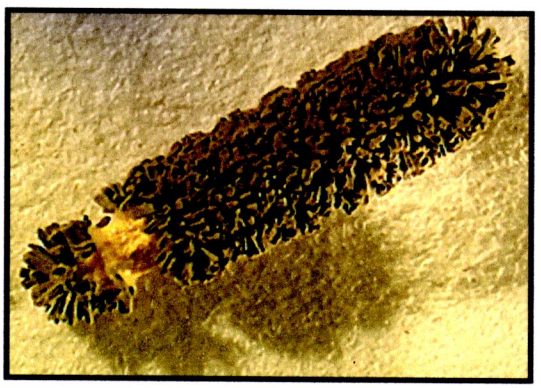
บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. เชื้อ *Metarhizium* spp.

เชื้อ *Metarhizium* spp. ถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1878 โดย Elias Metschikoff ซึ่งเชื้อ *Metarhizium* ที่พบนั้นเป็นชนิด *M. anisopliae* และแยกได้จากด้วง (wheat grain beetle, *Anisoplia austriaca*) แต่ในครั้งแรกตั้งชื่อว่า *Entomophthora anisopliae* (*Isaria destructor*) หรือโรคมัสคาดินสีเขียว (green muscardine) (Zimmerman, 1992; Tanada and Kaya, 1993; Boucias and Pendland, 1998) ซึ่งชื่อโรคมัสคาดินเป็นภาษาอิตาเลียน คือ moscardino แปลว่าลูกกวาดรสผลไม้ อันเนื่องมาจากลักษณะของแมลงที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย มีเส้นใยของเชื้อราเจริญขึ้นปกคลุมซากของแมลง (ภาพที่ 1) ลักษณะคล้ายกับขนมลูกกวาดรสผลไม้ หรือขนมหวานของชาวอิตาลีที่ชื่อว่า calcino (Krishnaswani และคณะ, 1973)

เชื้อสกุล (genus) นี้มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญหลายชนิด อาทิ เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถทำให้เกิดโรคกับแมลงใน 7 อันดับ มากกว่า 200 ชนิด เช่น ด้วงแรดมะพร้าว หนอนเจาะลำต้นข้าวโพด หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกินรังผึ้ง ด้วงสนามหญ้าญี่ปุ่น ด้วงดำ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ตั๊กแตน แมลงสาบ ปลวก และยุง เป็นต้น (มลิวัลย์ และคณะ, 2517; Samules, 1986; Samules et al., 1989; Zimmerman, 1992; Villani and Krueger, 1994; Mazodze and Zvoutete, 1999; Scholte et al., 2007) ในปัจจุบันได้มีการนำเชื้อ *Metarhizium* spp. บางสายพันธุ์มาพัฒนาในรูปการค้าอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ

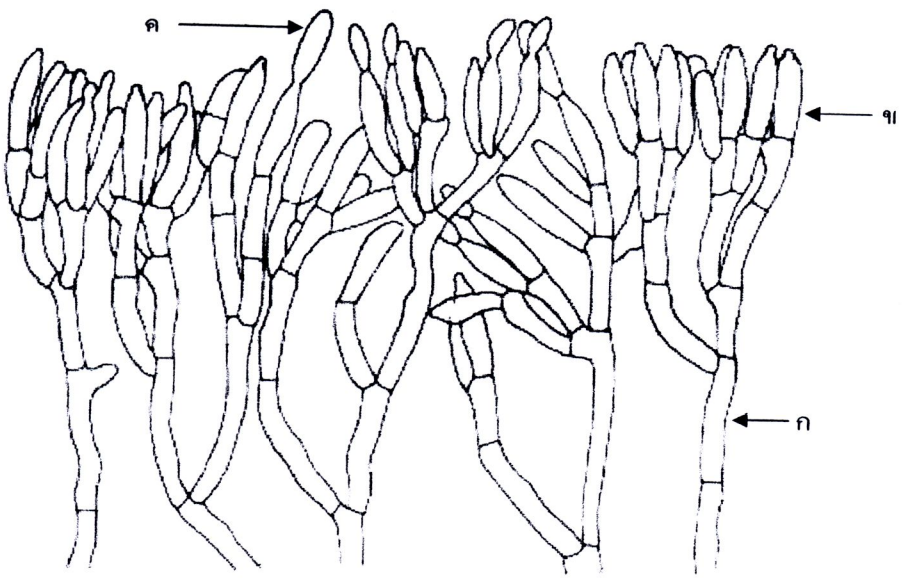


ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* บนซากของแมลง

ที่มา: Anonymous (1996)

1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เชื้อ *Metarhiazium* spp. จัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต (eukaryote) คือกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีเยื่อหุ้มนิวเครียส เป็นเชื้อราในกลุ่ม Ascomycota (Alexopoulos et al., 1996) จัดเป็นเชื้อเป็นราชั้นสูง สามารถสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะสร้างสปอร์ที่ชื่อว่า conidiospore (conidia) บนก้านชูสปอร์ (conidiophore) สปอร์มีลักษณะทรงกระบอก เส้นใยมีผนังกั้น (Tinline, 1971) โคโลนีของเชื้อ *M. anisopliae* มีสีขาวเมื่อยังมีอายุน้อย แต่เมื่อ conidia แก่โคโลนีของเชื้อจะเปลี่ยนสีเป็นสีเขียวเข้ม conidiophore ของเชื้อมีลักษณะเป็นสาย มีไฟอะไลด์ (phialide) ใช้ในการสร้างสปอร์ อยู่เป็นกลุ่มเรียงตัวคล้ายเชิงเทียน สปอร์จะเรียงต่อกันเป็นสาย โดยสปอร์ที่อายุน้อยจะอยู่ติดกับ conidiophore สปอร์ที่สร้างขึ้นจะอัดกันแน่นอยู่ในลักษณะทรงกระบอกดังภาพที่ 2 แต่เชื้อ *Metarhizium* บางชนิดจะมีสีโคโลนีที่แตกต่างกัน เช่น *M. album* สร้างโคโลนีสีขาว *M. brunnem* สร้างโคโลนีสีเหลืองจนถึงสีน้ำตาล (Samson et al., 1988; Tanada and Kaya, 1993)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *Metarhizium*
ก ก้านชูสปอร์ (conidiophore)
ข ไฟอะไลด์ (phialide)
ค โคนิเดีย (conidia)
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Bioresource Collection and Research Center (2009)

1.2 กลไกการเข้าทำลายแมลง

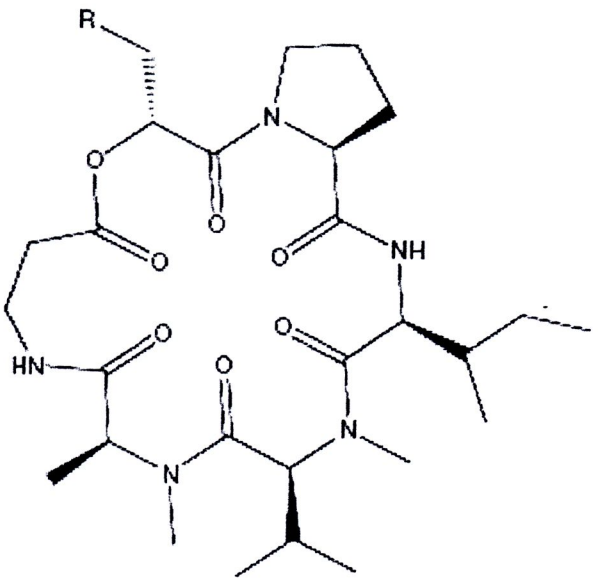
เชื้อราเขียวเข้าทำลายแมลงหรือทำให้เกิดโรคกับแมลง โดยเริ่มจากสปอร์ของเชื้อตกลงบนลำตัวของแมลง เมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมประมาณ 16 - 20 ชั่วโมง สปอร์จะงอก germ tube และมีการพัฒนาเปลี่ยนเป็นเส้นใยยึดเกาะ (appressorium) เพื่อยึดเกาะกับตัวของแมลง จากนั้น appressorium จะสร้างเส้นใยที่ใช้แทง (penetrating hypha) แทงทะลุผ่านผนังลำตัวแมลง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดเช่น โปรตีเอส (protease) เมทาลโลโปรตีเอส (metalloprotease) ไดเปปติดิลเปปติเดส (dipeptidylpeptidase) คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) ไคติเนส (chitinase) ไลเปส (lipase) เอสเตอร์เรส (esterase) และอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) มาเกี่ยวข้อง เพื่อช่วยในการย่อยผนังลำตัวของแมลง ทำให้ง่ายต่อการที่เชื้อจะแทงเข้าไปในลำตัวของแมลง อีกทั้งยังมีการรายงานถึงความสามารถของเชื้อ ว่าสามารถเข้าทางปากและรูเปิดของท่ออากาศที่ผนังลำตัวแมลงได้เช่นกัน ผนังของลำตัวของแมลงที่ถูกเชื้อแทงเข้าไป จะมีสีซีดจางหรือมีรอยสีขาว เมื่อเชื้อเข้าไปในตัวของแมลง เชื้อจะสร้างสปอร์ที่สามารถแตกหน่อคล้ายยีส (blastospore) โดยสปอร์ดังกล่าวจะเพิ่มจำนวนในช่องว่างในลำตัวของแมลงอาศัย (host) ในบางกรณีเชื้ออาจสร้างสารพิษถ้าสภาวะเหมาะสม และเจริญสร้างเส้นใยในเลือด หรือช่องว่างในลำตัวแมลงตลอดเวลาที่แมลงยังมีชีวิต อีกทั้งยังพบด้วยว่าเชื้อสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อไขมันได้เช่นกัน อาการเริ่มแรกของโรคคือ แมลงจะอ่อนแอ กระสับกระส่าย ไม่กินอาหาร ต่อมาเริ่มไม่สามารถควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ได้ ทำให้เป็นอัมพาตในที่สุด บริเวณที่ถูกเชื้อเข้าทำลายในระยะแรกจะเป็นวงสีจางอาจเป็นสีดำ และสีของลำตัวแมลงทั่วไปจะเปลี่ยนเป็นสีคล้ำลง ไม่เห็นลวดลายที่ชัดเจน เมื่อแมลงตายเส้นใยท่อนสั้น (hyphal body) ที่เจริญอยู่ในลำตัวแมลงจะงอกเส้นใยแทงทะลุผ่านผนังลำตัวของแมลงอาศัยขึ้นมาสร้าง conidiophore และสร้าง conidiospore ต่อกันเป็นสายที่ปลายก้าน โดยจะทยอยสร้างเป็นสปอร์ที่สมบูรณ์ยื่นยาวต่อกันออกมาเป็นสาย เมื่อแรกสร้างสปอร์จะมีสีขาวและจะค่อย ๆ เปลี่ยน เป็นสีเขียวจนถึงสีเขียวเข้มเกือบดำเมื่อแก่ ต่อมาแมลงจะแห้งและมีเชื้อราปกคลุม (ทิพย์วดี, 2535; ศิวิลัย, 2546; Boucias and Penland, 1998; Lomer et al., 2001)

เชื้อ *M. anisopliae* ยังสามารถเข้าทำลายแมลงได้ทั้งจากบริเวณลำตัว และบริเวณอื่นได้เช่นกัน เช่นเข้าทำลาย buccal cavity ของด้วงงวง (pales weevil, *Hylobius pales*) (Schabel, 1976) และทางท่อหายใจ (siphon) ของตัวอ่อนยุง (Lacey et al., 1988)

1.3 สารพิษจากเชื้อรา

เชื้อราก่อโรคแมลง (entomophathogenic fungi) หลายชนิดสามารถสร้างสารพิษ (mycotoxin) ได้ (ตารางที่ 1) สารพิษที่มีความสำคัญที่สร้างโดยเชื้อ *Metarhizium* spp. คือสาร destruxin ซึ่งเป็นสารที่ผลิตจากเชื้อราที่อยู่ในดินชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเชื้อ *M. anisopliae* โดยมี

รายงานพบสาร destruxin ที่มีสำคัญอยู่ 35 ชนิด มาจากเชื้อ *M. anisopliae* (Pedras et al., 2002) แต่ส่วนใหญ่จะพบสาร destruxin ชนิด A, B และ E โครงสร้างของ destruxin ซึ่งอาจมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดโรค โดยสารพิษกลุ่ม destruxin นี้โดยทั่วไปประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) อยู่ 5 โมเลกุล (-D-HA-L-Pro-L-Ile-L-MeVal-L-MeAla-β-Ala-) และมีพันธะ D-α–hydroxyl acid residue (HA) เพื่อทำให้เกิดวง โดย destruxin A, B และ E จะแตกต่างกันตรงบริเวณ hydroxyacid residue (ภาพที่ 3) (Hu et al., 2006; Rao et al., 2006) สาร destruxin จัดอยู่ในกลุ่มของ cyclic hexadepsipeptides และยังพบว่าเชื้อราบางชนิดที่สามารถสร้างสาร destruxin ได้เช่นกันคือ *Alternaria brassicae* (ภาพที่ 4) *Trichothecium roseum* (ภาพที่ 5) และ *Ophisophaerella herpotricha* นอกจากนั้นยังมีการรายงานถึงประสิทธิภาพและความสามารถในการออกฤทธิ์ของ destruxin อย่างแพร่หลาย ทั้งงานวิจัยทางด้านการแพทย์ และงานวิจัยทางด้านการเกษตร (Samuels, 1988; Odier et. al.,1992; Chen et al., 1997; Boucias and Pendland, 1998; Kobayashi et. al., 2004; Pal et. al., 2007)



Dtx A. R= -CH=CH$_2$
Dtx B. R= -CH-(CH$_3$)$_2$
Dtx E. R= -HC—CH$_2$
O

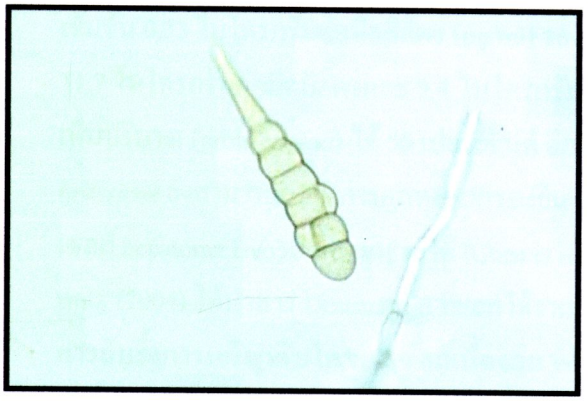
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสาร destruxin A, B และ E

ที่มา : Rao และคณะ (2006)

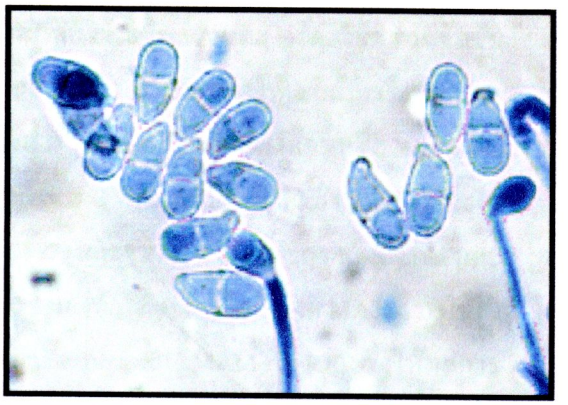
ตารางที่ 1 สารพิษของเชื้อราก่อโรคแมลงบางชนิด

สารพิษ (toxin)	เชื้อรา (fungal source)	กลไกการออกฤทธิ์เฉพาะ /กิจกรรมทั่วไป (specific mode of action or general activity)
Azoxybensenoid	*Entomophthora virulenta*	เป็นพิษหลายลักษณะ
Cordycepin	*Cordyceps*	ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA
Beauvericin	*Beauveria bassiana, Paecilomyces, Fusarium*	Ionophore เช่นละลายในชั้นไขมันของเซลล์เมมเบรน เพิ่มการขนถ่ายสารละลายไอออนซึ่งส่งผลทำลายการทำงานของเซลล์ และ/หรือ organelle
Bassianolide	*B. bassiana*	Ionophore
Cyclosporin A	*B. bassiana, Tolypocladium, Verticilliun, Fusarium*	ขัดขวางแคลเซียมไอออนในขั้นตอน transduction pathway ของ T-cell ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ช่วยยับยั้งภูมิคุ้มกัน และกดเซลล์ภูมิคุ้มกันของแมลง
Oosporein	*Beauveria bassiana*	เม็ดสีแดง; สารปฏิชีวนะ
Oxalic acid	*Beauveria brongniartii*	
Destruxins (A-E)	*Metarhizium anisopliae, Aspergillus ochraceus*	มีผลต่อช่องทางแคลเซียมไอออนของเยื่อกล้ามเนื้อ (A, B); กดภูมิคุ้มกันและมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ (C, E)
Cytochalasins	*Metarhizium anisopliae*	ยับยั้งการยืดของ actin filament
Swainsonine	*Metarhizium anisopliae*	Indolizidine alkaloid
Hirsutellin A	*Hirsutella thompsonii*	เป็นโปรตีนขัดขวางไรโบโซม (ribosomal-inhibiting protein, RIP) ทำให้เกิดการตัดที่จำเพาะบน rRNA และยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน
Efrapeptins	*Tolypocladium inflatum*	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ของไมโตคอนเดรีย
Aflatoxins	*Aspergillus*	มีผลต่อกลไกการสืบพันธุ์ในแมลง และเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์มีกระดูกสันหลัง
Kojic acid	*Aspergillus flavas*	สารปฏิชีวนะ
Restrictocin	*Aspergillus fumigatus*	RIP-type toxin

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Boucias และ Pendland (1998)



ภาพที่ 4 เชื้อรา *Alternaria brassicae*
ที่มา: Anonymous (2007)



ภาพที่ 5 เชื้อรา *Trichothecium roseum*
ที่มา: Mycology online (2006)

โดยทางด้านการเกษตรพบว่า destruxin A และ B มีฤทธิ์ส่งผลให้เกิดอัมพาตในตัวอ่อนของแมลง โดยจะมีผลต่อช่องทางของแคลเซียม (calcium channel) ภายในผนังของกล้ามเนื้อของตัวแมลง (Boucias and Pendland, 1998) อีกทั้งได้มีการนำเอาสาร destruxin A จากเชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ทดสอบกับ หนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) โดยที่ปริมาณที่ต่ำระดับ 35 พิโคโมล (pmol) พบว่า มีผลต่ออัตราเต้นของหัวใจของหนอนเป็นอย่างมาก (Samuels, 1988) Pal และคณะ (2007) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ destruxin A เช่นกัน โดยพบว่าเมื่อฉีดสาร destruxin A เข้าไปในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) พบการลดลงของการแสดงออกของโปรตีน antimicrobial ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็น humoral immune response ของแมลงหวี่ ในส่วนของสาร destruxin B ยังพบว่ามีความเป็นพิษต่อพืชสกุล *Brassica* (กะหล่ำ) (Buchwaldt and Jensen, 1991) และ destruxin E จะออกฤทธิ์ยับยั้งระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งส่งผลให้เซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (cytopathic effect) ที่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของแมลงสองปีก (order Diptera) หลายชนิด และทำลายภายในไมโตครอนเดีย รวมถึงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับโครงสร้างทางจุลภาค (ultrastructure) ของ endoplasmic reticulum (ER) และ นิวเคลียส (Boucias and Pendland, 1998) ซึ่ง Dumas และคณะ (1996) ได้ทดลองถึงผลของสาร destruxin E ต่อเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (cell line) ของแมลงกลุ่ม Lepidopteran โดยพบว่ามีอิทธิพลต่อกระแสของแคลเซียม (calcium flux) และโปรตีนในขบวนการ phosphorylation ของ cell line แมลง

ในทางการแพทย์ Odier และคณะ (1992) ได้ทดสอบสาร destruxin A, B และ E ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือด P388 (leukemic cell) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง destruxin E มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญ (antiproliferative) ของเซลล์มะเร็งมากที่สุด โดยใช้ที่ความ

เข้มข้น 0.33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) รองลงมาคือ destruxin A และ Bโดยใช้ความเข้มข้น 11.7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและ 9.4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้เซลล์มะเร็งหยุดการเพิ่มปริมาณ (proliferation) ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งสาร destruxin B ที่สกัดได้จากเชื้อ *Alternaria brassicae* ยังสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน hepatitis B viral surface antigen (HBsAg) ภายในเซลล์ hepatoma Hep3B ของมนุษย์ได้ (Chen et al., 1997) และจากการทดลองของ Kobayashi และคณะ (2004) ได้นำสาร Destruxin E ที่แยกได้จากเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลต MA324 มาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอก v-Ki-ras-expressed pMAM-ras-REF ซึ่งให้ผลการยับยั้งเซลล์เนื้องอกได้เช่นกัน

ทางด้านการศึกษาวิจัยในการเพิ่มผลผลิตของ destruxin จากเชื้อ *Metarhizium* app. นั้น มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อ การผลิตของ destruxin A และ B จากเชื้อไอโซเลต MaQ10 พบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด destruxin A คือ ที่หัวเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ pH 9.0 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบในการเขย่า 240 รอบต่อนาที สามารถผลิตได้ 189.13 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัด destruxin B คือ ที่หัวเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์ pH 9.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วในการเขย่า 220 รอบต่อนาที สามารถผลิตได้ 43.35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (Hu et al., 2006) รวมทั้งสารอาหาร โดย Liu และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตสาร destruxin A และ B จากเชื้อ *M. anisopliae* พบว่าเมื่อเพิ่ม β-alanine 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารพื้นฐาน (basal media) สามารถเพิ่มปริมาณของสาร destruxin A และ B ได้ 7.2 และ 279 มิลลิลิตรต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่า 2 เท่าของกรรมวิธีควบคุม และพบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้เพิ่มผลผลิตของสาร destruxin A คือ maltose 2.58 เปอร์เซ็นต์, peptone 0.72 เปอร์เซ็นต์, β-alanine 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ glucose 0.55 เปอร์เซ็นต์ ส่วนของสาร destruxin B คือ maltose 2.51 เปอร์เซ็นต์, peptone 0.75 เปอร์เซ็นต์, β-alanine 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ glucose 0.43 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้ง Liu และ Tzeng (1999) ได้ศึกษาพบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* บนอาหารแข็งที่มีส่วนประกอบของข้าวรำข้าว หรือแกลบเพื่อผลิตสาร destruxin A และ B โดยพบว่าปริมาณสารที่ได้คือ 2.9 และ 227 มิลลิกรัมต่ออาหารแข็งหนึ่งกิโลกรัม (mg/kg) ตามลำดับ ส่วนการศึกษาในการตรวจหาสาร destruxin ด้วยการใช้วิธี thin layer chromatography (TLC) นั้น Samuels และคณะ (1998) พบว่าค่าอาร์เอฟ (*R f*) ของสาร destruxin อยู่ในช่วง 0.65-0.85

1.4 เอนไซม์ย่อยผนังลำตัวแมลง

จากการศึกษาของ K. Charnley มหาวิทยาลัย Bath และ R. St. Leger จากสถาบัน Boyce Thompson ได้พบว่าเอนไซม์ย่อยผนังลำตัวแมลง (cuticle-degrading enzyme) เชื้อ *M. anisopliae* สร้างมานั้นจะทำงานร่วมกัน และบางเอนไซม์จะทำงานคล้ายกัน แต่เอนไซม์เหล่านั้นจะถูกควบคุมการผลิตโดยยีน (gene) ต่างชนิดกัน ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ซับทิลลิสินไลค์ โปรตีเอส (subtilisin-like proteinase, Pr1), เมทาลโลโปรตีเอส (metalloprotease), ทริปซิน (trysin), อะมิโนเปปติเดส และ ไดเปปติดัลเปปติเดส (aminopeptidase and dipeptidyl peptidase) และไคติเนส (chitinase) (ตารางที่ 2) (Boucias and Penland, 1998)

จากการศึกษาของ St. Leger และคณะ (1998) พบว่า ความสามารถในการสร้าง cuticle-degrading เอนไซม์ย่อยผนังลำตัวของเชื้อ *M. anisopliae* ยังขึ้นอยู่กับค่า pH โดยค่า pH ที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์แอสพาทิลโปรตีเอส (aspartyl protease) คือที่ pH เท่ากับ 3 ไคติเนสมีค่า pH เท่ากับ 5 ซึ่งจะพบว่าอยู่ในช่วงที่เป็นกรด ในขณะที่อะมิโนเปปติเดส ค่าpH อยู่ที่ 7 และเมทาลโลโปรตีเอสค่า pH จะอยู่ในช่วง 6-8 แต่เอนไซม์ที่จะแสดงออกก่อนนั้นจะเป็นเอนไซม์ ซับทิลิซินไลค์โปรตีเอส (Pr1), ทริปซินไลค์โปรตีเอส (Pr2) และ เมทาโลโปรตีเอส เมื่อโปรตีนบนผนังลำตัวแมลงสูญเสียสภาพเอนไซม์ ไคติเนสจึงจะมีการแสดงออกตามมา

Pr1 เป็น chymoelatase-like protease ที่น้ำหนักของ mature molecule อยู่ที่ประมาณ 28.6 กิโลดาลตัน (kDa) เป็นโปรตีนพื้นฐานที่มีค่า iso-eletricpoint มากกว่า 10 (pI > 10) ที่มีฤทธิ์เป็น broad primary specificity แต่เอนไซม์จะสามารถย่อยกรดอะมิโน (amino acid) ที่มี hydrophobic side ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 (alanine, methionine, phenylalanine) ลำดับกรดอะมิโนของ Pr1 จะคล้ายกับ ซับทิลิซิน (subtilisin) ซึ่งเป็น subclass ของเอนไซม์เซอรีนโปรตีเอส Pr1 (serine proteases Pr1) สามารถย่อย bovine serum albumin (BSA), คอลลาเจน (collagen), เคซีน (casein), และอีลาสติน (elastin) เช่นเดียวกับผนังลำตัวแมลง เอนไซม์นี้ยังเป็นโปรตีนตัวสำคัญที่ผลิตขึ้นในช่วงที่เชื้อ *Metarhizium* spp. สร้าง appressorium บนผนังลำตัวของแมลงในระหว่างที่มีการทำลายแมลง การเปลี่ยนสภาพของเชื้อ *Metarhizium* จากผู้ย่อยสลายเป็นเชื้อก่อโรคนั้นสารอาหารจากผนังลำตัวแมลง อาจจะเป็นตัวชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวโดย Pr1 จะพบอยู่รอบๆ บริเวณ appressorium, ผิว penetrate hypha และบริเวณชั้นของผนังลำตัว (procuticle) ของแมลงที่ถูกเข้าทำลาย (Goettel et al, 1989, cited after Boucias and Penland, 1998)

ตารางที่ 2 ชนิดและหน้าที่ของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อ *Metarhizium anisopliae*

เอนไซม์ (enzyme)	ชั้น (class)	น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight)	ความจำเพาะกับสารที่ย่อย (substrate specificity)	หน้าที่ (probable functions)
Endoproteases				
Pr1[1]	Serine protease subtilisin subclass	~28.6 kDa	ผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง BSA, คอลลาเจน, อีลาสติน, เคซีน	ทำลายผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง
Pr2	Trypsin-like serine protease	~28.5 kDa	Casein	ควบคุมการพัฒนาการของเชื้อรา
Pr3-4	Cysteine protease (Pr4)	26.7 kDa (Pr4)		
Metalloprotease		Isozymes	ผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง, elastin, gelatin	ส่งเสริมการทำงานของ Pr1
Exoproteases				ย่อยสลาย peptide ที่เป็นผลจากการย่อย
aminopeptidase	M class; metal ion requirement	33 kDa	ผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง	โดย Pr1 และ Pr2
dipeptidylpeptidase	Serine hydrolase	74 kDa	ผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง	
carboxypeptidase	Serine Carboxypeptidase	30 kDa	ผนังลำตัวชั้นนอก	
Esterases	Serine Carboxyesterase	Isozymes	กรดไขมันสายสั้นๆ	เข้าทำลายผนังลำตัวชั้นนอกของแมลง
Lipases	"True" lipases		น้ำมันมะกอก	ย่อย epicuticular lipoprotein
Chitinases	Hydrolase	Isozymes (e.g. 48 kDa)	ไคติน	ช่วยให้เส้นใยของเชื้อเจริญบนตัวแมลง
Chitobiase	Hydrolase	~120 kDa	N-acetylglucosamine	

[1/] Pr1 รวมซับทิลิซิน (subtilisin) ทั้ง 2 ชนิด Pr1a และ Pr1b

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Boucias และ Penland (1998)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 24 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 203335
เลขเรียกหนังสือ

จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่ย่อยสลายผนังลำตัวของแมลง Tiago และคณะ (2002) พบว่าเชื้อ *M. flavoviride* CG423 ซึ่งเป็นไอโซเลตท้องถิ่นในประเทศบราซิล โดยสามารถตรวจพบ Pr1 ได้เพียงในอาหารที่มีผนังลำตัวของตั๊กแตน (*Schistocerca pallens*) ในทางตรงกันข้ามจะพบ Pr2 ในอาหารที่ผสมผนังลำตัวของตั๊กแตนชนิดนี้น้อยกว่าในอาหารที่ไม่ผสมผนังลำตัวของตั๊กแตน และในปีเดียวกัน Pinto และคณะ (2002) ได้ศึกษาเอนไซม์โปรตีเอสย่อยผนังลำตัวของเชื้อ *M. flavoviride* โดยทดลองใช้อาหาร 3 แบบคือ mineral medium (MM) ที่มีไนเตรต, MM ผสมผนังลำตัวของตั๊กแตน (*Rhammatocerus schistocercoides*) และ MM ผสมcasein เป็นส่วนผสม ผลการทดลองพบว่า เกือบทุกไอโซเลตที่เลี้ยงในอาหาร MM ที่ผสมผนังลำตัวของตั๊กแตน มีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดกว่าอาหารชนิดอื่น และยังตรวจพบ Pr1 มากกว่า Pr2

นอกจากเอนไซม์ Pr1 และ Pr2 ที่พบในเชื้อ *M. anisopliae* แล้วยังพบเอนไซม์กลุ่ม endoprotease อีกหลายเอนไซม์ เช่น Pr1b, Pr2, Pr3 และ Pr4 รวมทั้ง metalloprotease ซึ่งทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นด่าง อย่างไรก็ดีเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีบทบาทในการย่อย cuticle ของแมลงน้อยกว่า Pr1 และ Pr2 (St. Leger et al., 1993, cited after Boucias and Penland, 1998)

1.5 ประโยชน์ของเชื้อ

ได้มีการนำเชื้อ *Metarhizium* spp. มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูหลายชนิดทั้งในและต่างประเทศอย่างแพร่หลาย เช่น Ansari และคณะ (2006) ได้นำเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 มาทดสอบความสามารถในการควบคุมเพลี้ยไฟ (*Frankliniella occidentalis*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิด อีกทั้งยังเป็นพาหะของไวรัสที่อันตรายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิด โดยจากการทดสอบ พบว่าสามารถฆ่าดักแด้ของเพลี้ยไฟได้ 70 - 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่สารฆ่าแมลงให้ผลเพียง 20 - 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Acevedo และคณะ (2007) ได้นำเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต Lpp45 และ Lpp39 มาใช้ร่วมกับไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis bacteriophora* ไอโซเลต JPM4 เพื่อควบคุมหนอนเจาะกออ้อย (sugar cane borer; *Diatraea saccharalis*) พบว่า ไส้เดือนฝอยไอโซเลต JPM4 ร่วมกับเชื้อราเขียวไอโซเลต Lpp39 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนเจาะกออ้อยได้ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่า LT_{50} (mediean lethal time) และ LT_{95} อยู่ที่ 1.8 และ 2.8 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้มีการทดลองของ Fagade และคณะ (2004) ซึ่งใช้เชื้อราขาว *Beauveria bassiana* ไอโซเลตท้องถิ่น และ *Metarhizium* sp. สูตรน้ำมันควบคุมตั๊กแตน (*Zonocerus variegatus*) จากการทดลองพบว่า ค่า LT_{50} ของเชื้อ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 4.6 และ 3.8 วัน ตามลำดับ ส่วนของเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่ความเข้มข้น 10^3 และ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ค่า LT_{50} เท่ากับ 9 และ 2.8 วัน ตามลำดับ และยังมีการทดลองโดยใช้เชื้อ *M. anisopliae* ควบคุมหนอนเส้นลวด (wireworm, *Agriotes obscurus* L.) ศัตรูข้าวโพด

โดยวิธีคลุกเมล็ดข้าวโพดร่วมกับเชื้อ *M. anisopliae* ผลการทดลองพบว่าการใช้เชื้อ *M. anisopliae* เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารเคมี clothianidin และ spinosad ทำให้ข้าวโพดมีต้นรอดตายเป็น 78 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่ได้ใช้เชื้อราขียวนั้นมีต้นรอดตายเพียง 67 เปอร์เซ็นต์และทำให้ผลผลิตน้ำหนักสดของข้าวโพดเพิ่มขึ้น เช่นกัน (Kabaluk and Ericsson, 2007) สำหรับ Campbell และคณะ (2006) ได้นำเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลตเลขที่ 62176 จาก American Type Culture Collection (ATCC) ในรูปเม็ด (granule) หรือสารแขวนลอยสปอร์ (aqueous spray) หรือใช้ร่วมกันทั้ง 2 รูปแบบ มาทดสอบเพื่อควบคุมหนอนแมลงวันเจาะหัวผักกาดหวาน (*Tetanops myopaeformis* Röder) ในสภาพไร่ โดยรูปแบบเม็ดซึ่งมีความเข้มข้นของสปอร์ 4 x 10^{12} หนึ่งครั้ง 8 x 10^{12} สองครั้ง และ1.6 x 10^{13} ต่อเฮกตาร์ (ha) สี่ครั้ง และสารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้น เช่นเดียวกับรูปแบบเม็ด แต่ใช้เพียงครั้งเดียวในทุกความเข้มข้น ในช่วงปี 2001-2002 ผลการทดลองพบว่า การใช้เชื้อรูปแบบเม็ดที่มีการใช้หลายครั้งนั้นให้ผลที่สอดคล้องกับปริมาณผลผลิต โดยได้ผลผลิตน้ำตาลเพิ่มขึ้นประมาณ 171 กิโลกรัมต่อเฮกตาร์ แต่ผลในการควบคุมการทำลายหนอนแมลงวันเจาะหัวผักกาดหวานของเชื้อราขียวในต้นฤดูปลูกนั้นน้อยกว่าการใช้สารเคมีฆ่าแมลง

ทั้งนี้ได้มีการนำเชื้อมาใช้ควบคุมแมลงที่เป็นปรสิตภายนอกของสัตว์ด้วย โดย Bahiense และคณะ (2006) ได้ใช้เชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ควบคุมเห็บวัว (*Boophilus microplus*) ซึ่งเป็นปรสิตสำคัญที่ทำให้ปริมาณน้ำนมและผลผลิตวัวเนื้อต่ำ การใช้เชื้อ *M. anisopliae* และสารเคมีฆ่าเห็บ (deltamethrin) ร่วมกับควบคุมเห็บในระดับห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวอ่อนเห็บ ที่ต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเห็บ กลุ่ม pyrethroid (deltamethrin) ถ้าใช้เชื้อร่วมกับสารเคมีเห็บมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยอยู่ในช่วง 13.5 - 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใช้เชื้อหรือสารเคมีเพียงอย่างเดียวเห็บมีเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ในช่วง 10 - 96.9 เปอร์เซ็นต์ และ 7 - 36.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน Alonso-Díaz และคณะ (2007) ได้ทดลองควบคุมเห็บชนิดเดียวกัน โดยใช้เชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต Ma34 ที่ความเข้มข้น 1 x 10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร พ่นลงไปบนตัวของวัวทุกๆ 15 วัน พบว่าสามารถลดปริมาณของเห็บลงได้ 40 - 91.2 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งได้มีการนำเชื้อ *M. anisopliae* มาควบคุมเหาวัว (*Bovicola bovis*) โดยการใช้เชื้อ *M. anisopliae* ที่ความเข้มข้นของสปอร์ 1 x 10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร นั้นทำให้เหาติดเชื้อ 71 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบในวัว ด้วยเชื้อ 2 รูปแบบ คือผสมด้วย Tween 80 และ silicon oil ที่ความเข้มข้น 1 x 10^{8} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในสภาพควบคุมสภาพแวดล้อม พบว่าเหาติดเชื้อเฉลี่ย 73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งสองกรรมวิธี (Briggs et al., 2006)

2. ยุงลายบ้าน

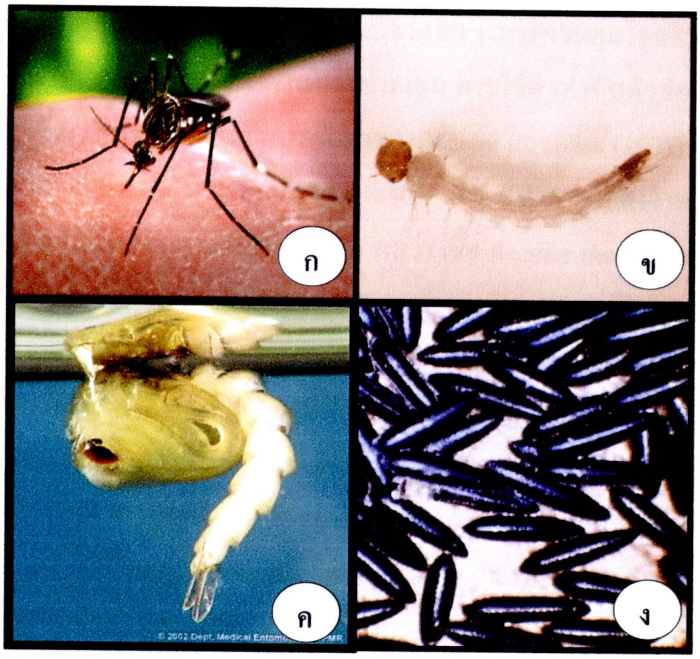
2.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) จัดเป็นแมลงใน genus *Aedes* มีวงจรชีวิต 4 ระยะคือ ระยะไข่ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกระสวย เมื่อวางออกมาใหม่ๆ มีสีขาวนวล ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำสนิทภายใน 24 ชั่วโมง ในระยะลูกน้ำไม่มีขา ส่วนอกมีขนาดใหญ่กว่าส่วนหัว ส่วนท้องยาวเรียว ประกอบด้วยปล้อง 10 ปล้อง มีท่อหายใจอยู่บนปล้องที่ 8 และมีกลุ่มขน 1 กลุ่มอยู่บนท่อหายใจ ระยะตัวโม่ง (ดักแด้) ในระยะนี้ส่วนหัวจะอยู่ติดกับส่วนอก และระยะตัวเต็มวัยแบ่งเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้อง มีเกล็ดสีดำสลับขาวตามลำตัว รวมทั้งส่วนหัวและส่วนอก ปีกบางใส มีเกล็ดเล็กๆบนเส้นปีก ลักษณะของเกล็ดแคบ ยาว บนขอบหลังของปีกมีเกล็ดเล็กๆเป็นชายครุย (ภาพที่ 6) (คลังปัญญาไทย, 2553)

2.2 ความสำคัญ

ยุงลายบ้านจัดเป็นแมลงพาหะที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่ง โดยเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสโรคที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคไข้เลือดออก (dengue fever) โรคไข้เหลือง (yellow fever) และโรคชิคุนกุนยา (chikungunya) (Platt et al., 1997; Harringtonet al., 2001; MacKenzie et al., 2004) สำหรับพฤติกรรมของยุงลายบ้านจะพบมากในเขตเมืองหรือชุมชนแออัด โดยอาศัยในน้ำสะอาด เช่น ตุ่มน้ำ อ่างน้ำ แจกันดอกไม้ น้ำในขารองตู้ รวมถึงภาชนะต่างๆ ที่มีน้ำขังอยู่ ยุงลายโดยทั่วไปจะออกหากินหรือดูดเลือดในเวลากลางวัน มีรัศมีบินประมาณ 100 เมตร จึงมักพบอาศัยอยู่ใกล้กับที่อยู่อาศัยของมนุษย์ แต่ถ้าหากในช่วงเวลากลางวันยุงลายดูดเลือดหรือกินเลือดได้ไม่อิ่ม ก็จะออกหากินในเวลาพลบค่ำอีกด้วย ถ้าในห้องนั้นหรือพื้นที่นั้นมีแสงสว่างเพียงพอ สำหรับช่วงเวลาที่ ยุงลายออกหากินมี 2 ช่วง ช่วงเช้าระหว่างเวลา 09.00 – 11.00 น. และช่วงบ่ายเวลา 13.00 – 14.30 น. บางรายงานก็ระบุแตกต่างออกไป เช่น ระหว่าง 06.00 – 07.00 น. และ 17.00 – 18.00 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กลับฤดูกาล จากการศึกษาพฤติกรรมของยุงลายบ้านในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่าจะออกหากินมากที่สุดในช่วงเช้าเวลา 09.00 – 10.00 น. และช่วงบ่ายเวลา 6.00 – 17.00 น. (บัญญัติ, 2546)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 6 ระยะการเจริญของยุงลายบ้าน

ก ตัวเต็มวัย ข ลูกน้ำ

ค ตัวโม่ง ง ไข่

ที่มา: ภาพ ก และ ข; Wikipedia (2009); ภาพ ค; NSW Health (2009); ภาพ ง; Center for biologic counterrorism and emerging diseases (2009)

2.3 การป้องกันกำจัด

ในการป้องกันกำจัดยุงลายนั้นสามารถทำได้หลายวิธี ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย เช่นการลดแหล่งเพาะพันธุ์ของยุงลาย อาทิ การปิดฝาภาชะใส่น้ำให้มิดชิด หมั่นเปลี่ยนน้ำในภาชนะทุกๆ 7 วัน กำจัดเศษวัสดุที่จะเป็นแหล่งน้ำขัง รวมถึงการใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัด ตัวอย่างเช่นทรายอะเบท ผสมน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม (ทรายอะเบท 1 กรัมต่อ น้ำ 10 ลิตร) (สีวิกา, 2553) ซึ่งการใช้สารเคมีในการฉีดพ่น สารเคมีที่ใช้ควรมีคุณสมบัติที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดยุง สามารถทำให้ยุงตายทันทีเมื่อสัมผัสสารเคมี มีฤทธิ์ตกค้างนาน แต่มีพิษน้อยต่อคนและสัตว์ อย่างไรก็ตาม การพ่นสารเคมีต้องกระทำอย่างระมัดระวังและถูกวิธี เพื่อลดอันตรายที่จะ

เกิดขึ้นต่อผู้ใช้ ประชากร และสัตว์เลี้ยง (สำนักโรคติดต่อจากแมลง, 2553) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากผลเสียอย่างมากมายที่เกิดขึ้นจากการใช้สารเคมีฆ่าแมลง เช่น สิ่งแวดล้อมเป็นพิษ แมลงดื้อต่อสารเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งอันตรายต่อผู้ใช้ และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ การควบคุมโดยชีววิธี จึงกลายเป็นทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความนิยมอย่างมากในปัจจุบัน เช่น การใช้ตัวห้ำกับตัวอ่อนของยุง การใช้เชื้อจุลินทรีย์ อาทิ เชื้อแบคทีเรีย โดยจากการศึกษาของ Mercer และคณะ (1995) ถึงความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรียต่อตัวอ่อนของยุง ได้ทดสอบแบคทีเรีย 3 ชนิด ที่ทำลายแมลงจำนวน 13 สายพันธุ์ (strain) ต่อยุง 3 ชนิดในประเทศ French Polynesia พบว่า เชื้อ *Bacillus thuringiensis* 2 สายพันธุ์มีพิษสูงต่อยุง *Ae. polynesiensis, Ae. aegypt, และ Culex quinquefasciatus* อีกทั้ง 6 ใน 7 สายพันธุ์ของเชื้อ *B. sphaericus* มีพิษสูงต่อยุง *Cx. quinquefasciatus* แต่ไม่มีพิษกับยุง *Aedes* spp. และเชื้อ *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia* มีพิษมากต่อ *Ae. polynesiensis* มากกว่าเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิดที่นำมาทดสอบ นอกจากนั้นยังมีการใช้เชื้อราเช่น เชื้อ *Metarhizium* spp. โดยมีการนำเอาเชื้อ *M. anisopliae* มาใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงพาหะของโรคมาลาเรีย 2 ชนิด คือ ยุงก้นปล่อง (*Anopheles gambiae* s. s.) และยุงรำคาญ (*Cx. quinquefaciatus*) พบว่าอัตราการตายของยุงทั้งสองชนิดที่ถูกนำมาทดสอบด้วยเชื้อจะเร็วกว่าเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และเมื่อนำรูปแบบสปอร์แขวนลอยในน้ำมันของเชื้อที่ความเข้มข้น 1.6×10^{7}- 1.6×10^{10} สปอร์ต่อตารางเมตรจะให้ค่า LT_{50} อยู่ระหว่าง $9.69 \pm 1.24 - 3.89 \pm 0.35$ วัน ทั้งนี้ทำให้อัตราการติดเชื้อเท่ากับ 4.4 - 83.7 เปอร์เซ็นต์ (Scholte et. al., 2003) ต่อมา Scholte และคณะ (2004) ได้ทดลองนำเชื้อ *M. anisopliae* มาทดสอบกับยุง *An. gambiae* s.s. ในสภาพห้องปฏิบัติการ เพื่อศึกษาการติดเชื้อและแพร่ระบาดในสภาพแวดล้อม (horizontal transmission) พบว่าอัตราการติดเชื้อของยุงตัวผู้อยู่ในช่วง 10.7 ± 3.2 - 33.3 ± 3.8 เปอร์เซ็นต์ การติดเชื้อที่เกิดจากการถ่ายทอดเชื้อ (horizontal transmission) โดยไม่มีความแตกต่างของการอยู่รอด ระหว่างยุงตัวผู้จากการทดลองกับยุงกลุ่มกรรมวิธีควบคุม แต่ในหนึ่งการทดลองจากสามการทดลองนั้น ยุงตัวผู้ที่ติดเชื้อจะมีการอยู่รอดที่สั้นกว่ายุงที่ไม่ติดเชื้อ รวมทั้ง Kannan และคณะ (2008) ได้ทดสอบปลูกเชื้อ *M. anisopliae* ที่ความข้มเข้น 1×10^{6} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร กับตัวเต็มวัยของยุงก้นปล่อง (*Anopheles stephensi*) พบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อราเขียว 1×10^{6} โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ในน้ำมันและน้ำทำให้ยุงก้นปล่อง ตาย 96 และ 94 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับ Alves และคณะ (2002) ได้ทดลองโดยการใช้เชื้อราก่อโรคแมลง 2 ชนิดคือ *M. anisopliae* และ *B. bassiana* ทดสอบกับยุงรำคาญ (*Cx. quinguefasciatus*) แบบผสมผสาน สรุปว่าสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต 1037 เข้มข้น 1.97×10^{4} สปอร์ต่อมิลลิลิตร และ Mohanty และคณะ (2008) ทดลองใช้ culture filtrate ของเชื้อ *M. anisopliae* ที่เลี้ยงในอาหาร yeast-starch (YpSs) และ chitin broth (CB) เป็นเวลา 7 วัน สามารถควบคุมลูกน้ำของ

ยุงก้นปล่อง (*An. stephensi*) และลูกน้ำยุงรำคาญ (*Cx. quinquefasciatus*) ได้ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต 829 ในอาหาร chitin broth มีประสิทธิภาพในการควบคุมลูกน้ำยุงทั้ง 2 ชนิด และยังมีการทดลองใช้เชื้อ *Metarhizium* มาใช้ควบคุมยุงลายเช่นกันโดย Scholte และคณะ (2007) ซึ่งทดลองนำเชื้อ *M. anisopliae* มาทดสอบกับตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านและยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ที่ความเข้มข้น 1.6 x 10^{10} โคนิเดียต่อตารางเมตร โดยทาเชื้อบริเวณที่ยุงเกาะพัก (resting site) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อ *M. anisopliae* สามารถเข้าทำลายยุงลายบ้านและยุงลายสวน คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.1 ± 2.65 และ 89.3 ± 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าอายุของยุงที่ติดเชื้อจะลดลง เมื่อเทียบกับยุงที่ไม่ติดเชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) นอกจากนั้นยังได้มีการทดลองนำเชื้อ *M. anisopliae* มาทดสอบกับไข่ของยุงลายบ้าน พบว่ามีผลในการทำลายไข่ของยุงลายบ้านได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นสูง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อ *M. anisopliae* นี้ในการควบคุมยุงลายบ้านได้ดีในบริเวณที่มีการขยายพันธุ์ของยุง (Luz et al., 2008)

3. การโคลนยีน

การโคลนยีน (gene cloning) หมายถึง การแยกยีนหนึ่งที่สนใจ นำมาเพิ่มปริมาณให้ได้ปริมาณมากเท่าที่ต้องการ เพื่อใช้ในการศึกษา อาจจะถ่ายฝากยีนดังกล่าวลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อผลิตสารหรือให้แสดงลักษณะบางประการ เมื่อเตรียมดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตที่สนใจแล้วนั้น ไม่ว่าจะเป็นดีเอ็นเอจาก จีโนมทั้งหมด หรือ cDNA ต้องนำดีเอ็นเอดังกล่าวมาเชื่อมต่อกับพาหะ (เวคเตอร์, vector) ที่เหมาะสม แล้วจึงนำมาถ่ายฝากลงในเซลล์ผู้รับ (host cell)

3.1 ยีน

ยีน หมายถึง หน่วยของพันธุกรรมที่มีหน้าที่เฉพาะบางประการ สามารถถ่ายทอดลักษณะจากรุ่นหนึ่ง (generation) ไปยังอีกชั่วรุ่นหนึ่ง ในทางด้านเคมี ยีน คือ ส่วนของโมเลกุลดีเอ็นเอหรือกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ ที่มีส่วนประกอบย่อยเป็นเบส ฟอสเฟต และน้ำตาล 5 คาร์บอน ซึ่งดีเอ็นเอนี้มีโครงสร้างเป็นสายคู่ พันกันเป็นเกลียวคล้ายบันไดเวียนแต่ละขั้นเป็นตัวอักษรแต่ละตัว เมื่อยีนทำงาน กลไกของการสังเคราะห์โปรตีนเริ่มจาก ribosome จะอ่านรหัสในดีเอ็นเอ แล้วแปลออกมาเป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ที่นำไปเชื่อมต่อเป็นโปรตีนชนิดต่างๆ โปรตีนบางชนิดเป็นส่วนประกอบของสิ่งมีชีวิต บางชนิดทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ เช่น สร้างส่วนประกอบอื่นๆของเซลล์ หรือเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม การที่แต่ละยีนแต่ละโปรตีนมีหน้าที่โดยเฉพาะ ทำให้สามารถตัดยีนแต่ละยีนออกมาจากสิ่งที่มีชีวิตหนึ่งแล้วนำเข้าไปใส่ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่งได้ ซึ่งมีกลไกในการทำให้ยีนนั้นทำงานได้ในสิ่งมีชีวิตอีกชนิดหนึ่ง อาจ

เรียกสิ่งมีชีวิตที่มียีนที่ไม่ใช่ของตัวเองอยู่ด้วยว่า สิ่งมีชีวิตดัดแปรพันธุกรรม (genetically modified organism; GMOs) (ยงยุทธ, 2549)

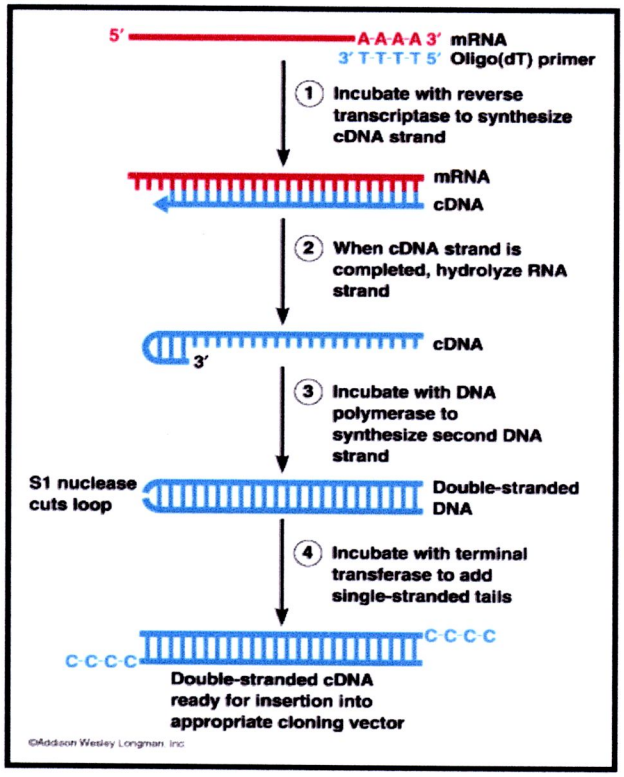
3.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ

หลักการเตรียมดีเอ็นเอ คือการนำเซลล์ที่ต้องการศึกษา มาทำให้แตกเพื่อสกัดเอาดีเอ็นเอภายในออกมา โดยอาศัย 2 กระบวนการคือ กระบวนการทางกายภาพ (physical) และทางเคมี (chemical) กระบวนการทางกายภาพ คือการใช้แรงทำให้ผนังเซลล์ (cell wall) ของชิ้นตัวอย่างถูกทำลาย เช่นการบดตัวอย่างโดยใช้ไกร่งร่วมกับไนโตรเจนเหลว หรือใช้เม็ด bead ส่วนกระบวนการทางเคมีพวก ดีเทอร์เจน (detergent) เช่น sodium dodecyl sulfate (SDS) หรือ sodium buroyl sarcosinate (sarkosyl) ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเนส เค เพื่อกำจัดขยะภายในเซลล์ และใช้สารละลายฟีนอล (phenol) เพื่อสกัดโปรตีนและเศษเซลล์ที่เหลือ จากนั้นใช้แอลกอฮอล์ (ethanol หรือ isopropanol) ละลายตะกอนดีเอ็นเอของตัวอย่าง (สุรินทร์, 2545)

3.2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจาก mRNA

mRNA เป็นผลผลิตของยีนบางยีนที่มีการแสดงออกในช่วงเวลา และในอวัยวะใดอวัยวะหนึ่งเท่านั้น ซึ่งในเซลล์ดังกล่าวนี้บางชนิดจะมีการสร้าง mRNA สำหรับยีนตัวหนึ่งมากกว่ายีนอื่นๆ ทำให้อัตราส่วนของ mRNA ชนิดนั้นๆ มีอยู่ในอัตราสูง จึงเป็นข้อดีในกรณีที่ต้องการศึกษายีนสำหรับสร้าง mRNA ชนิดนั้นๆ นอกจากนี้ดีเอ็นเอที่ได้จากการลอกรหัส (transcription) mRNA หรือ complementary DNA (DNA ที่มีเบสคู่สมกันกับ DNA หรือ RNA, cDNA) จะไม่มีส่วนอินทรอน (intron) เพราะ mRNA ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ได้ผ่านการแต่งเอาอินทรอนออกไปแล้ว

ขั้นตอนการสกัด mRNA มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA นั้นอาศัยคุณสมบัติของ mRNA ที่บริเวณปลาย 3' จะมีเบส A จำนวนมาก (poly A tail) จึงใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบด้วยเบส T หลายๆ เบส (oligo dT) เป็นไพรเมอร์ (primer) แล้วสังเคราะห์ cDNA สายแรกในทิศ 5' ไป 3' โดยเอนไซม์ reverse transcriptase แล้วย่อย mRNA ออกด้วยด่างเหลือไว้เพียง cDNA สายเดี่ยว ซึ่ง cDNA ที่ได้จะมีปลาย 3' ที่วกกลับมาคล้ายตะขอ จึงสามารถสังเคราะห์ cDNA อีกสายหนึ่งได้ทันทีโดยไม่ต้องใช้ไพรเมอร์ ทำให้ด้านหนึ่งของ cDNA จะเป็นปลายปิด จึงต้องใช้เอนไซม์ S_1 nuclease ตัดบริเวณดังกล่าว หรือใช้ RNase แทนการใช้ด่างในการย่อย mRNA โดยเอนไซม์นี้จะตัดอาร์เอ็นเอแบบสุ่มภายในสาย และอาร์เอ็นเอที่เกาะติดอยู่กับ cDNA จะทำหน้าที่เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ cDNA สายที่ 2 ต่อไป ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจาก mRNA

ที่มา: Department of Biology Memorial University of Newfoundland (2010)

3.2.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอโดยกระบวนการทางเคมี

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งการทำปฏิกิริยาจะทำในตัวทำละลายที่ไม่ใช่น้ำ และหมู่ ฟอสเฟตต้องอยู่ในสภาพว่องไวต่อปฏิกิริยา นอกจากนี้หมู่ฟังก์ชันอื่นที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาจะต้องถูกจับไว้ด้วยสารเคมีที่เหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการ การสังเคราะห์จะเริ่มจากปลายด้าน 3' บนหน่วยนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ตัวแรกซึ่งต่ออยู่กับสารซิลิกาที่เป็นของแข็ง เมื่อจะเริ่มการสังเคราะห์ หมู่ไดเมธอกซีไตรทิล (dimethoxytrityl) จะถูกกำจัดออกจากหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 5' ของดีออกซีไรโบส (deoxyribose) จากนั้น nucleoside ตัวที่ 2 จึงเข้าทำปฏิกิริยา หลังจากเกิดพันธะระหว่าง nucleoside ทั้ง 2 แล้ว จึงออกซิไดส์ (oxidise) ฟอสฟอรัส (phosphorus) ที่มีวาเลนซี 3 เพื่อเปลี่ยนให้เป็นวาเลนซี 5 ขั้นตอนทั้งหมดจะทำซ้ำไปเรื่อยๆ สำหรับ nucleoside ตัวต่อไป จนเมื่อได้ความยาวตามต้องการ จึงกำจัดสารที่จับหมู่ฟังชั่นต่างๆ และไฮโดรไลส์ (hydrolyse) เส้นดีเอ็นเอออกจากซิลิกา แต่เนื่องด้วยการสังเคราะห์จะได้ดีเอ็นเอสายเดี่ยว การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายคู่จึงต้องสังเคราะห์ทีละเส้น (นิสันต์, 2544)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3 การนำยีนหรือดีเอ็นเอเข้าเซลล์เจ้าบ้าน

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาจะต้องนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมเข้ากับเวคเตอร์ เพื่อนำเข้าเซลล์เจ้าบ้าน โดยโมเลกุลของเวคเตอร์จะประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่เป็นจุดเริ่มต้นการจำลองตัวเอง (origin of replication) ที่จะทำหน้าที่เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาในเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งเวคเตอร์มีหลายชนิดเช่น

3.3.1 พลาสมิด (plasmid) เป็นดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซม (extra chromosomal DNA) มีโครงสร้างเป็นวงแหวนเกลียวคู่ มีการพันเกลียวซ้อนเกลียว (supercoiled) มีขนาดประมาณ 1,000-2,000 คู่เบส สามารถใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 1-20 กิโลเบส

3.3.2 ฝาจแลมบ์ด้า (lamda phage) มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่ขนาดประมาณ 48,500 คู่เบส สามารถใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 18 กิโลเบส

3.3.3 คอสมิด (cosmid) เป็นเวคเตอร์ที่รวมเอาลักษณะของฝาจแลมบ์ดาและพลาสมิดรวมกัน สามารถใส่ชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ 37-52 กิโลเบส

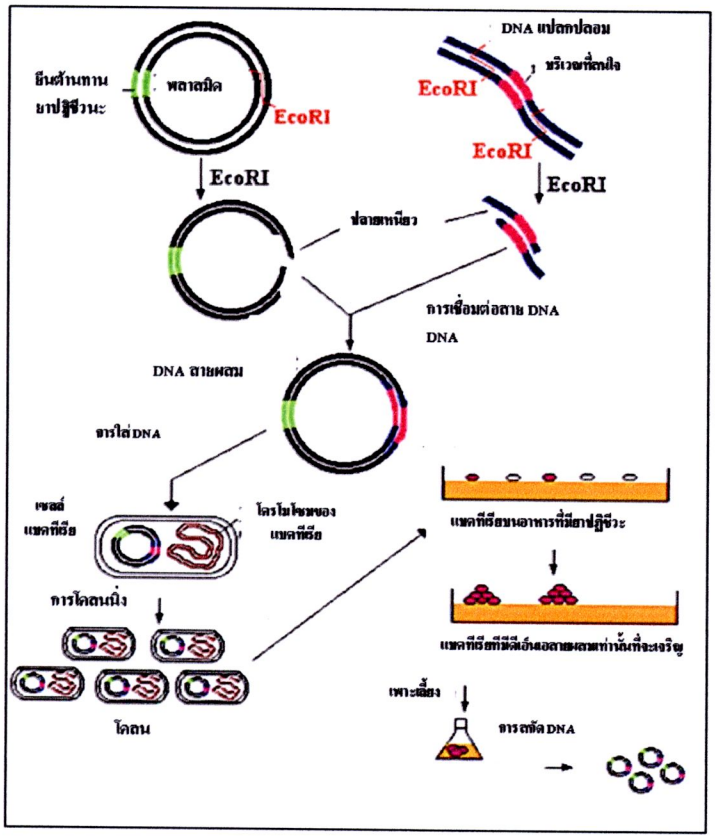
3.4 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ผู้รับ

เช่นเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ทำได้โดยทำให้เซลล์ผู้รับอยู่ในสภาพที่พร้อมหรือเหมาะสม เรียกว่า เซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) ซึ่งสามารถกระทำได้ด้วยการใช้สารเคมีกระตุ้น เช่น แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$), แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$), โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 42 องศาเซลเซียส หรือใช้ไฟฟ้าเพื่อให้เกิดรูหรือช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ หลังจากนั้นก็นำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าไปในเซลล์ผู้รับ เรียกกระบวนการนี้ว่าการทรานสฟอร์ม (tranformation) และเรียกเซลล์ผู้รับที่มีเวคเตอร์ลูกผสมนี้ว่า ทรานสฟอร์แมนต์ (transformant) เมื่อทรานสฟอร์แมนต์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนก็เท่ากับว่ายีนหรือดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปนั้นเพิ่มจำนวนด้วย

3.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ

เนื่องจากดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในเวคเตอร์มาจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อ เป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในสิ่งมีชีวิตนั้น (genomic DNA) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีจำนวนมาก หรือเป็นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์มาจากอาร์เอ็นเอก็มีจำนวนมากเช่นเดียวกัน เมื่อถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับแล้วจึงมีเซลล์จำนวนมาก และแต่ละเซลล์ได้รับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เรียกว่าเป็นห้องสมุด ดีเอ็นเอ (DNA library) จึงมีความจำเป็นต้องเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่ต้องการด้วยวิธีการตรวจสอบแบบต่างๆ ได้แก่ การตรวจสอบจากลักษณะฟีโนไทพ์, การคัดเลือกด้วย immuno chemical โดยใช้แอนติบอดี (antibody) หรือเลือกโดยการทำโคโลนีไฮบริไดเซชัน (colony hybridization) ซึ่งเมื่อทำการคัดเลือกโคลนแล้ว นำโคลนที่ได้มาสกัดพลาสมิด และนำมาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคอิเล็ก

โทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของพลาสมิด และพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเออยู่ (พลาสมิดลูกผสม) (Alcamo, 1996; นิสันต์, 2544) ซึ่งตัวอย่างขั้นตอนการโคลนยีนแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ขั้นตอนการโคลนยีน

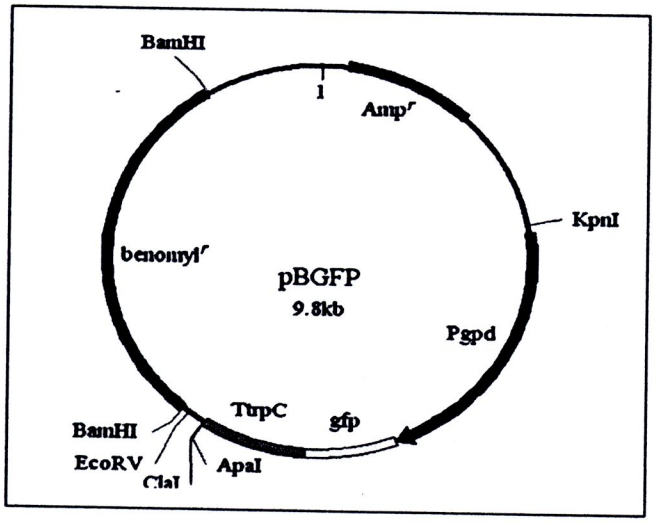
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Jakubowski (2005)

4. การศึกษาการโคลนยีนในเชื้อ *Metarhizium* spp.

เป็นที่ทราบกันว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อควบคุมทางชีวภาพ (biological control agent) ต่อแมลงศัตรูที่สำคัญได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ และเป็นมิตรต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งยังมีการผลิตออกมาในรูปแบบการค้าในหลายรูปแบบจึงได้มีผู้วิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มความสามารถ รวมทั้งประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ให้มีความสามารถในการเป็นเชื้อควบคุมทางชีวภาพ โดยการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) มาใช้ดังเช่น Wang และ St. Leger (2007) ได้นำยีนผลิตสารพิษต่อระบบประสาทของแมงป่อง (*Androctonus australis*) ถ่ายเข้าไปในยีนของเชื้อ *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มีความรุนแรง

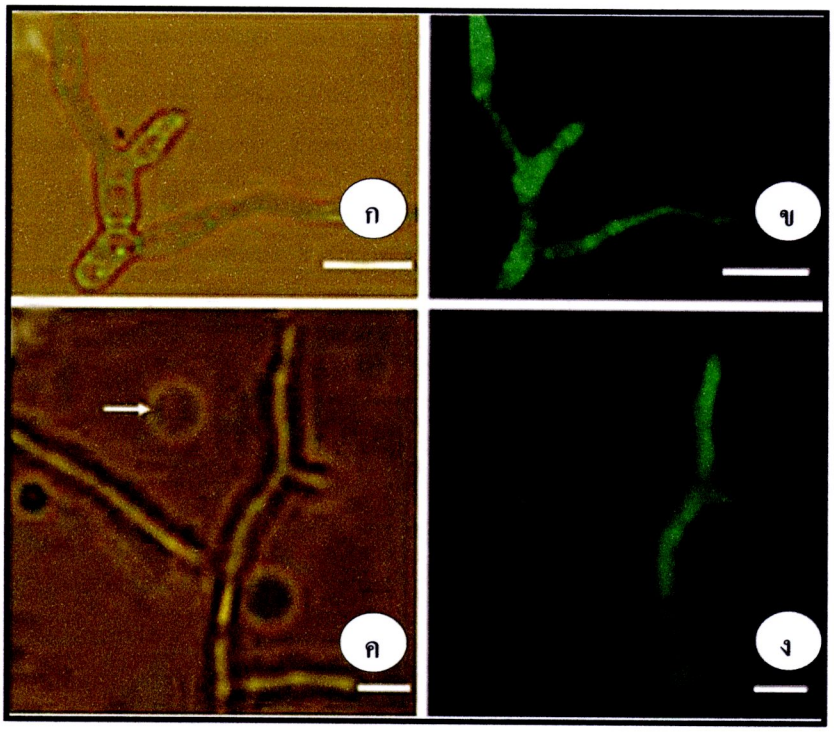
ต่ำ พบว่าสามารถเพิ่มความเป็นพิษของเชื้อรา *M. anisopliae* ต่อหนอนใบยาสูบ (tobacco horn worm, *M. sexta*) ได้ดีกว่าเชื้อ *M. anisopliae* ที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมถึง 22 เท่า และเป็นพิษต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านพาหะของโรคไข้เหลืองเพิ่มขึ้นกว่า *M. anisopliae* ที่ไม่ได้ดัดแปรพันธุกรรมถึง 9 เท่า อีกทั้งยังสามารถลดการเคลื่อนไหวและการกินของแมลงเป้าหมายได้อีกด้วย

เนื่องจากเชื้อ *M. anisopliae* มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูได้หลายชนิด และมีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ในการควบคุมแมลงด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งหากนำเชื้อ *M. anisopliae* ดัดแปรพันธุกรรมนี้ไปใช้ในสภาพจริงในธรรมชาติอาจมีความเสี่ยงต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาเพื่อตรวจหาและติดตามการเข้าทำลายของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ดัดแปรพันธุกรรมในสภาพไร่โดย Cao และคณะ (2007) ได้ใช้ยีน green fluorescent protein (*gfp*) ที่เรืองแสงเมื่อส่องใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลออเรสเซนต์ โดยใช้พลาสมิด pBGFP ที่มียีนต้านทาน benomyl เพื่อทำให้เชื้อ *M. anisopliae* ต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา benomyl เป็น selectable marker ดังภาพที่ 9 พลาสมิดดังกล่าวจะส่งถ่ายยีน *gfp* ซึ่งจากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เชื้อ *M. anisopliae* ดัดแปรพันธุกรรมสามารถเจริญได้อย่างปกติ และไม่สูญเสียความรุนแรงของเชื้อแต่อย่างใด marker ทั้ง 2 ให้ประโยชน์ทั้งการต้านทานต่อสารเคมีฆ่าเชื้อรา benomyl และสามารถใช้เพื่อช่วยในการตรวจติดตามสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมได้แม้กระทั่งหลังการติดเชื้อของแมลง (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 พลาสมิด pBGFP

ที่มา: Cao และคณะ (2007)



ภาพที่ 10 เส้นใยของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ที่ได้รับยีน *gfp* (green fluorescent protein)
ก เส้นใยของเชื้อดัดแปรพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา
ข เส้นใยของเชื้อดัดแปรพันธุกรรมเมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์
ค เส้นใยของเชื้อดัดแปรพันธุกรรมที่เก็บจากเลือดของตั๊กแตน (*Locusta migratoria*) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา
ง เส้นใยของเชื้อดัดแปรพันธุกรรมที่เก็บจากเลือดของตั๊กแตน(*Locusta migratoria*) เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

ที่มา: Cao และคณะ (2007)

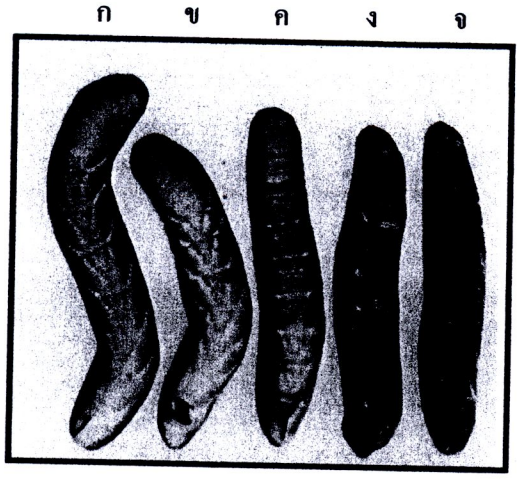
และจากการทดลองเพื่อศึกษาความคงทนของเชื้อในสภาพไร่นั้น Hu และ St. Leger (2002) ได้นำเอาเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลต ARSEF 1080 ที่ได้รับยีน green fluorescent (*gfp*) ของแมงกะพรุน [*Aequorea victoria* (GMa)] และได้รับยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส (*pr1*) ร่วมกับยีน *gfp* ของแมงกะพรุน (GPMa) มาทดสอบ พบว่ายีน *gfp* มีประโยชน์ต่อการศึกษาการเคลื่อนที่ของเชื้อ ทั้งยังพบว่าสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมไม่ถ่ายทอดไปยังแมลงนอกเป้าหมาย รวมทั้งไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อราที่อาศัยร่วมกันอย่างปกติในสิ่งแวดล้อมนั้น (indigenous fungal microflora) และพบว่าความคงทนของเชื้อสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมจะคงทนได้มากกว่า

1 ปีภายใต้สภาพแปลงปลูก โดยไอโซเลต GMa และ GPMa มีปริมาณของเชื้อลดลง 30 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ในช่วง 6 เดือน ตามลำดับซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ St. Leger และคณะ (1996) ซึ่งได้นำยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ cuticle-degrading protease (*pr1*) ใส่เพิ่มเข้าไปในจีโนม (genome) เชื้อ *M. anisopliae* (recombinant strain, ดัดแปรพันธุกรรม)จำนวน 3 ไอโซเลตคือ pBENA3 (กรรมวิธีควบคุมของสายพันธุ์ transformant), สายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมคือ *gpd*-Pr1-3 และ *gpd*-Pr1-4 โดยใช้ พลาสมิด pMAPR-1 ทำหน้าที่ส่งถ่ายยีนดังกล่าว นำมาทดสอบกับหนอนใบยาสูบ (*M. sexta*) วัย 5 และเปรียบเทียบผลกับเชื้อไอโซเลตดั้งเดิม (wild-type) โดยใช้ค่าความเข้มข้น 5 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (LC_{100}) ผลการทดลองพบว่า recombinant strain *gpd*-Pr1-4 ให้ค่า median survival time (ST_{50}) มีค่าอยู่ที่ 93 ชั่วโมง ในขณะที่ wild-type มีค่าอยู่ที่ 128 ชั่วโมง แตกต่างกันมากถึง 25 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 3 และยังว่าพบว่า recombinant strain *gpd*-Pr1-3 และ *gpd*-Pr1-4 ทำให้ตัวหนอนเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี (melanized) ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมไม่เกิด melanized ดังภาพที่ 11 ในหนอนที่ติดเชื้อ *M. anisopliae* จะพบ hyphal bodies (blastospore และเส้นใยสั้นๆ) ของเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเจริญภายในเลือดของตัวหนอนเพิ่มขึ้น 50 เท่า ในช่วง 90-120 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นมากถึง 2.3 x 10^7 cfuต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าในสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรม *gdp*-Pr1-4 พบว่าปริมาณเชื้อลดลง 30 เท่า ที่ median survival time (ST50 93 ชั่วโมง)

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนใบยาสูบ (tobacco hornworm, *Manduca sexta*) ที่ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรม

เชื้อรา	LC_{50} สปอร์/มล.xก. (95% fiducial limit)	ST_{50} /ชั่วโมง (95% fiducial limit)	น้ำหนักแห้งของอาหารที่ถูกกิน (กรัม) ± SEM
ไม่มี	-	-	6.25 ± 0.095
สายพันธุ์ดั้งเดิม	3.14 x 10^5 (2.03 - 5.54 x 10^5)	128 (120 - 136)	3.41 ± 0.085
gpd-Pr1-3	2.98 x 10^5 (1.85 - 5.50 x 10^5)	96 (92 - 106)	2.14 ± 0.078
gpd-Pr1-4	2.57 x 10^5 (1.85 - 5.32 x 10^5)	93 (88 - 102)	1.95 ± 0.073

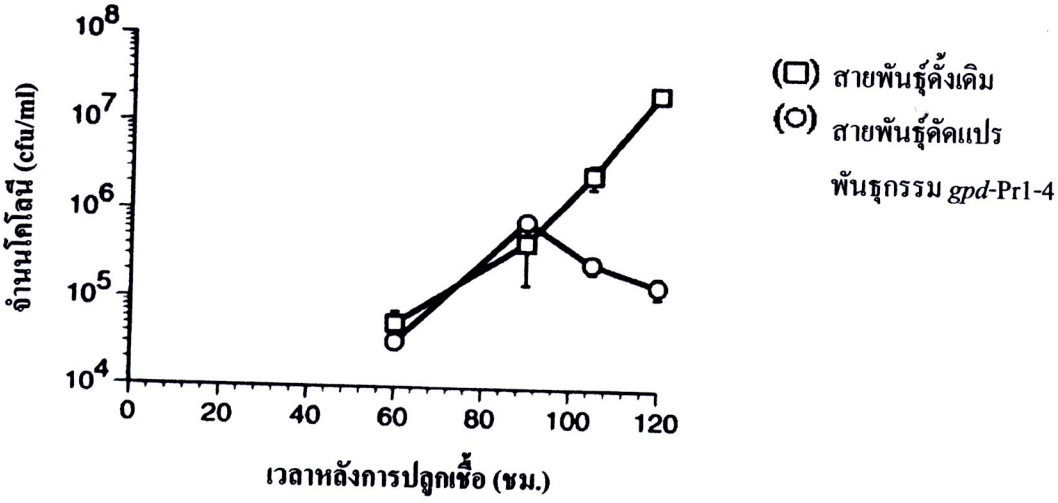
ที่มา: ดัดแปลงมาจาก St. Leger และคณะ (1996)



ภาพที่ 11 หนอนใบยาสูบ (tobacco hornworm, *Manduca sexta*) วัย 5 ที่ปลูกด้วยเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ที่ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ก กรรมวิธีควบคุม (ไม่มีการปลูกเชื้อ), ข ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type strain), ค ปลูกด้วยเชื้อที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด pBENA3, ง ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรม *gpd*-Prl-3 (หนอนเปลี่ยนสีผิว; melanized), จ ปลูกด้วยเชื้อดัดแปรพันธุกรรม *gpd*-Prl-4 (หนอนเปลี่ยนสีผิว; melanized)

ที่มา: St. Leger และคณะ (1996)



ภาพที่ 12 ปริมาณเชื้อ *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมในเลือดของหนอนใบยาสูบ(tobacco hornworm, *Manduca sexta*)

ที่มา: St. Leger และคณะ (1996)