บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อ *Metarhizium* spp.

จากการทดลองแยกเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยใช้หนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) เป็นเหยื่อล่อ สามารถแยกเชื้อจากดินสวนยางพาราในจังหวัดเลยได้ 4 ไอโซเลต คือ Lop1/1, Lop1/3, Lop2/1 และ Lop2/2 จังหวัดหนองบัวลำภู 8 ไอโซเลตคือ Npp2/1, Npp2/2, Npp2/3, Npp2/5, Npp2/6, Npp2/7, Npp2/8 และ Npp2/10 จังหวัดอุดรธานีอีก 3 ไอโซเลต คือ Udp2/1, Udp2/2 และ Udp2/3 รวมทั้งหมดจำนวน 15 ไอโซเลต โดยปกติการใช้เหยื่อดักแยกเชื้อราสาเหตุโรคแมลงส่วนใหญ่ใช้หนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง(*Galleria mellonella*) อย่างไรก็ดีรายงานของ Hozzank และคณะ (2003) ที่ได้มีการแยกเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงในดินที่อยู่บริเวณทางใต้ของออสเตรีย โดยใช้หนอนผีเสื้อกินไขผึ้ง และหนอนนก ซึ่งผลการดักจับพบเชื้อรา *Beauveria bassiana* มากถึง 84 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรา *Metarhizium anisopliae* 29 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ *Paecilomyces fumosoroseus* 3 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการใช้หนอนนกเป็นเหยื่อล่อก็ได้รับความนิยมนำมาใช้ดักจับเชื้อราแมลงได้เช่นกัน การใช้หนอนนกเป็นเหยื่อล่อในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลในการดักจับเชื้อได้ดีมาก อีกทั้งหนอนนกสามารถหาและเพาะเลี้ยงได้ง่าย อย่างไรก็ตาม สำหรับเชื้อ *Metarhizium* spp. อีกจำนวน 85 ไอโซเลตนั้น ก็ยังคงเป็นเชื้อไอโซเลตท้องถิ่นที่ได้มาจากการเก็บรวบรวมจากดินในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ศิวิลัย สิริมังครารัตน์ และอลงกต โพธิ์ดี ติดต่อส่วนตัว)

2. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.

ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (Pr1) จากเชื้อรา *Metarhizium* spp. จำนวน 100 ไอโซเลต เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของการผลิตเอนไซม์ในเชิงกึ่งปริมาณและเชิงปริมาณ พบว่า ค่าของทั้ง 2 กิจกรรมดังกล่าวไม่สอดคล้องในหลายๆ ไอโซเลต เช่น ในบางไอโซเลตมีการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสในปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ในการทดลองในเชิงกึ่งปริมาณ แต่กลับตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสในการทดลองเชิงปริมาณ เช่น ไอโซเลต IPKKU165, 234 และ 235 โดยมีค่าเท่ากับ 35.96, 9.71 และ 15.03 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และบางไอโซเลตที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในการทดลองในเชิงกึ่งปริมาณต่ำ แต่กลับพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้ในการทดลองเชิงปริมาณอยู่ในระดับสูงเช่น ไอโซเลต IPKKU184, 196, 209 และ 218 มีค่าเท่ากับ 41.99, 92.41, 81.22 และ

