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) กล่าวถึงคือส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อว่ามีผลต่อการผลิตโคนิเดียเมื่อเพาะเลี้ยงในsabouraud 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

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

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

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

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

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

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