

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* L.) เป็นแมลงพาหะก่อโรคที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคไข้เลือดออก (dengue) โรคไข้เหลือง (yellow fever) และโรคชิคุนกุนยา (chikungunya) โดยในการป้องกันกำจัดนั้นมักนิยมใช้สารเคมีเป็นหลัก ซึ่งในการใช้นั้นมีสิ่งที่จะต้องตระหนัก อันเนื่องมาจากการตกค้างของสารเคมีและอันตรายจากสารเคมี ดังนั้นการป้องกันกำจัดโดยชีววิธีจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง สำหรับเชื้อ *Metarhizium* spp. หรือเชื้อราเขียว (green muscardine) นั้น เป็นเชื้อที่มีความสำคัญอันดับต้นในกลุ่มเชื้อรากล่อโรคแมลง (entomopathogenic fungi) ซึ่งได้มีการรายงานถึงความสามารถของเชื้อราเขียวในการเข้าทำลายแมลงได้มากมายใน 7 อันดับ (order) มากกว่า 200 ชนิด (species) ตัวอย่างเช่น ค้างแรมมะพร้าว หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด หนอนเจาะสมอฝ้าย ค้างคานหมากฝรั่ง หนอนใยผัก หนอนคืบคาวปลากุ้ง แมลงสาบ ปลวก ค้างคาน หนอนกินรังผึ้ง และยุง เป็นต้น (มลิวัลย์ และคณะ, 2517; Samuels, 1986; Samules et al., 1989; Zimmerman, 1992; Villani and Krueger, 1994; Mazodze and Zvoutete, 1999; Scholte et al., 2007) จากลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราเขียว ที่ใช้เส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวของแมลงโดยตรง ซึ่งผนังลำตัวของแมลงมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70% (Clarkson and Charnley, 1996) ดังนั้นเอนไซม์โปรติเอสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีสำคัญอีกชนิดหนึ่ง ที่จะช่วยส่งเสริมการเข้าทำลายของเชื้อรา ทั้งนี้มีรายงานถึงในช่วงของการเข้าทำลายของเชื้อ *M. anisopliae* พบว่าเอนไซม์โปรติเอส (protease) ที่เรียกว่า Pr1 จะถูกผลิตขึ้นในความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังลำตัวแมลงชนิดอื่นๆ (St. Leger. et al., 1986; Liu et al, 2007) และนอกจากนั้นเชื้อราเขียวยังสร้างสารพิษที่เรียกว่า destruxin ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลถึงประสิทธิภาพในการเข้าทำลายของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยพบว่าสารพิษจะส่งผลทำให้เกิดอัมพาตในตัวอ่อนของแมลง สามารถขัดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และยังมีผลต่อเซลล์ (cytopathic effect) ที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (Boucias and Pendland, 1998) นอกจากนี้ยังมีผลต่ออัตราการเต้นของหัวใจ (Samuels, 1998) อีกด้วย จากความสามารถดังกล่าวของเชื้อราเขียว รวมทั้งสามารถพบเชื้อได้ทั่วไป สามารถแพร่กระจายได้ดีในสภาพแวดล้อม และเพาะเลี้ยงได้ง่าย จึงได้มีการนำเชื้อราเขียวมาใช้ควบคุมและกำจัดแมลงศัตรูที่สำคัญหลายชนิดอย่างแพร่หลาย ซึ่งในต่างประเทศมีการพัฒนาเชื้อราเขียวในรูปการค้าหลากหลาย

รูปแบบ เช่น Biogreen®, Metaquino®, Bio-Path®, Bio-Blast® และ Cobican® เป็นต้น (Butt et al., 2001)

ดังนั้นการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมและกำจัดแมลงที่เป็นโทษต่างๆ รวมทั้งที่ยังเป็นพาหะนำโรคสู่คนได้อีกด้วย เช่น ยุง โดยการคัดเลือกหาเชื้อไอโซเลตท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งพิจารณาจากการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส สารพิษ ความสามารถในการทำลายแมลงของเชื้อทั้งโดยตรงและโดยการประยุกต์ใช้ อีกทั้งเพื่อการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพในการนำเชื้อไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป โดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพเข้าร่วมด้วย จึงเป็นอีกช่องทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพการเข้าทำลายของเชื้อรา *Metarhizium* spp. รวมถึงการผลิตและนำสารพิษจากเชื้อราไปใช้ประโยชน์โดยให้มีประสิทธิภาพกว้างขวางขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงได้อย่างดียิ่งอีกทางหนึ่งต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. และ/หรือ *M. anisopliae* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่มีศักยภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)

2.2 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความสามารถในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านกับกิจกรรมของเอนไซม์ protease (Pr1) ของเชื้อ *Metathizium* spp.

2.3 เพื่อโคลนยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ protease (*pr1*) ของเชื้อ *Metarhizium* spp.

3. ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยโดยจำกัดอยู่กับเชื้อ *Metarhizium* spp. และ/หรือ *M. anisopliae* ไอโซเลตต่างๆ เพื่อคัดเลือกหาไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญ เช่น ตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) รวมทั้งการศึกษความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเข้าทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส และการโคลนยีนโปรตีเอสของเชื้อ *Metathizium* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุม

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 ได้ *Metarhizium* spp. และ/หรือ เชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลตต่าง ๆ ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญของมนุษย์ เช่น ยุงลายบ้าน

4.2 ได้ความสัมพันธภาพของความสามารถในการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp. และ/หรือ *M. anisopliae*

4.3 ได้โคลนเชื้อ *Escherichia coli* ที่มีขึ้นควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp. และ/หรือเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพต่อตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน