ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชา
203335

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และการโคลนยีน protease

EFFICIENCY OF *METARHIZIUM* SPP. ON CONTROLLING DENGUE MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) AND PROTEASE GENE CLONING

นายอิทธิเดช ทิริยนิติ

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2553

b00257065

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
203335

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และการโคลนยีน protease

EFFICIENCY OF *METARHIZIUM* SPP. ON CONTROLLING DENGUE MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) AND PROTEASE GENE CLONING

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

นายอิทธิเดช พิริยะนิติ

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2553

ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และการโคลนยีน protease

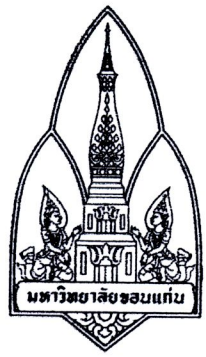
นายอิทธิเดช พิริยะนิติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการเกษตร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2553

EFFICIENCY OF *METARHIZIUM* SPP. ON CONTROLLING DENGUE MOSQUITO (*AEDES AEGYPTI*) AND PROTEASE GENE CLONING

MR. ITTIDATE PIRIYANITI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN AGRICULTURAL MICROBIOLOGY
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY
2010



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการเกษตร

ชื่อวิทยานิพนธ์ : ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และการโคลนยีน protease

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ : นายอิทธิเดช พิริยะนิติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์	ประธานกรรมการ
รศ. ดร. ศิวิลัย สิริมังครารัตน์	กรรมการ
ผศ. ดร. วรรณดี บัญญัติรัชต	กรรมการ
ดร. หทัยรัตน์ อุไรรงค์	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ :

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวิลัย สิริมังครารัตน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณดี บัญญัติรัชต)

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมาตย์)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. อนันต์ พลธานี)
คณบดีคณะเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

อิทธิเดช พิริยะนิติ. 2553. **ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ในการควบคุมยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) และการโคลนยีน protease.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร. ศิวิลัย สิริมังครารัตน์,
ผศ.ดร. วรรณดี บัญญัติรัชต

บทคัดย่อ

203335

เชื้อ *Metarhizium* sp. เป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง และเนื่องจากผนังลำตัวแมลงมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอส (Pr1) ของเชื้อรา *Metarhizium* spp. จึงมีบทบาทอย่างมากในกระบวนการเข้าทำลายแมลง ซึ่ง Pr1 เป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่แสดงออกในช่วงแรกของการเข้าทำลายของเชื้อ อีกทั้งเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมาในระดับความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่ย่อยผนังลำตัวของแมลง จากการทดสอบความสามารถของเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 100 ไอโซเลต เพื่อการแสดงออกของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณ พบมีกิจกรรมทั้งหมด 97 ไอโซเลต โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณโปร่งแสงที่เชื้อสร้างขึ้น พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 8.25 - 29.88 มิลลิเมตร ไอโซเลตที่ให้ค่าสูงสุด คือ ไอโซเลต Npp2/2 เท่ากับ 29.88 มิลลิเมตร และไอโซเลตที่ไม่พบการสร้างบริเวณโปร่งแสงมีจำนวน 3 ไอโซเลต คือ IPKKU165, 234 และ 235 ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณมีค่าอยู่ระหว่าง 2.39 - 379.21 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสามอันดับคือ IPKKU218, Lop2/2 และ IPKKU196 โดยมีค่าเท่ากับ 379.21, 100.07 และ 92.41 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับสารพิษ destruxin ซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อนั้น พบว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. จากการสุ่มจำนวน 8 ไอโซเลต สามารถสร้างสารที่มีค่า *Rf* ระหว่าง 0.65 - 0.85 ซึ่งอยู่ในช่วงของค่า *Rf* ของสาร destruxin ส่วนการศึกษาถึงความสามารถในทำลายแมลงของเชื้อ *Metarhizium* spp. ในสภาพห้องปฏิบัติการจำนวน 15 ไอโซเลต ที่สุ่มเลือกได้จากกิจกรรมในเชิงปริมาณของเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าอัตราการตายของหนอนนก (*Tenebrio molitor*) อยู่ในช่วง 39.88 - 90.48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไอโซเลต IPKKU218 มีประสิทธิภาพสูงสุด (90.48 เปอร์เซ็นต์) โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับไอโซเลตรองลงมาสองอันดับคือ ไอโซเลต IPKKU169 (86.63 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU178 (86.60 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการทดสอบกับตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) นั้นพบว่า มีการตายอยู่ในช่วง 28.67 - 81.33 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต

203335

Lop2/2 มีประสิทธิภาพสูงสุด (81.33 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ ไอโซเลต IPKKU218 (78.00 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU216 (71.33 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ทั้ง 3 ไอโซเลต

สำหรับการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (*pr1*) ของเชื้อไอโซเลต Lop2/2 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านสูงสุดและมีกิจกรรมของเอนไซม์ Pr1 ในเชิงปริมาณสูงนั้น ดำเนินการโดยเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pr1F1 และ Pr1R1 และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pDrive cloning vector ส่งถ่ายเข้าสู่ QIAGEN EZ competent cell และคัดเลือกโคลน ส่วนการตรวจสอบกลับด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Pr1F1 และ Pr1R1 รวมทั้งนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้นี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน elastase-like serine protease ของเชื้อรา *M. anisopliae* (AB073327) ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เพื่อการนำไปใช้ป้องกันกำจัดตัวเต็มวัยยุงลายบ้านโดยตรง การนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นแบบผสมผสาน และการเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ยีน *pr1* ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มศักยภาพในการควบคุมยุงลายบ้านและแมลงศัตรูชนิดอื่นอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Ittidate Piriyaniti. 2010. **Efficiency of *Metarhizium* spp. on Controlling Dengue Mosquito (*Aedes aegypti*) and Protease Gene Cloning**. Master of Science Thesis in Agricultural Microbiology, Graduate School, Khon Kaen University.

Thesis Advisors : Assoc.Prof. Dr. Sivilai Sirimungkararat,

Asst.Prof. Dr. Wandee Bunyatratchata

ABSTRACT

203335

Metarhizium sp., an entomopathogenic fungus, is one of the most effective natural enemies. According to insect cuticle consists of protein more than 70% and mycelium penetrates to insect cuticle directly by enzymatic degradation process during the infection steps, therefore enzyme protease (Pr1) of *Metarhizium* spp. do play an important role during invasion through insect cuticle. The Pr1 expressed as first enzyme with high concentration and speed to degrade insect cuticle than other degrading enzymes. The semi-quantitative protease activity of 100 isolates of *Metarhizium* spp. were investigated on diameters of clear zone. There were total 97 isolates, which had activities between 8.25 - 29.88 mm. Isolate Npp2/2 (29.88 mm) was detected as the highest proteolytic activity while isolates IPKKU165, 234 and 235 were not detectable. Quantitative protease activity was also evaluated among *Metarhizium* isolates. Enzyme activities were ranked 2.39 to 379.21 tyrosine (µmol)/mg protein/hr, the top 3 high proteolytic isolates were IPKKU218, Lop2/2 and IPKKU196, which expressed enzyme activities of 379.21, 100.07 and 92.41 tyrosine (µmol)/mg protein/hr, respectively. The destruxin was another factor in affecting the severity of infection by *Metarhizium* spp. Random selection of 8 isolates could generate destruxin valuable substances in the range of *Rf* 0.65 - 0.85, in which contained *Rf* values of destruxins. The 15 random isolates of destruxin based on quantitative protease activity were tested on their pathogenicity against mealworm (*Tenebrio molitor*) under laboratory condition. The bioassay showed that percentage mortality in the range of 39.88 – 90.48%. Of these the highly effective isolates were not significantly different ($P>0.05$) in descending order, IPKKU218 (90.48%), IPKKU169 (86.63%) and IPKKU178 (86.60%). Furthermore, the pathogenicity test on adult of dengue mosquito, *Aedes aegypti* revealed percentage mortalitres of 28.67-81.33%. The

203335

most 3 effectiveness isolates in descending order were Lop2/2 (81.33%), IPKKU218 (78.00%) and IPKKU216 (71.33%), which were not significantly different (P>0.05).

DNA fragment coding protease gene (*pr1*) from the most effective isolate of *Metarhizium* sp. (Lop 2/2) against adult of dengue mosquito was amplified by polymerize chain reaction (PCR) using primers, Pr1F1 and Pr1R1. The obtained PCR product was ligated to plasmid, pDrive cloning vector and transformed to QIAGEN EZ competent cell. The selected clone was isolated and PCR product was confirmed by PCR technique using primer Pr1F1 and Pr1R1. The PCR product was compared by subjection nucleotide sequences to GenBank database and found that it was similar to elastase-like serine protease from *M. anisopliae* (AB073327) with 96% similarity. This research indicates the more effectiveness of green muscardine fungus, *M. anisopliae* in controlling adult dengue mosquito directly. It can also be exploited in integrated management including the application of protease encoding gene (*pr1*) for increasing effective control on adult dengue mosquito and other pests using genetic engineering technology.

งานวิทยานิพนธ์นี้มอบส่วนดีให้บุพการีและคณาจารย์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวิลัย สิริมังคารัตน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำตั้งแต่การวางแผนการวิจัย ให้ข้อเสนอแนะ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง พร้อมทั้งสนับสนุนช่วยจัดหาทุนสำหรับการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณดี บัญญัติรัชต กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่เป็นกำลังใจ และให้คำแนะนำที่มีคุณค่าตลอดการศึกษาในระดับปริญญาตรีจนถึงระดับปริญญาโท และขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ ดร. หทัยรัตน์ อุไรรงค์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้การสนับสนุน วัสดุอุปกรณ์ สถานที่ทดลอง และคำแนะนำที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพงศ์ ลิมป์วิโรจน์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คุณกองแก้ว ยะอูป คุณบุญส่ง กุลโฮง คุณพรทวีวัฒน์ ศูนย์จันทร์ พี่ๆ และเจ้าหน้าทุกท่านของสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น สำหรับคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ และขอขอบคุณ คุณเบ็ญจมาศ แก้วรัตน์ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการกลาง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี ที่ได้ให้ความเอาใจใส่และช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืนและ กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม ที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ในระดับบัณฑิตศึกษา รวมทั้งพี่ๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง สาขาวิชากีฏวิทยา และพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องทุกคน ห้องปฏิบัติการเห็ดราวิทยา สาขาวิชาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพย์พยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในความมีน้