd}
23	Ma29	M.6079	17.03±2.97 ^{abcd}
24	Bb28	B.7683	64.30±13.77 ^d
25	Ma30	M.7965	27.03±11.77 ^{abcd}
P value			0.000**

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)

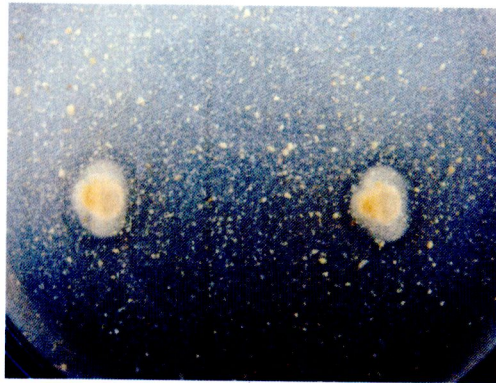
เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 25 ไอโซเลท ความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร นำมาฉีดพ่นลงบนหนอนไผ่ฝัก พบว่าการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราจำนวน 25 ไอโซเลท บนตัวหนอนไผ่ฝักอยู่ในช่วง 3.33-66.67 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อรา *Beauveria* spp. มีการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงอยู่ในช่วง 16.67-66.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อรา *Metarhizium* spp. มีการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงอยู่ในช่วง 3.33-52.87 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 8) นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ปรากฏบนตัวแมลงในวันที่ 3 หลังจากการฉีดพ่น และเส้นใยของเชื้อรา *Beauveria* spp. ปรากฏบนตัวแมลงในวันที่ 4-5 หลังจากการฉีดพ่น

ในการทดสอบส่วนที่ 2 เชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุด (high efficacy) และต่ำสุด (low efficacy) ของแต่ละสกุล (genus) ในสกุล *Beauveria* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ Bb.5335 และ BCC14841 และสกุล *Metarhizium* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ BCC4849 และ BCC22353 นำมาทดสอบกับหนอนไผ่ฝักวัย 2 เพื่อยืนยันผลในการคัดเลือกจากการทดสอบในส่วนที่ 1 และทดสอบความรุนแรงของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในแต่ละสกุล พบว่าเชื้อราที่อยู่ในกลุ่ม high efficacy ทั้ง 2 สกุล คือ ไอโซเลท Bb.5335 และ BCC22353 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 2.66×10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และ 3.11×10^5 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม low efficacy ทั้ง 2 สกุล คือ ไอโซเลท BCC14841 และ BCC22353 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 9.44×10^6 โคนิเดีย/มิลลิลิตร และ 2.88×10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาคผนวก จ)

4.3 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง

จากการนำเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผ่านการคัดเลือกประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงในการทดลองที่ 4.2.2 ส่วนที่ 1 ได้แก่กลุ่ม high efficacy จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4849 และ BCC4810 และกลุ่ม low efficacy จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 และ BCC22353 มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 14) โดยแสดงอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี พบว่ามีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 8 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้คือ BCC17599, Bb.5335, BCC1707, BCC1858, BCC4810, BCC4849, BCC12636 และ BCC22353 โดยเชื้อราไอโซเลท BCC17599 มีอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนีสูงที่สุดในวันแรกในขณะที่เชื้อราในสกุล *Beauveria* จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC14841 และ Bb.2637 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสได้บนอาหารแข็งโดยพบค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีเป็นศูนย์ เมื่อเปรียบเทียบกับ

อัตราส่วนของเชื้อราไอโซเลตต่าง ๆ ในวันอื่น แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกับเชื้อราไอโซเลต Bb.5335, BCC1858 และ BCC4849 (ตาราง 9)



ภาพ 14 ลักษณะของ clear zone ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต BCC4849 ที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของ colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity)

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเหลว EPM พบว่าเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสอยู่ในช่วง 6.58-181.05 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร โดยเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต Bb.5335 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุดคือ 181.05 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร ในวันที่ 11 ขณะที่เชื้อราในกลุ่ม low efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสอยู่ในช่วง 4.39-68.58 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต BCC1858 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุดคือ 68.58 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพ 15)

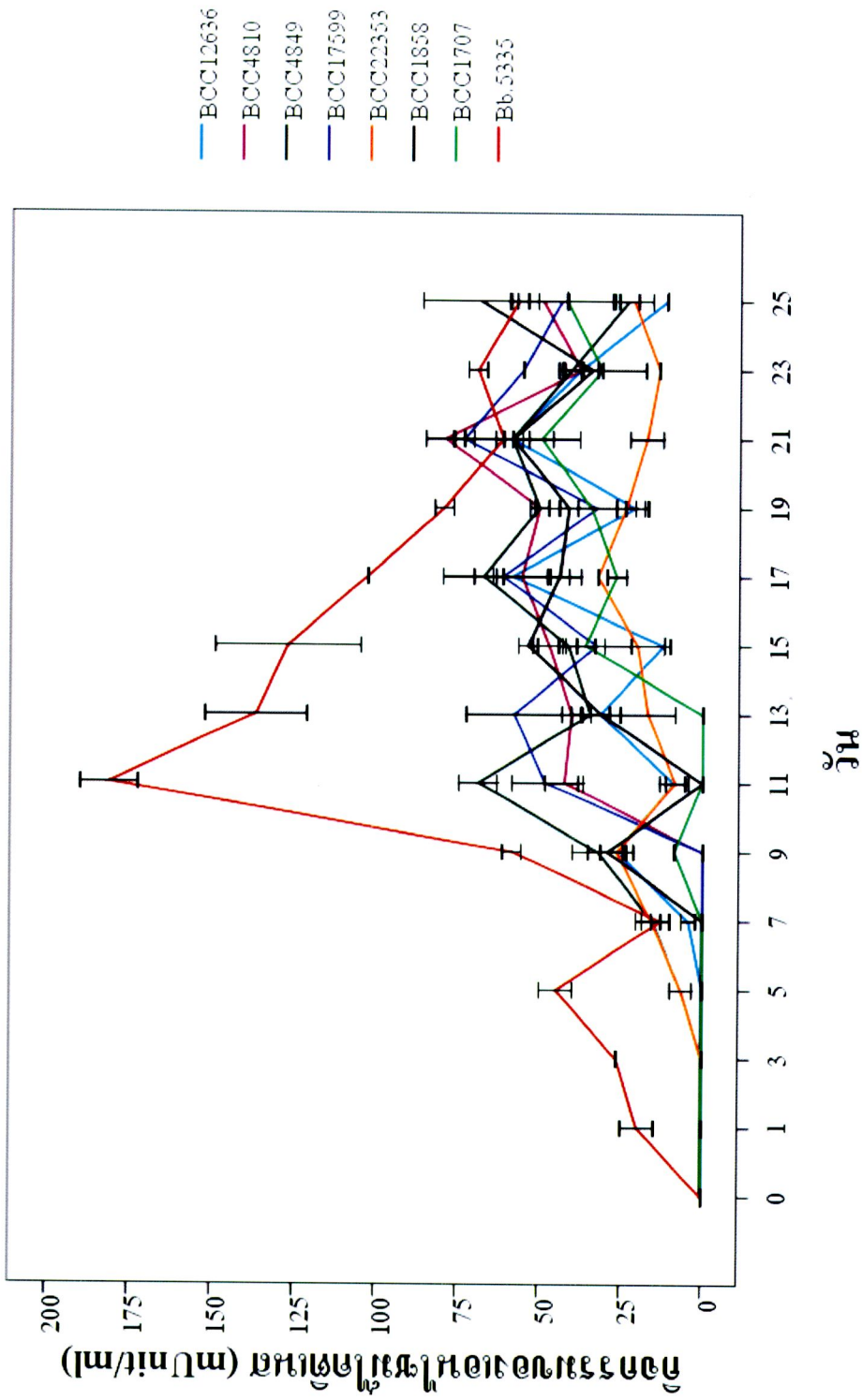
ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราทั้งกลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy เริ่มมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันที่ 1 และมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดอยู่ในช่วงวันที่ 9-10 โดยเชื้อราในกลุ่ม high efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในช่วง 50.24-55.24 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร โดยเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต BCC12636 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 55.24 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอยู่ในช่วง 54.41-57.93 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร โดยเชื้อรา *Beauveria* sp. ไอโซเลต BCC17599 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ 57.93 มิลลิยูนิต/มิลลิลิตร (ภาพ 16) นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสจะเกิดขึ้นหลังจากเอนไซม์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุดในวันที่ 9-10

ตาราง 9 อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคไลนินอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของ colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 7 วัน

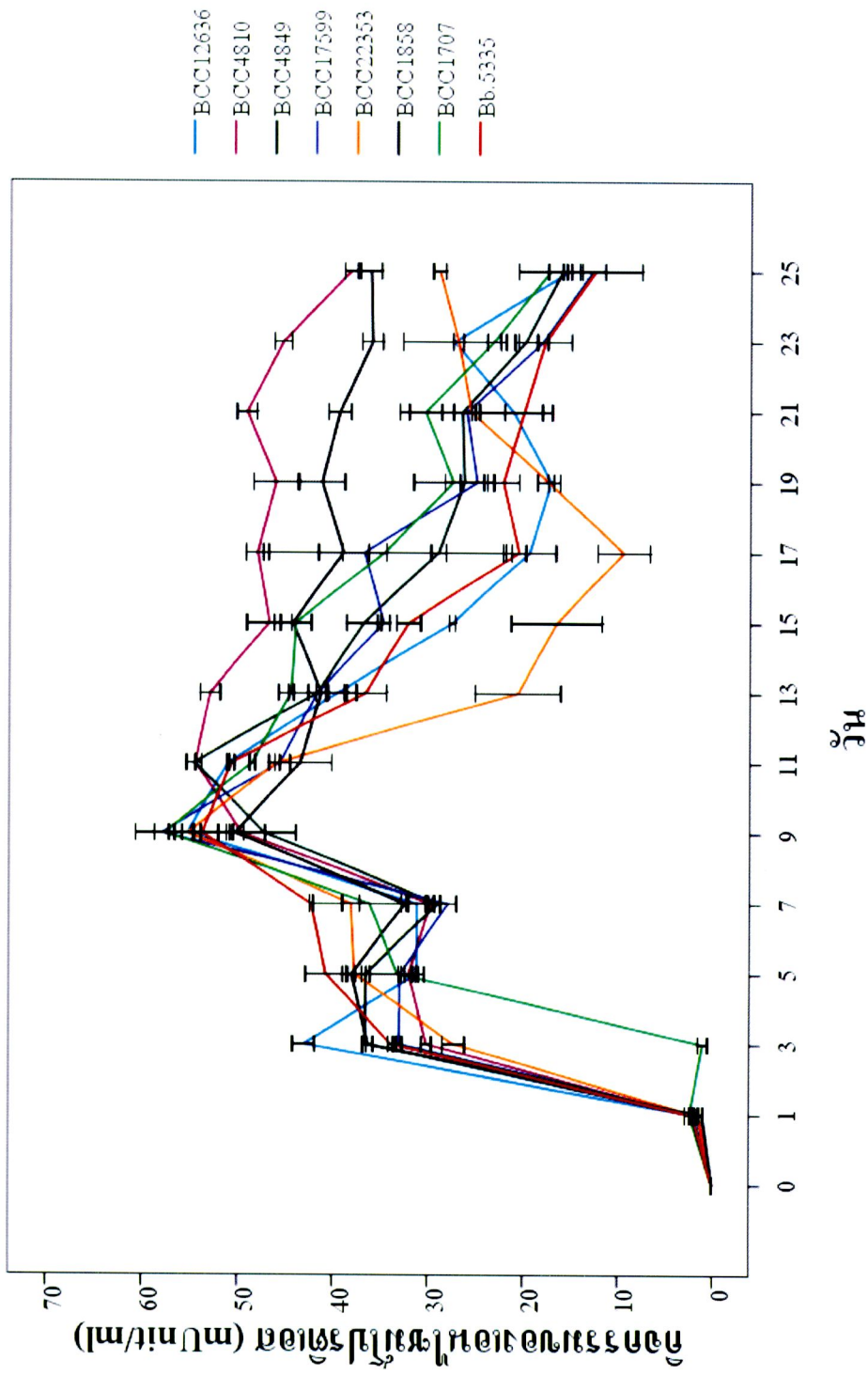
ลำดับ	รหัส	วัน ไฮโดรเลท	อัตราส่วน (mean±SE) ¹							ระดับของ ประสิทธิภาพ
			1	2	3	4	5	6	7	
1	Bb4	BCC17599	1.63±0.03 ^c	1.47±0.13 ^b	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	High
2	Bb20	Bb.2637	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	High
3	Bb23	Bb.5335	0.4±0.47 ^{ab}	1.39±0.08 ^b	1.25±0.24 ^c	1.24±0.03 ^c	1.26±0.06 ^c	1.13±0.03 ^b	1.23±0.03 ^c	High
4	Ma16	BCC4810	1.48±0.03 ^c	1.15±0.03 ^b	1.34±0.01 ^c	1.28±0.01 ^c	1.05±0.00 ^b	1.07±0.03 ^b	1.02±0.02 ^b	High
5	Ma17	BCC4849	1.36±0.12 ^{bc}	1.14±0.00 ^b	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	High
6	Bb2	BCC14841	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	Low
7	Ma9	BCC1707	0±0.00 ^{a2}	1.30±0.02 ^b	1.22±0.06 ^{bc}	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	Low
8	Ma12	BCC1858	1.30±0.10 ^{bc}	1.22±0.04 ^b	1.23±0.01 ^c	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	Low
9	Ma28	BCC22353	0±0.00 ^a	1.44±0.10 ^b	1.11±0.00 ^b	0±0.00 ^a	1.26±0.03 ^c	1.08±0.01 ^b	1.00±0.00 ^b	Low
10	Ma22	BCC12636	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	1.11±0.06 ^b	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	0±0.00 ^a	Low
P value			0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	

¹ อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone/ขนาดของโคไลนิน จากค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิธี Tukey, HSD



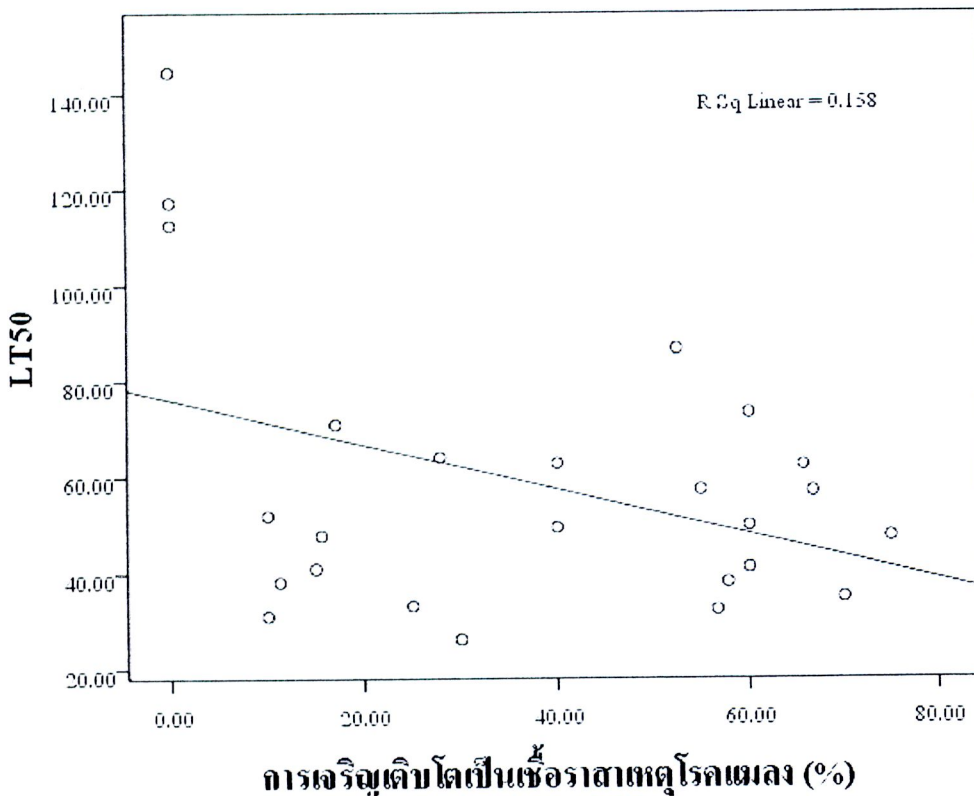
ภาพ 15 กิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้โอกาส 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพ 16 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสของเชื้อราสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* ในอาหารเหลว Enzyme Producing Medium (EPM) ทุก ๆ 2 วัน ให้
อากาศ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.5 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และค่า LT_{50} ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 ถึง 25 ไอโซเลท พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ค่า $r=0.397$ ($P<0.05$, $n=25$) (ภาพ 17) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และกิจกรรมของเอนไซม์โคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว EPM พบว่าการศึกษาในเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท มีความสัมพันธ์กันระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง และกิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 15 ค่า $r=0.734$ ($P<0.05$) และในวันที่ 23 พบว่าความสัมพันธ์เป็น 0.717 ($P<0.05$) ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสเฉพาะกลุ่มของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) แต่เริ่มมีความสัมพันธ์ในวันที่ 5-25 (ตาราง 10)



ภาพ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ

ตาราง 10 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว EPM

วัน	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%)			
	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส		กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	
	Overall ¹	<i>Metarhizium</i> ²	Overall ¹	<i>Metarhizium</i> ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.502	0.000	0.425	0.721
3	0.502	0.000	0.276	0.238
5	0.448	0.137	0.515	0.600
7	0.101	0.224	0.079	0.236
9	0.329	0.425	0.001	0.492
11	0.522	0.073	0.401	0.454
13	0.656	0.230	0.000	0.119
15	0.734*	0.699	0.209	0.450
17	0.661	0.320	0.201	0.387
19	0.589	0.359	0.129	0.492
21	0.378	0.206	0.143	0.293
23	0.717*	0.271	0.356	0.127
25	0.683	0.696	0.145	0.434

¹ ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 8 ไอโซเลท (*Beauveria* spp., n=2; *Metarhizium* spp., n=6)

² ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* 6 ไอโซเลท (*Metarhizium* spp., n=6)

*=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P<0.05, **=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ P<0.01

หากพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสในตำแหน่งที่สูงสุดในแต่ละไอโซเลทของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท (*Beauveria*=2, *Metarhizium*=6) ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคตินเอสมีค่าความสัมพันธ์ r=0.616 (P>0.05) เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ไคตินเอสกับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีค่า r=0.395

ในขณะที่กิจกรรมของเอนไชม์โปรติเอสในตำแหน่งที่สูงสุดแต่ละไอโซเลทของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท (*Beauveria*=2, *Metarhizium*=6) ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับกิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์โปรติเอสมีค่าความสัมพันธ์ $r=0.296$ ($P>0.05$) เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเอนไชม์โปรติเอสกับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีค่า $r=0.837$ ($P<0.05$) (ตาราง 11)

ตาราง 11 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 และกิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์โคติเนส และเอนไชม์โปรติเอสในอาหารเหลว EPM

ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างกิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์ต่อการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%)		
กิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์ โคติเนส	Overall ¹	0.616
	<i>Metarhizium</i> ²	0.395
กิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์ โปรติเอส	Overall ¹	0.296
	<i>Metarhizium</i> ²	0.837*

¹ ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 8 ไอโซเลท (*Beauveria* spp., n=2; *Metarhizium* spp., n=6)

² ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมสูงสุดของเอนไชม์กับการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* 6 ไอโซเลท (*Metarhizium* spp., n=6)

*=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$, **=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ $P<0.01$

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างค่า LT_{50} กับอัตราส่วน (ขนาด clear zone กับขนาดของโคโลนี) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท (*Beauveria*=4, *Metarhizium*=6) เป็นเวลา 7 วัน พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ($P>0.05$) เมื่อทำการวิเคราะห์แยกในแต่ละสกุลของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในวันที่ 1 พบว่าเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่างค่า LT_{50} กับอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี โดยค่า $r=0.891$ ($P<0.05$) ในขณะที่เชื้อราสกุล *Beauveria* ไม่พบความสัมพันธ์ ($P>0.05$) (ตาราง 12)

ตาราง 12 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 และอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี

ตัวแปร		วัน	1	2	3	4	5	6	7
		เชื้อรา							
LT_{50} (ชั่วโมง)	อัตราส่วน ¹ (มิลลิเมตร)	Overall ²	0.579	0.033	0.236	0.178	0.037	0.005	0.043
		<i>Metarhizium</i> spp.	0.891*	0.111	0.147	0.244	0.105	0.027	0.014
		<i>Beauveria</i> spp.	0.413	0.565	0.373	0.373	0.373	0.373	0.373

¹ อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดโคโลนี

² ค่าความสัมพันธ์ของระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผัก (LT_{50}) กับอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 10 ไอโซเลท (*Beauveria* spp., n=4; *Metarhizium* spp., n=6)

*=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$, **=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ $P<0.01$

ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท (*Beauveria*=2, *Metarhizium*=6) กับระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผัก (ค่า LT_{50}) ของเชื้อราทั้งกลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy พบว่ามีความสัมพันธ์กันในวันที่ 17-23 มีค่าความสัมพันธ์ $r=0.805$, $r=0.830$, $r=0.783$ และ $r=0.750$ ($P<0.05$) ตามลำดับ เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โคติเนสกับระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผัก (LT_{50}) ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* พบว่ามีความสัมพันธ์กันในวันที่ 11 ค่า $r=0.844$ ($P<0.05$), 17-19 มีค่า $r=0.923$ และ $r=0.978$ ($P<0.01$) ตามลำดับ (ตาราง 13)

เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท (*Beauveria*=2, *Metarhizium*=6) กับระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผัก (ค่า LT_{50}) ของเชื้อราทั้งกลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ($P>0.05$) ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสกับระยะเวลาในการเข้าควบคุมหนอนใยผัก (LT_{50}) ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* พบว่ามีความสัมพันธ์กันในวันที่ 7-9 ค่า $r=0.850$ และ $r=0.871$ ($P<0.05$) ตามลำดับ (ตาราง 13)

ตาราง 13 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT₅₀ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว EPM

วัน	ค่าความสัมพันธ์ (r)			
	LT ₅₀ (ชั่วโมง)			
	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส		กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	
	Overall ¹	<i>Metarhizium</i> ²	Overall ¹	<i>Metarhizium</i> ²
0	0.000	0.000	0.000	0.000
1	0.347	0.000	0.045	0.034
3	0.347	0.000	0.299	0.256
5	0.324	0.015	0.094	0.090
7	0.030	0.069	0.323	0.850*
9	0.019	0.207	0.458	0.871*
11	0.656	0.844*	0.480	0.704
13	0.590	0.655	0.554	0.722
15	0.605	0.671	0.483	0.640
17	0.805*	0.923**	0.531	0.696
19	0.830*	0.978**	0.400	0.639
21	0.783*	0.769	0.198	0.544
23	0.750*	0.738	0.082	0.298
25	0.391	0.272	0.002	0.366

¹ ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์กับประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 8 ไอโซเลท (*Beauveria* spp., n=2; *Metarhizium* spp., n=6)

² ค่าความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์กับประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใยผักของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* 6 ไอโซเลท (*Metarhizium* spp., n=6)

*=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ P<0.05, **=มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ P<0.01

4.6 การศึกษาอินโดคินเนส

เมื่อพิจารณาจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 2 สกุล คือ *Beauveria* spp. และ *Metarhizium* spp. (กลุ่ม high efficacy และกลุ่ม low efficacy) พบว่าเชื้อราสกุล *Metarhizium* spp. มีความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ดีกว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* spp.

เมื่อพิจารณาการคัดเลือกด้วยประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 11 ไอโซเลทสามารถคัดเลือกเชื้อราออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) โดยเชื้อรากลุ่ม high efficacy มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28-41.03 ชั่วโมง มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 ในขณะที่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) โดยเชื้อรากลุ่ม low efficacy มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 112.63-144.74 ชั่วโมง มีจำนวน 3 ไอโซเลท คือ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 (ตาราง 14)

ตาราง 14 ค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2 ที่อุณหภูมิเฉลี่ย 25.2 ± 2.4 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 23.07 ± 0.3 % RH

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	LT_{50} (ชั่วโมง) $\pm$ SE ¹	ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95%	ระดับของประสิทธิภาพ
1	Ma2	BCC1399	41.03 $\pm$ 11.02 ^{ab2}	19.65-60.30	High
2	Ma7	BCC1701	52.05 $\pm$ 4.02 ^{ab}	28.42-71.15	High
3	Ma9	BCC1707	112.63 $\pm$ 25.62 ^{cde}	87.65-176.87	Low
4	Ma12	BCC1858	86.69 $\pm$ 3.97 ^{bcd}	70.70-101.05	Medium
5	Ma16	BCC4810	31.04 $\pm$ 0.87 ^a	19.65-41.43	High
6	Ma17	BCC4849	26.28 $\pm$ 2.28 ^a	7.09-40.25	High
7	Ma19	BCC5797	62.80 $\pm$ 16.36 ^{abc}	37.93-94.21	Medium
8	Ma22	BCC12636	117.33 $\pm$ 14.18 ^{de}	89.11-185.28	Low
9	Ma28	BCC22353	144.74 $\pm$ 9.33 ^c	55.66-240.70	Low
10	Ma29	M.6079	71.00 $\pm$ 1.57 ^{abcd}	55.48-84.66	Medium
11	Ma30	M.7965	47.79 $\pm$ 7.09 ^{ab}	33.31-60.74	High
P value			0.000**		

¹ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ

² ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์ที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ ด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

4.6.1 คุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอจากการสกัดดีเอ็นเอ

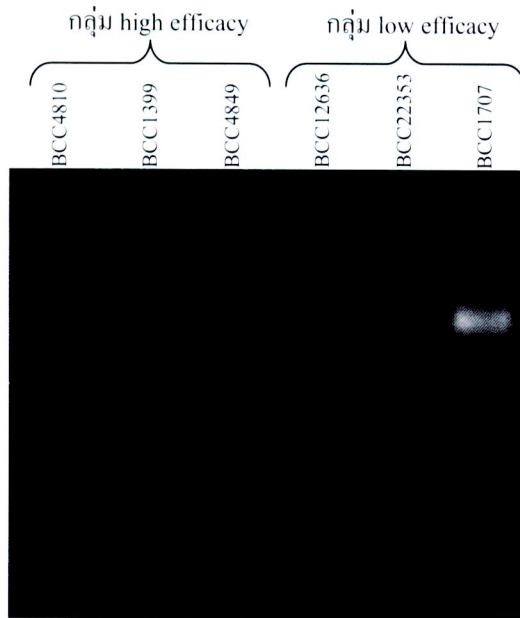
ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 6 ไอโซเลท คือกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 เมื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ พบว่าเชื้อรากลุ่ม high efficacy มีอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง (Optimal Density, OD) ระหว่างความยาวคลื่นที่ 260 และ 280 นาโนเมตร หรือ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.88-1.92 และมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ 255.5-608.3 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ในขณะที่เชื้อรากลุ่ม low efficacy มีอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.84-2.04 และมีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ 235.9-1876.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (ตาราง 15) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราที่มีความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสูงมีแนวโน้มที่อัตราส่วนของการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} จะสูงตามไปด้วย ได้แก่ เชื้อราไอโซเลท BCC1399 และ BCC1707

ตาราง 15 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer

ลำดับ	รหัส	ไอโซเลท	ระดับของประสิทธิภาพ	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	A_{260}/A_{280} ¹
1	Ma2	BCC1399	High	608.3	1.92
2	Ma16	BCC4810	High	255.5	1.88
3	Ma17	BCC4849	High	279.4	1.92
4	Ma9	BCC1707	Low	1876.5	2.04
5	Ma22	BCC12636	Low	352.6	1.90
6	Ma28	BCC22353	Low	235.9	1.84

¹ อัตราส่วนของการดูดกลืนแสง (Optimal Density, OD) ระหว่างความยาวคลื่นที่ 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) เมื่อวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer

เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบลักษณะของแถบดีเอ็นเอบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลักษณะของแถบดีเอ็นเอในกลุ่มเชื้อราที่มีอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} สูง และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอสูงจะปรากฏลักษณะของแถบดีเอ็นเอเดินทางเป็นทางยาวติดต่อกัน (smear) ในขณะที่แถบดีเอ็นเอในกลุ่มเชื้อราที่มีอัตราส่วนของการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} สูง และความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอต่ำจะปรากฏแถบของดีเอ็นเอได้ชัดเจน (ภาพ 18)



ภาพ 18 ลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ไอโซเลท ที่เคลื่อนที่บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.6.2 การเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส *chit42* (*chit1*) ด้วยไพรเมอร์จำเพาะโดยเทคนิคพีซีอาร์

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ genomic DNA และ complementary DNA มาเปรียบเทียบกัน พบว่าส่วนของ exon มีความยาวทั้งหมด 1,398 คู่เบส และส่วนของ intron สั้น ๆ อีก 3 ส่วน โดยมีขนาด 101, 68 และ 80 คู่เบส ตามลำดับ โดยมีส่วนที่เหมือนกัน (conserve) คือ 5'GT และ 3'AG

บริเวณส่วน exon ของยีนไคตินเนส *chit42* (*chit1*) ในเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ไอโซเลท คือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 ถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 7 คู่ คือ *chit42-1*, *chit42-2*, *chit42-3*, *chit42-4*, *chit42-5*, *chit42-6* และ *chit42-7* พบว่าเชื้อราในกลุ่ม high efficacy จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC4810 และ BCC4849 และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy จำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC12636 และ BCC22353 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ *chit42-1*, *chit42-2*, *chit42-3* และ *chit42-4* โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing คือ 60.2, 57.5, 56 และ 56 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อราเชื้อราในกลุ่ม high efficacy จำนวน 1 ไอโซเลท คือ BCC1399 และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy

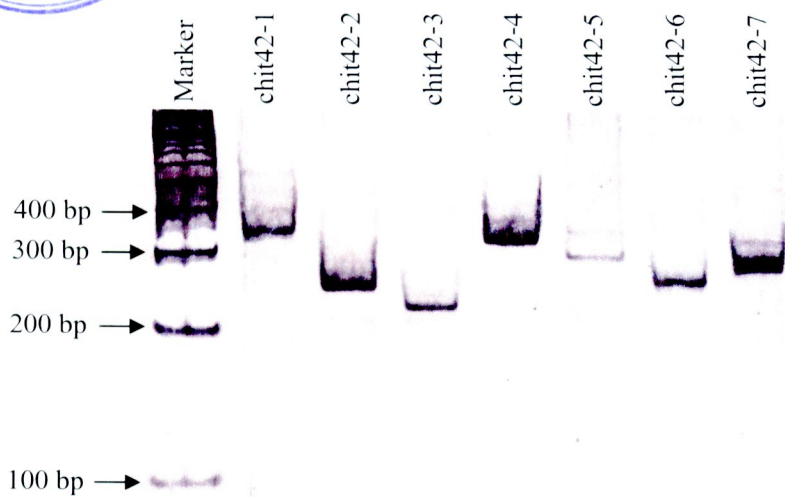
จำนวน 1 ไอโซเลท คือ BCC1707 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในช่วงอุณหภูมิ annealing ดังกล่าวได้ โดยเชื้อราไอโซเลท BCC1399 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1, chit42-2, chit42-3 และ chit42-4 โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing คือ 58, 57.5, 57.5 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเชื้อราไอโซเลท BCC1707 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1, chit42-2, chit42-3 และ chit42-4 โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ใช้อุณหภูมิในช่วง annealing คือ 57.5, 58, 58 และ 58 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตาราง 16)

สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-5, chit42-6 และ chit42-7 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ โดยแต่ละคู่ไพรเมอร์ของเชื้อราจำนวน 6 ไอโซเลท มีอุณหภูมิในช่วง annealing อยู่ที่ 56-60.2, 58-60.2 และ 56-59.1 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ตาราง 16) แต่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยกว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1, chit42-2, chit42-3 และ chit42-4 นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อราบางไอโซเลท (85.7 เปอร์เซ็นต์) ที่ปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอบนเจลในคู่ไพรเมอร์ chit42-5 และ chit42-7 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอน้อยกว่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1, chit42-2, chit42-3, chit42-4 และ chit42-6 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนไคตินเนสด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ไอโซเลท สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการได้ โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1, chit42-2, chit42-3, chit42-4, chit42-5, chit42-6 และ chit42-7 มีขนาด 324, 239, 219, 309, 274, 242 และ 277 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพ 19)

ตาราง 16 อุณหภูมิที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ไอโซเลท ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ

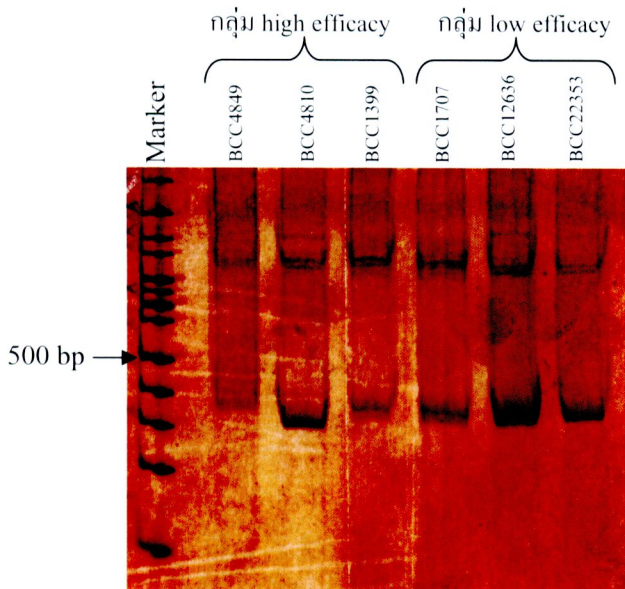
ลำดับ	รหัส	คู่ไพรเมอร์ ไอโซเลท	อุณหภูมิที่ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) (องศาเซลเซียส)						
			chit42-1	chit42-2	chit42-3	chit42-4	chit42-5	chit42-6	chit42-7
1	Ma2	BCC1399	58	57.5	57.5	58	58	60.2	59.1
2	Ma16	BCC4810	60.2	57.5	56	56	57.5	58	58
3	Ma17	BCC4849	60.2	57.5	56	56	58	60.2	59.1
4	Ma9	BCC1707	57.5	58	58	59.1	56	58	59.1
5	Ma22	BCC12636	60.2	57.5	56	56	58	60.2	56
6	Ma28	BCC22353	60.2	57.5	56	56	60.2	58	57.5



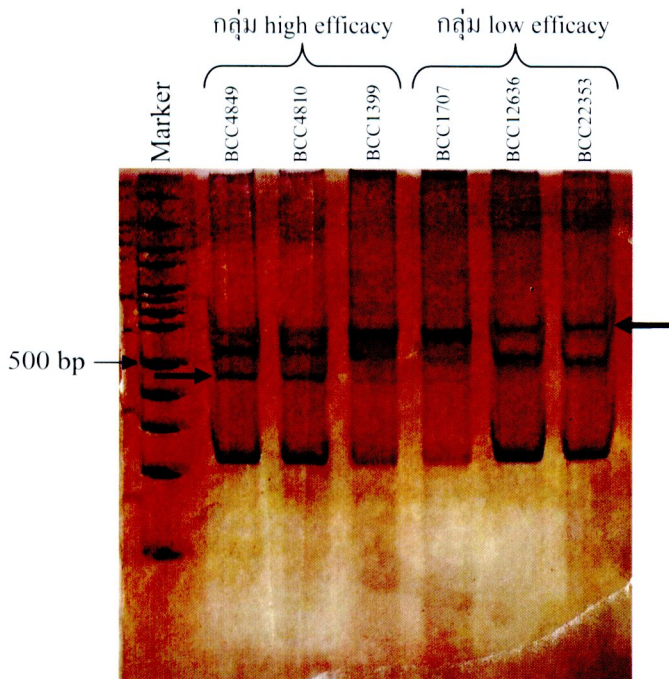
ภาพ 19 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส *chit42* (*chit1*) ในส่วน exon ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง *Metarhizium anisopliae* ไอโซเลต BCC4849 ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 7 คู่ โดยเทคนิคพีซีอาร์

4.6.3 การตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *chit42* (*chit1*) ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี (Single-Strand Conformation Polymorphism, SSCP)

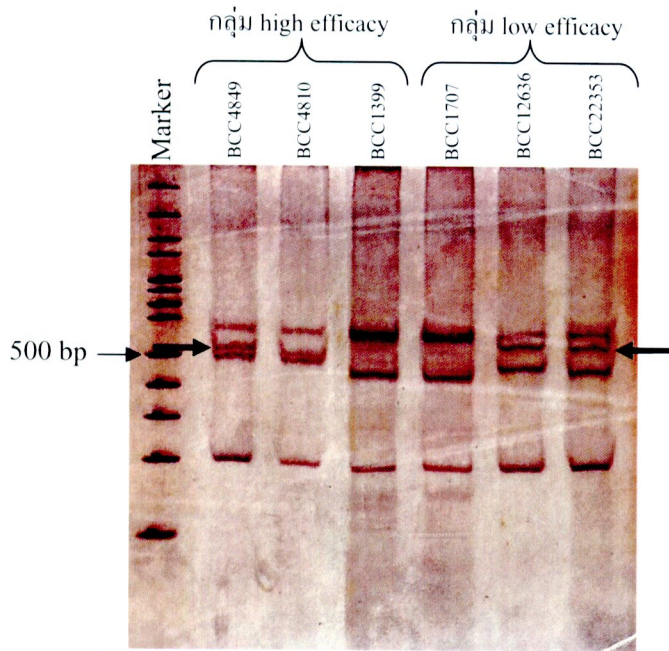
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส *chit42* (*chit1*) ในบริเวณส่วนของ exon ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 7 คู่ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 6 ไอโซเลต คือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 ถูกนำมาตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวบน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูง (high efficacy หรือ H) กับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่ำ (low efficacy หรือ L) พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของเชื้อราในกลุ่ม high efficacy และเชื้อราในกลุ่ม low efficacy ซึ่งถูกเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ *chit42-2* และ *chit42-3* พบความผันแปรของยีนไคตินเนส (single nucleotide polymorphisms, SNPs) โดยปรากฏการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แตกต่างกัน (ภาพ 21, 22) ในขณะที่ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ *chit42-1*, *chit42-4*, *chit42-5*, *chit42-6* และ *chit42-7* ไม่พบ SNPs หรือการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกันของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ภาพ 20, 23, 24, 25, 26) นอกจากนี้พบว่าแถบดีเอ็นเอของเชื้อรา *M. flavoviride* ไอโซเลต BCC1399 และ BCC1707 มีการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอต่างจากกลุ่มของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต BCC4810, BCC4849, BCC12636 และ BCC22353 (ภาพ 21, 22, 23)