379.21 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลตมีค่าของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสค่าใกล้เคียงกันทั้งในเชิงกึ่งปริมาณและเชิงปริมาณ เช่น ไอโซเลต IPKKU167, 172, 190 และ 194 เป็นต้น สำหรับการทดลองในเชิงกึ่งปริมาณนั้น ไอโซเลต Npp2/2, Npp2/7 และ Npp2/6 มีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางโปร่งแสงมากสามอันดับแรกเท่ากับ 29.88, 28.88 และ 28.75 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ของทั้งสามไอโซเลตนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนในเชิงปริมาณนั้นไอโซเลต IPKKU218, Lop2/2 และ IPKKU196 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุดสามลำดับแรก โดยมีค่าเท่ากับ 379.21, 100.07 และ 92.41 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ซึ่ง IPKKU218 มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับไอโซเลต Lop2/2 และ IPKKU196 จากการทดลองในเชิงกึ่งปริมาณนั้นอาจจะไม่ใช่วิธีการที่จะนำมาตัดสินถึงความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ดี เนื่องจากในการดูด culture filtrate ในแต่ละไอโซเลตนั้นปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ใน culture filtrate ของแต่ละไอโซเลตมีปริมาณไม่เท่ากัน หากไอโซเลตใดมีค่าโปรตีนใน culture filtrate มากจะทำให้มีบริเวณโปร่งแสงมาก ดังนั้นการทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณจึงสามารถบอกกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสได้อย่างคร่าว ๆ เพื่อเป็นการตรวจหาความสามารถของเอนไซม์และเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ให้ได้อย่างแท้จริง จึงควรที่จะพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ในเชิงปริมาณ เพราะคิดกิจกรรมเอนไซม์ต่อหน่วยโปรตีนที่เท่ากัน ทั้งนี้เนื่องมาจากเอนไซม์โปรตีเอสเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญ ในกระบวนการเข้าทำลายแมลงของเชื้อรา จากรายงานของ Small และ Bidochka (2005) พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทพื้นฐานในการย่อยโปรตีนผนังลำตัว ทั้งยังแสดงให้เห็นว่า Pr1 จะแสดงออกในช่วงเริ่มต้นที่มีการเข้าทำลายแมลง โดยพบในช่วงการงอกของเส้นใยและช่วงการสร้างสปอร์บนผนังลำตัวของแมลง

3. ประสิทธิภาพของเชื้อในการทำลายแมลง

เมื่อนำตัวแทนเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่สุ่มเลือกได้จำนวน 15 ไอโซเลต จากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณ พบอัตราการตายของหนอนนกอยู่ในช่วง 39.88 - 90.48 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต IPKKU218 มีประสิทธิภาพสูงสุดทำให้อัตราการตายของหนอนนกเท่ากับ 90.48 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือไอโซเลต IPKKU169 (86.63 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU178 (86.60 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนในการทดสอบกับตัวเต็มวัยยุงลายบ้านนั้นมีการตายอยู่ในช่วง 28.67 - 81.33 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต Lop2/2 มีประสิทธิภาพสูงสุดมีค่าเท่ากับ 81.33 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ไอโซเลต IPKKU218 (78.00 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU216 (71.33 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และจากการทดลองยังพบว่าอายุของแมลงที่ได้รับการปลูกเชื้อมีอายุที่น้อยลง เมื่อ

เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม จากการทดสอบที่พบความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสกับประสิทธิภาพการเข้าทำลายหนอนนกของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยไอโซเลต IPKKU218 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเข้าทำลาย ขณะเดียวกันก็มีกิจกรรมในเชิงปริมาณของเอนไซม์โปรตีเอสที่สูงสุด และพบว่ามีความสามารถในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านถึง 78.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Liu และคณะ (2007) ที่รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีความสำคัญต่อความรุนแรงของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยจะสร้างเอนไซม์โปรตีเอสในช่วงแรกของการเข้าทำลายแมลง เพื่อใช้ย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังลำตัวในแมลง และยังพบว่าเอนไซม์โปรตีเอส ถูกผลิตขึ้นโดยมีความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังลำตัวชนิดอื่นๆ เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังลำตัวของแมลง ซึ่งในผนังลำตัวของแมลงพบว่ามีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70% (Clarkson and Charnley, 1996) ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสจึงเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมาก ที่สามารถช่วยส่งเสริมในการเข้าทำลายแมลงของเชื้อ แต่ในหลายไอโซเลตของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่ศึกษานี้นั้น ผลของกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสที่สูงหรือต่ำนั้น ไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการเข้าทำลายแมลงเช่น ไอโซเลต IPKKU178 มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านที่ค่อนข้างสูงเท่ากับ 69.33 เปอร์เซ็นต์ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณที่ต่ำเท่ากับ 20.88 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง จึงไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการเข้าทำลาย รวมทั้งไอโซเลต IPKKU200 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงลายบ้านอยู่ในระดับค่อนข้างสูง 64.67 เปอร์เซ็นต์ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสต่ำ คือเท่ากับ 5.81 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง หากนำข้อมูลของกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเข้าทำลายในหนอนนกและตัวเต็มวัยยุงลายบ้านแล้วพบว่า ไอโซเลต IPKKU218 และ Lop2/2 เป็นเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูง 379.21 และ 100.07 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และทำให้ตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านตาย 78.00 และ 81.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ในหนอนนกไอโซเลต IPKKU218 นั้นทำให้หนอนนกตายได้สูงสุดถึง 90.48 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไอโซเลต Lop2/2 นั้นทำให้หนอนนกตายเพียง 39.88 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นถึงเชื้อ *Metarhizium* ต่างไอโซเลตมีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงชนิดเดียวกันได้ต่างกัน และแม้จะมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงกว่าก็ไม่ได้มีประสิทธิภาพในการทำลายแมลงได้มากกว่า ดังเช่น ไอโซเลต IPKKU218 มีความสามารถในการทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านได้น้อยกว่าไอโซเลต Lop2/2 รวมทั้งแม้การมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณระดับที่สูงแต่ก็มีประสิทธิภาพต่ำในการทำลายหนอนนกได้ต่ำมาก ซึ่งพบเกิดกับเชื้อไอโซเลต Lop2/2 เป็นต้น อย่างไรก็ดีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในแมลงของเชื้อราชนิดนี้นั้น อาจจะมีปัจจัยอื่นที่

ส่งผลต่อการเข้าทำลายแมลงของเชื้อนอกจากเอนไซม์โปรตีเอส ดังผลการศึกษาของ Wang และคณะ (2002) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ไม่มียีนสร้าง Pr1 โปรตีน แต่ก็สามารถเข้าทำลายแมลงได้เช่นกัน ทั้งนี้อาจจะมีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เชื้อใช้ในการย่อยผนังลำตัวของแมลง เช่น ไดเปปติดิวเปปติเดส, อะมิโนเปปติเดต, คาร์บอกซีเปปติเดส, ไคติเนส, ไลเปส และเอสเตอร์เรส (Boucias and Penland, 1998) อีกทั้งค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไคติเนสนั้นค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5 ในส่วนของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-8 และที่ pH 8 เป็นค่าที่เหมาะสมของเอนไซม์ซับทิลิซินไลค์โปรตีเอส และ ทริปซินไลค์โปรตีเอส (St. Leger et al., 1997) รวมทั้งสารพิษ destruxin ที่อาจจะเป็นตัวแปรที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการเข้าทำลายของเชื้อ *Metarhizium* spp. ได้เช่นกัน

4. สารพิษ destruxin ของเชื้อ *Metarhizium* spp.

ผลจากการทดลองสกัดสาร destruxin ในเบื้องต้นจากเชื้อ *Metarhizium* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลตที่ได้รับการทดสอบถึงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนอนนกโดยอลงกต (2549) แสดงให้เห็นว่าเชื้อนี้มีความสามารถในการผลิตสารประกอบได้มากกว่า 1 ชนิด โดยดูได้จากจำนวนจุดของสารที่ปรากฏบนแผ่น silica gel ที่ตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร เมื่อนำค่า *Rf* ของจุดที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกัน พบว่าค่า *Rf* ของสารที่ได้นั้นอยู่ในช่วง *Rf* ของ destruxin คือ 0.65 - 0.85 (Samuels *et al.*, 1988) โดยทั้งหมด 8 ไอโซเลตนี้คือ IPKKU189, 194, 221, 225, 246, 247, 248 และ 249 มีค่า *Rf* อยู่ในช่วงดังกล่าว ซึ่งจากค่า *Rf* ที่ได้ สรุปได้ว่าสามารถสกัดสาร destruxin จากเชื้อ *Metarhizium* spp. ได้ทั้ง 8 ไอโซเลต ทั้งนี้เพราะค่า *Rf* จัดเป็นค่าที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของสารแต่ละชนิด ส่วนจุดอื่นๆ ที่พบนั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นสารเคมีชนิดใด จากข้อมูลของค่า *Rf* ที่ได้ไม่ตรงกับค่า *Rf* ของสารชนิดใด จึงต้องมีการทดสอบและศึกษาให้มากขึ้น เพื่อระบุถึงคุณสมบัติ ความสามารถ รวมทั้งประสิทธิภาพ ของสารดังกล่าว เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ในส่วนของสาร destruxin มาตรฐานที่ได้รับการอนุเคราะห์มาจาก Prof. Dr. Drion G. Boucias นั้นพบว่าไม่สามารถตรวจพบจุดของสารได้บนแผ่น TLC ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารมาตรฐานดังกล่าวเสื่อมสภาพ โดยที่สารพิษ destruxin นั้นเป็นสารที่เชื้อ *Metarhizium* สร้างขึ้นมีรายงานพบสาร destruxin อยู่ 35 ชนิดที่พบจากเชื้อ *M. anisopliae* (Pedras et al., 2002) ซึ่ง Pal และคณะ (2007) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของ destruxin A โดยพบว่าหลังจากฉีดสาร destruxin A เข้าไปในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) จะมีการลดลงของการแสดงออกของโปรตีนที่ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่สร้าง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภูมิคุ้มกัน (humoral immune response) ของแมลงหวี่ นอกจากนั้นในการทดลองของ Poprawski และ คณะ (1994) ได้ทดสอบความเป็นพิษของสาร destruxin E ต่อตัวอ่อนของเพลี้ยจักจั่น (*Empoasca vitis*) บนใบมันฝรั่ง โดยฉีดพ่นสาร destruxin E บนใบมันฝรั่งและบนตัวแมลงโดยตรง พบว่าตัวอ่อนเพลี้ยจักจั่นอ่อนแอต่อ destruxin E มาก โดยมีค่า LC_{50} (median lethal concentration) เมื่อฉีดพ่นบนใบพืชเท่ากับ 46.4 ppm และเท่ากับ 38.2 ppm เมื่อฉีดพ่นบนตัวแมลงโดยตรง และจากการทดสอบของ Skrobek และคณะ(2008) ถึงอันตรายของสารพิษ destruxin ต่อการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนั้น แสดงให้เห็นว่าสาร destruxin จะสลายตัวไปในระยะเวลาสั้นๆ หลังจากที่แมลงอาศัยตาย ซึ่งจะทำให้ไม่มีผลต่อการปนเปื้อนของสาร destruxin นี้ในสภาพแวดล้อมและในห่วงโซ่อาหาร จึงแสดงให้เห็นว่าการใช้สารพิษ destruxin มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม สำหรับประสิทธิภาพการเข้าทำลายของเชื้อราเขียวนั้น ต้องอาศัยปัจจัยหลัก อาทิ กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ และสารพิษ destruxin เพื่อส่งเสริมความรุนแรงของเชื้อ จากผลการทดลองในวิทยานิพนธ์นี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. ทุกไอโซเลตที่นำมาทดสอบนั้น สามารถสร้างสาร destruxin ได้ ในอนาคตจึงน่าจะมีการสกัดเอาสารพิษจากเชื้อ *Metarhizium* spp.ไอโซเลตท้องถิ่นของประเทศไทย มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูโดยตรง หรืออาจนำสาร destruxin มาผสมกับเชื้อรูปการค้าของ *Metarhizium* spp. หรือร่วมกับการใช้ชีววิธีอื่นๆ เพื่อเพิ่มความสามารถในการควบคุมแมลงต่อไป อีกทั้งการเพิ่มยีนในส่วน *pr1* จากไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงเข้าไปในเชื้อราเขียวไอโซเลตอื่นๆ หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น บีที (*Bacillus thurigiensis*) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจในการเพิ่มความสามารถของเชื้อ โดย St. Leger และคณะ (1996) ใช้เชื้อ *M. anisopliae* ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุกรรมและแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการก่อโรคกับหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) วัย 5 ได้อย่างมีประสิทธิภาพดีกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) แต่เชื้อที่ดัดแปรพันธุ์ทำให้หนอนที่ติดเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง จนทำให้เชื้อราสร้างหน่วยสืบพันธุ์ได้น้อยลง เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ นอกเป้าหมาย ทั้งนี้เพื่อความปลอดภัยนั่นเอง

5. โคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (*pr1*) ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส การโคลนยีน *pr1* โดยใช้ชุดทดสอบ (kit) QIAGEN PCR Cloning Kit ด้วยการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์กับเวคเตอร์ pDrive cloning vector จากนั้นนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์ของ QIAGEN EZ competent cell ที่มีสภาพพร้อมจะรับดีเอ็นเอจากภายนอก (competent cell) และคัดเลือกโคลนที่มีโคโลนีสี

ขาวด้วยหลักการ blue-white screening ซึ่งอาศัยหลักการทำงานของ lac operon ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ในการย่อยแลคโตส (lactose) เป็นกลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) ถูกควบคุมโดยยีน lac Z การเกิดสีฟ้าของโคโลนีเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ β-galactosidase ที่ย่อย Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG; analog ของแลคโตส) และ มี X-gal เป็นตัวตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ สำหรับการเกิดสีขาวนั้นเนื่องมาจากมีการแทรกสอดของชิ้นดีเอ็นเอที่ตำแหน่งของ lac Z จึงเกิด insertional inactivation ยีนที่ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ β-galactosidase ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ จึงไม่สามารถย่อย IPTG ได้ โคโลนีจึงมีสีขาว

และเมื่อนำโคลนที่คัดเลือกได้มาสกัดพลาสมิดและตรวจสอบโคลนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pr1F1 และ Pr1R1 พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน *pr1* คือเท่ากับ 1,500 คู่เบส ประสิทธิภาพของการโคลนยีนนั้นขึ้นอยู่ปัจจัยหลายอย่าง เช่น ขนาดของเวคเตอร์ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย รวมทั้งขั้นตอนต่างๆ ในการโคลนยีนล้วนแต่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการโคลนยีน การโคลนยีนในครั้งนี้ ในขั้นตอนการทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย 3M sodium acetate และ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ นั้น อาจทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ไม่บริสุทธิ์เท่าที่ควร ประสิทธิภาพในการโคลนยีนจะลดลง ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้พัฒนา และเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* แล้ว เช่น การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและส่งถ่ายไปยังเชื้อ *Metarhizium* ไอโซเลตอื่นสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) (St. Leger et. al., 1996) นอกจากนั้นยังมีการส่งถ่ายยีนที่ผลิตสารพิษต่อระบบประสาทของแมงป่อง (*Androctonus australis*) ไปยังเชื้อ *M. anisopliae* 549 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมหนอน *M. sexta* และยุงลายบ้านพาหะของโรคไข้เหลือง (Wang and St. Leger, 2007) และ ด้วงเจาะเมล็ดกาแฟ (coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*) โดยสามารถทำให้ด้วงเจาะเมล็ดกาแฟตายได้ภายในเวลา 3 วัน (Pava-Ripoll et. al., 2008) อีกทั้งยังได้มีการศึกษาและวิจัยด้านเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อนำเอายีนจากเชื้อแบคทีเรียมาใช้ในการควบคุมยุงเช่นกัน โดยมีการนำยีน *cyt1Aa6* จากเชื้อ *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 ส่งถ่ายเข้าไปในเชื้อ *Escherichia coli* BL21 ผลการวิจัยพบว่าเชื้อ Bt LLP29 และ *E. coli* BL21 ที่มียีน *cyt1Aa6* มีความเป็นพิษต่อลูกน้ำยุงวัย 3 ของยุงลายสวน (*Aedes albopictus*) (Zhang et. al., 2009) เช่นเดียวกับ Promdonkoy และคณะ (2003) ที่ได้โคลนเอายีน *cyt2Aa1* จากเชื้อ *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* ส่งถ่ายเข้าไปในเชื้อ *E. coli* K-12 JM109 โดยพบว่าเชื้อ *E. coli* K-12 JM109 สร้าง inclusion body ซึ่งมีพิษต่อตัวอ่อนยุงรำคาญ (*Culex. quinquefasciatus*) และยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) โดยมีค่า LC_{50} อยู่ระหว่าง 0.5 - 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* จำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมทั้งโดย

อาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพรวมทั้งอาศัยวิธีดั้งเดิม (conventional technique) ทั้งนี้ต้องตระหนักถึงต้นทุน ความเหมาะสม และความปลอดภัยทางชีวภาพเป็นประการสำคัญด้วย