ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248517

การคัดกรองและการหยุดยั้งไวรัสเอชไอวีจากเชื้อราสายพันธุ์ธรรมชาติ

นราภร ดุนดาย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชาชีวเวชศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2554

b00253053

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248517

การคัดกรองและการแยกยีนไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง เพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก

นราดร ฉุยฉาย

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชากีฏวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2554

การคัดกรองและการแยกยีนไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
เพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก

นราดร ฉุยฉาย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชากีฏวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วารุณี ศิริจรจารุ
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี
.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ครุฑเมือง
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ครุฑเมือง
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช

2 กันยายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้โอกาส ความรู้ คำแนะนำ ประสบการณ์ใหม่ ๆ ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการสละเวลาอันมีค่าเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ครุฑเมือง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะแนวเรื่องความคิดในการวางแผน การวิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช และอาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านเอนไซม์ แนะแนวทางในการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณามอบทุนสนับสนุนในการศึกษา และวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ (BIOTECH) และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาลี ตั้งระเบียบ สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ทุกท่านที่ได้ประสิทธิประสาทความรู้ และแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่สาขาวิชากีฏวิทยา ทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทดลอง ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลา และขอขอบคุณคุณกัลยา บุญสง่า คุณสิริญา คัมภิโร คุณอภินันท์ กันเปียงใจ คุณวรรษมน บุญยิ่ง คุณณัฐพงษ์ นวลดี คุณอัญชลี วงษา คุณพันธภรณ์ สุภัคกาญจน์กุล คุณแพรทิพย์ แก้วจันทร์ และคุณณัฐพร จันทะ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือชี้แนะ และเป็นกำลังใจให้เสมอ รวมทั้งขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกท่านที่ยังมิได้กล่าวนาม ที่คอยช่วยเหลือผู้เขียนจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ น้องชาย คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า คุณยาย คุณย่า และคุณปู่ ที่ให้การสนับสนุนการศึกษา ให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และเป็นกำลังใจให้ตลอดมา ผู้เขียนขออุทิศวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้คุณย่าสำราญ ฉุยฉาย และคุณตาสุข แสงแก้ว

นราดร ฉุยฉาย

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและการแยกยีนไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก

ผู้เขียน นายนราดร ฉุยฉาย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) กีฏวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. สรัญยา วัลยะเสวี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. พัชรินทร์ ครุฑเมือง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. ชาติชาย โขนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

248517

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจะอาศัยกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกในการผ่านผนังลำตัวแมลงและทำให้เกิดขบวนการเกิดโรคในแมลง เอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยส่วนประกอบสำคัญในผนังลำตัวของแมลง เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง 2 ชนิดได้แก่ *Beauveria* spp. จำนวน 14 ไอโซเลท และ *Metarhizium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ถูกนำมาทดสอบหาระยะเวลา (LT_{50}) ที่ใช้ในการควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ที่ความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราสาเหตุโรคแมลงออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 และ BCC4849 มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 26.28 ถึง 34.98 ชั่วโมง ในขณะที่กลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลง จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 และ BCC22353 มีค่า LT_{50} อยู่ในช่วง 73.26 ถึง 144.74 ชั่วโมง และนำมาทดสอบหาความรุนแรง (LC_{50}) พบว่าในกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงทั้งเชื้อรา *Beauveria* sp. และ *Metarhizium* sp. ได้แก่ไอโซเลท Bb.5335 และ

248517

BCC4849 มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.66×10^{6} และ 3.11×10^{5} โคนิเดีย/มิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม ถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบน colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 8 ใน 10 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสโดยไอโซเลท BCC17599 มีขนาดของ clear zone ใหญ่ที่สุด ในขณะที่เชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC14841 และ Bb.2637 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ไคติเนสในอาหารเหลว พบว่าเชื้อราไอโซเลท Bb.5335 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุดในวันที่ 11 เมื่อศึกษาต่อไปพบว่าเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันที่ 1 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสมีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นหลังกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด นอกจากนี้พบว่าทั้งเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงโดยเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* จึงนำเฉพาะเชื้อราสกุล *Metarhizium* มาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ด้วยเทคนิค Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1399, BCC4810 และ BCC4849 และกลุ่มที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลง จำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ BCC1707, BCC12636 และ BCC22353 พบว่า 2 คู่ไพรเมอร์ คือ chit42-2 และ chit42-3 พบ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา *Metarhizium flavoviride* มีรูปแบบของ SSCP แตกต่างจากเชื้อรา *M. anisopliae* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงอาจจะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ไคติเนสเพียงอย่างเดียว อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เข้ามาร่วมด้วย นอกจากนี้ SNPs ที่พบมีศักยภาพสูงในการแยกระหว่างกลุ่มเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงกับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลงออกจากกัน

Thesis Title Screening and Isolation of Chitinase Gene from Entomopathogenic Fungi for Enhancing the Infection of Diamondback Moth Larvae

Author Mr. Naradorn Chui-Chai

Degree Master of Science (Agriculture) Entomology

Thesis Advisory Committee

Lect. Dr. Yaowaluk Chanbang	Advisor
Lect. Dr. Sarunya Valyasevi	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Supamit Mekchay	Co-advisor
Lect. Dr. Patcharin Krutmuang	Co-advisor
Lect. Dr. Chartchai Kanongnuch	Co-advisor

ABSTRACT

248517

Entomopathogenic fungi utilize the hydrolytic enzyme to breach through the cuticle of insects and to be caused of diseases. Chitinase and protease are the hydrolytic enzymes and play important roles in degradation of the major components of insect cuticle. Fourteen isolates of *Beauveria* spp. and eleven isolates of *Metarhizium* spp., entomopathogenic fungi were selected to screen for entomopathogenic efficiency to control the 2^{nd} instar larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). The median lethal times (LT_{50}) were estimated at 10^8 conidia ml^{-1} concentration and revealed to be distinguishable into two groups. The top 5 effective fungi were BCC17599, Bb.2637, Bb.5335, BCC4810 and BCC4849 showed the LT_{50} ranged from 26.28 to 34.98 h, while the 5 lowermost effective fungi were BCC14841, BCC1707, BCC1858, BCC12636 and BCC22353 ranged from 73.26 to 144.74 h. Moreover, the virulence (LC_{50}) revealed that the highest efficacy of *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. were Bb.5335 and BCC4849 with the 96-h LC_{50} of 2.66×10^6 and 3.11×10^5 conidia ml^{-1} respectively. All isolates

248517

were preliminary investigated for chitinase production on 15% (w/v) colloidal chitin agar. Eight of ten isolates were positive and the highest clear zone was detected in BCC17599 while 2 isolates, BCC14841 and Bb.2637, were negative. In addition chitinase production in liquid culture showed that Bb.5335 was the greatest chitinase activity at the 11-day cultivation. Further study revealed that all 8 positive isolates produced protease since 1 day of cultivation and chitinase activity tended to rise up after the highest protease activity. Moreover, chitinase and protease activities were associated with the insecticidal activities. However, *Metarhizium* isolates were higher insecticidal efficacy and hydrolytic enzyme activities than in *Beauveria* isolates. Especially, *Metarhizium* isolates were identified the polymorphisms of chitinase gene *chit42* (*chit1*) with Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique to compare among the top 3 effective isolates were BCC1399, BCC4810 and BCC4849 and the 3 lowermost effective isolates were BCC1707, BCC12636 and BCC22353. The result showed that the Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) were found by 2 primers as chit42-2 and chit42-3. Moreover, the SSCP banding pattern of *Metarhizium flavoviride* were different from *M. anisopliae*. The results indicated that the insecticidal effects of entomopathogenic fungi would not only directly involved with chitinase activity but also contribute with protease activity and other cuticle hydrolytic enzymes. Furthermore, SNPs represent high potential to separate between high and low efficacy of entomopathogenic fungi.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ค

บทคัดย่อภาษาไทย จ

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ช

สารบัญตาราง ฎ

สารบัญภาพ ฑ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มา และความสำคัญของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา 2

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร 3

2.1 หนอนใยผัก 3

2.2 ผนังลำตัวของแมลง 5

2.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลง 7

2.3.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* 8

2.3.2 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* 8

2.3.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* 9

2.3.4 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* 10

2.3.5 การพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายในแมลงอาศัย 11

2.3.6 ลักษณะอาการของแมลงอาศัยที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา 12

2.3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคของแมลงโดยเชื้อรา 13

2.4 เอนไซม์ไคติเนส 14

2.4.1 กระบวนการย่อยไคติน 15

2.5 เอนไซม์โปรติเอส 18

2.6 การควบคุมหนอนใยผัก และการศึกษาความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงกับกิจกรรมของเอนไซม์ 19

2.7 เทคนิคเอสเอสซีพี (SSCP) 22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 24

3.1 การเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 24

3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 27

3.2.1 การเลี้ยง และเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก 27

3.2.2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนใยผัก 28

3.3 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 32

3.4 การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง 34

3.4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส 34

3.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 35

3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์ 35

3.6 การศึกษายีนไคติเนส 36

3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ 36

3.6.2 การตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอ 37

3.6.3 การออกแบบไพรเมอร์ 38

3.6.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ 39

3.6.5 การตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน 39

บทที่ 4 ผลการทดลอง 41

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 66

บทที่ 6 สรุป 73

เอกสารอ้างอิง 75

ภาคผนวก 88

ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหาร และสารละลาย 89

ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณที่ใช้ในการทดลอง และการย้อมเจล 94

ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมซับสเตรท การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และวิธีการทำเส้นมาตรฐาน 97

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมซับสเตรท การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และวิธีการทำเส้นมาตรฐาน 102

ภาคผนวก จ การคำนวณหาค่า LT_{50} และ LC_{50} 107

ภาคผนวก ฉ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 134

ภาคผนวก ช สารเคมี และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ 137

ประวัติผู้เขียน 140

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	9
2	ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	10
3	การหาค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ด้วยความเข้มข้น 1×10^{8} โคนิเดีย/มิลลิลิตร	20
4	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงรหัสต่าง ๆ ในประเทศไทย	24
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	38
6	การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในสภาพห้องปฏิบัติการ	41
7	ค่า LT_{50} ในการทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2	45
8	ค่าการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) บนลำตัวหนอนใยผักวัย 2	46
9	อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์	49
10	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	53
11	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคติเนส และ เอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	54
12	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
13	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	56
14	ค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) วัย 2	57
15	การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ	58
16	อุณหภูมิที่เหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium*	60

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
1	การพัฒนาระยะต่าง ๆ ของหนอนใยผัก	5
2	ภาพตัดขวางของผนังลำตัวของแมลง	6
3	แท่งไคติน (chitin chain)	7
4	การจัดเรียงของแท่งไคติน (chitin chain) ในชั้น cuticle ของแมลง	7
5	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายไคติน	15
6	หลักการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี (SSCP)	23
7	การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก	28
8	การทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ	32
9	การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง	34
10	การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 8 รหัส	35
11	ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนใยผักในสภาพห้องปฏิบัติการ	43
12	ลักษณะของหนอนใยผักที่เกิดจากเชื้อราสกุล *Beauveria* เข้าทำลาย	44
13	ลักษณะของหนอนใยผักที่เกิดจากเชื้อราสกุล *Metarhizium* เข้าทำลาย	44
14	ลักษณะของ clear zone ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง	48
15	กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	50
16	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Beauveria* และ *Metarhizium* ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	51
17	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	52
18	ลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล *Metarhizium* จำนวน 6 ไอโซเลท	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป		หน้า
19	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคติเนส *chit42* (*chit1*) ด้วยไพรเมอร์ 7 คู่	61
20	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-1	62
21	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-2	62
22	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-3	63
23	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-4	63
24	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-5	64
25	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-6	64
26	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรเมอร์ chit42-7	65