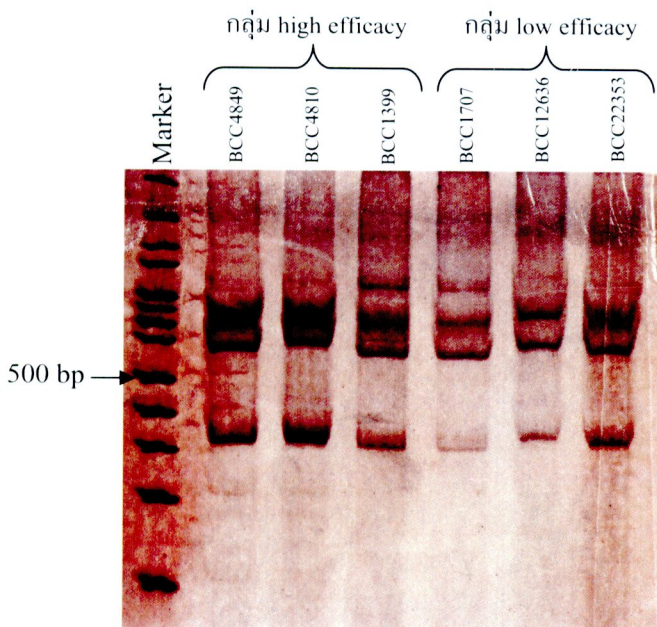
ภาพ 20 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท



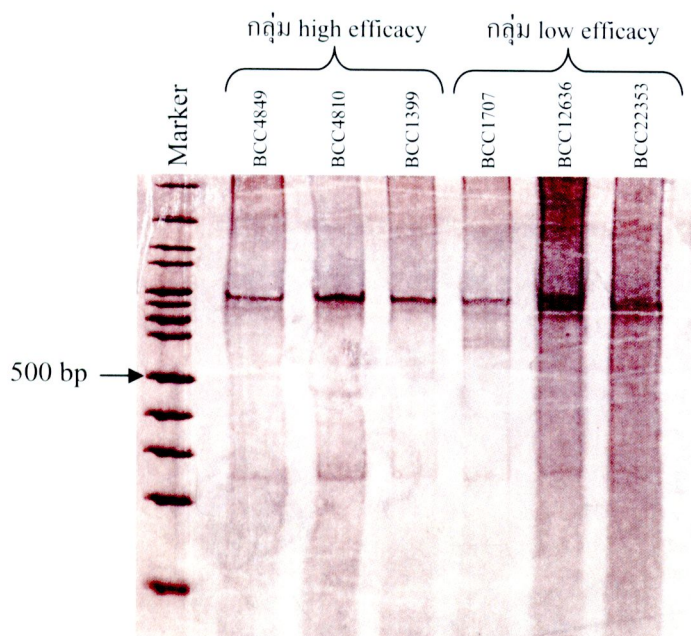
ภาพ 21 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-2 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท และ low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท



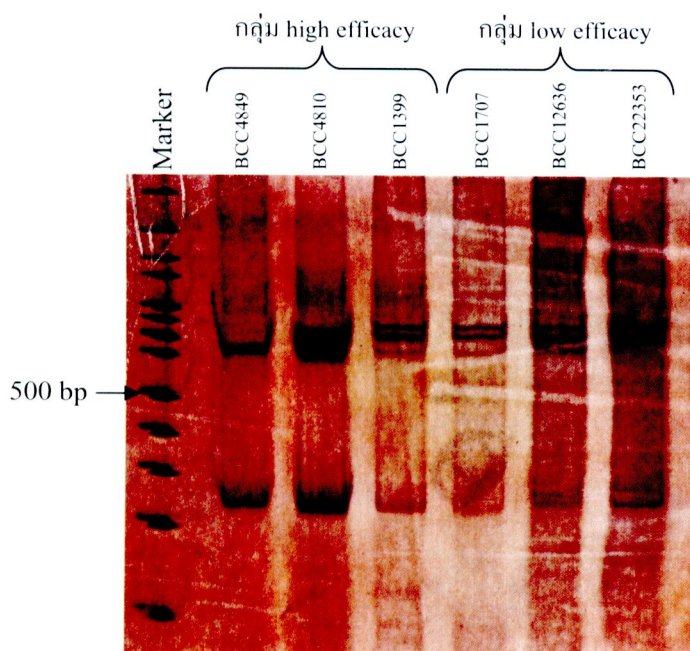
ภาพ 22 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-3 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท



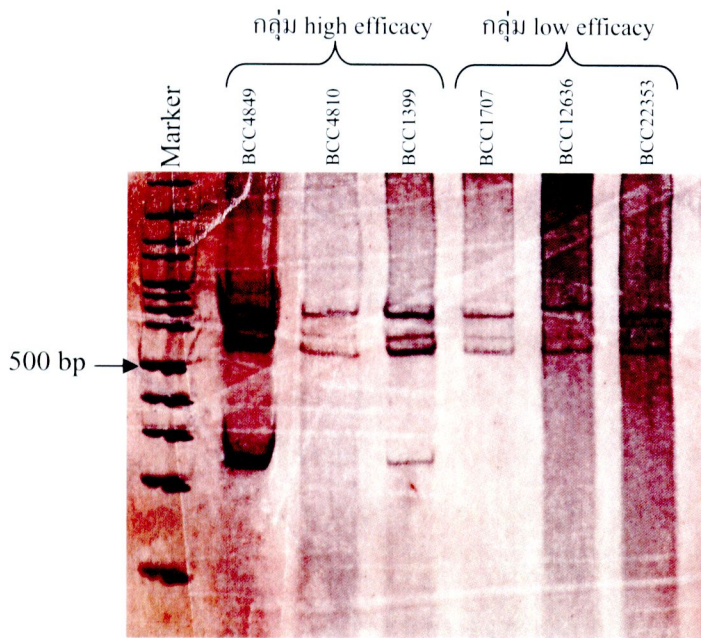
ภาพ 23 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-4 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท



ภาพ 24 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-5 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลต และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลต



ภาพ 25 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-6 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลต และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลต



ภาพ 26 ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคูไพรเมอร์ chit42-7 บน non-denaturing gel ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* ในกลุ่ม high efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท และกลุ่ม low efficacy จำนวน 3 ไอโซเลท