

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



248517

การคัดกรองและการแยกป็นโรคติดต่อจากเชื้อราและเชื้อไวรัส
เพื่อเพิ่มการเข้าถึงการรักษาพยาบาล

นพพร จุฑา

จิตวิทยาการแพทย์
(เภสัชศาสตร์)
สาขาวิชาจิตวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กุมภาพันธ์ 2554



การคัดกรองและการแยกยื่นไคตินเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
เพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก



นราทร ฉูฉาย

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัยเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชากีฏวิทยา

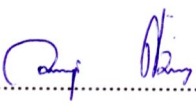
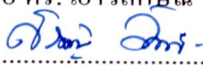
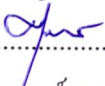
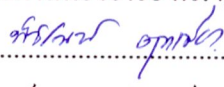
บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
กันยายน 2554

การคัดกรองและการแยกยื่นไคตินเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง
เพื่อเพิ่มการเข้าทำลายหนอนใยผัก

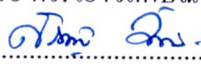
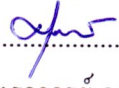
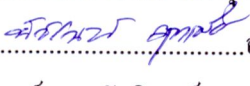
นราคร จุญฉาย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชากีฏวิทยา

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วารุณี ศิริจรจารุ
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. สรัญญา วัลยะเสวี
.....กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. พชรินทร์ ครุฑเมือง
.....กรรมการ
อาจารย์ ดร. ชาดิชาช โชนงนุช

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทร์บาง
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. สรัญญา วัลยะเสวี
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. พชรินทร์ ครุฑเมือง
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. ชาดิชาช โชนงนุช

2 กันยายน 2554

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. เขียวลักษณ์ จันท์บาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้โอกาส ความรู้ คำแนะนำ ประสบการณ์ใหม่ ๆ ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการ สละเวลาอันมีค่าเพื่อแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. พชรินทร์ คุรุทเมือง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภูมิตร เมฆฉาย ที่กรุณาให้คำปรึกษา และแนะแนวเรื่องความคิดในการวางแผน การวิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งอนุเคราะห์อุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร. ชาดิชาข โชนงนุช และอาจารย์ ดร. สรัญญา วัลยะเสวี ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านเอนไซม์ แนะนำแนวทางในการศึกษา วิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งอนุเคราะห์ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่กรุณามอบทุนสนับสนุนในการศึกษา และวิจัยในครั้งนี้

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

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่านที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทดลอง ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้ตลอดเวลา และขอขอบคุณคุณกัลยา บุญสง่า คุณสิริญา คัมภีโร คุณอภิรักษ์ กันเปียงใจ คุณวรรมน บุญยัง คุณณัฐพงษ์ นวลดี คุณอัญชลี วงษา คุณพัชรภรณ์ สุภักคกาญจน์กุล คุณแพรวทิพย์ 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 นุชฉาย และคุณตาสุข แสงแก้ว

นราคร นุชฉาย

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การคัดกรองและการแยกยีนโคตินเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงเพื่อเพิ่ม
การเข้าทำลายหนอนใยผัก

ผู้เขียน นายนราคร นุญฉาย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) กีฏวิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ จันทรียง	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
อาจารย์ ดร. สรัญญา วัลยะเสวี	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภมิตร เมฆฉาย	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. พชรินทร์ ครุฑเมือง	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ ดร. ชาดิชาข โชนงนุช	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

248517

เชื้อราสาเหตุโรคแมลงจะอาศัยกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกในการผ่านผนังลำตัวแมลงและทำให้เกิดขบวนการเกิดโรคในแมลง เอนไซม์โคตินเนส และเอนไซม์โปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรไลติกมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายประกอบสำคัญในผนังลำตัวของแมลง เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคของแมลง 2 ชนิดได้แก่ *Beauveria* spp. จำนวน 14 ไอโซเลท และ *Metarhizium* spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ถูกนำมาทดสอบหาระยะเวลา (LT_{50}) ที่ใช้ในการควบคุม หนอนใยผักวัย 2 ที่ความเข้มข้น 10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร พบว่าสามารถแบ่งเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ออกเป็น 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. ได้แก่ ไอโซเลท Bb.5335 และ

BCC4849 มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.66×10^6 และ 3.11×10^5 โคนิเดีย/มิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อราทั้ง 2 กลุ่ม ถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบน colloidal chitin agar ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า 8 ใน 10 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนสโดยไอโซเลท BCC17599 มีขนาดของ clear zone ใหญ่ที่สุด ในขณะที่เชื้อราจำนวน 2 ไอโซเลท คือ BCC14841 และ Bb.2637 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไคตินเนส นอกจากนี้การศึกษาเอนไซม์ไคตินเนสในอาหารเหลว พบว่าเชื้อราไอโซเลท Bb.5335 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสสูงสุดในวันที่ 11 เมื่อศึกษาต่อไปพบว่าเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสตั้งแต่วันที่ 1 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอสมีแนวโน้มที่จะเกิดขึ้นหลังกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด นอกจากนี้พบว่าทั้งเอนไซม์ไคตินเอส และเอนไซม์โปรติเอสมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการควบคุมแมลง โดยเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าเชื้อราสกุล *Beauveria* จึงนำเฉพาะเชื้อราสกุล *Metarhizium* มาตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนไคตินเอส *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* จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงอาจจะไม่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการทำงานของเอนไซม์ไคตินเอสเพียงอย่างเดียว อาจเกี่ยวข้องกับเอนไซม์โปรติเอส และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เข้ามาร่วมด้วย นอกจากนี้ SNPs ที่พบมีศักยภาพสูงในการแยกแยะระหว่างกลุ่มเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงกับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพต่ำในการควบคุมแมลงออกจากกัน

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 2nd instar larvae of diamondback moth *Plutella xylostella* (L.). The median lethal times (LT₅₀) were estimated at 10⁸ 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 LT₅₀ 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 (LC₅₀) revealed that the highest efficacy of *Beauveria* sp. and *Metarhizium* sp. were Bb.5335 and BCC4849 with the 96-h LC₅₀ of 2.66×10⁶ and 3.11×10⁵ conidia ml⁻¹ respectively. All isolates

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	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฑ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
2.1 หนอนใยผัก	3
2.2 ผนังลำตัวของแมลง	5
2.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลง	7
2.3.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i>	8
2.3.2 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i>	8
2.3.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	9
2.3.4 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	10
2.3.5 การพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายในแมลงอาศัย	11
2.3.6 ลักษณะอาการของแมลงอาศัยที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา	12
2.3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคของแมลงโดยเชื้อรา	13
2.4 เอนไซม์ไคตินเนส	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 และเพิ่มปริมาณหนอนไขผัก	27
3.2.2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนไขผัก	28
3.3 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	32
3.4 การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	34
3.4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส	34
3.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	35
3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์	35
3.6 การศึกษายีนไคตินเนส	36
3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ	36
3.6.2 การตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอ	37
3.6.3 การออกแบบไพรเมอร์	38
3.6.4 ปฏิกริยาแลงคาซ์โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์	39
3.6.5 การตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง	41
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	66
บทที่ 6 สรุป	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหาร และสารละลาย	89
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณที่ใช้ในการทดลอง และการย้อมเจล	94
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมซบสเตรท การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส และวิธีการทำเส้นมาตรฐาน	97

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมซบสเตรท 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 <i>Beauveria</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	9
2 ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	10
3 การหาค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ควบคุมหนอนไผ่ก้วย 2 ด้วยความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร	20
4 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงรหัสต่าง ๆ ในประเทศไทย	24
5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	38
6 การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในสภาพห้องปฏิบัติการ	41
7 ค่า LT_{50} ในการทดสอบกับหนอนไผ่ก้วย 2	45
8 ค่าการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) บนลำตัวหนอนไผ่ก้วย 2	46
9 อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์	49
10 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนไผ่ก้วย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	53
11 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนไผ่ก้วย 2 และกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคตินเอส และ เอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	54
12 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนไผ่ก้วย 2 และอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
13 ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส และเอนไซม์ โปรติเอสในอาหารเหลว	56
14 ค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>) วัย 2	57
15 การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ	58
16 อุณหภูมิที่เหมาะสมของคูโพรเมอร์ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	60

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
1	การพัฒนาระยะต่าง ๆ ของหนอนไผ่ผัก	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	การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนไผ่ผัก	28
8	การทดสอบกับหนอนไผ่ผักวัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ	32
9	การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	34
10	การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 8 รหัส	35
11	ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนไผ่ผักในสภาพห้องปฏิบัติการ	43
12	ลักษณะของหนอนไผ่ผักที่เกิดจากเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> เข้าทำลาย	44
13	ลักษณะของหนอนไผ่ผักที่เกิดจากเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> เข้าทำลาย	44
14	ลักษณะของ clear zone ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	48
15	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i> และ <i>Metarhizium</i> ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	50
16	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i> และ <i>Metarhizium</i> ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	51
17	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	52
18	ลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> จำนวน 6 ไอโซเลต	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

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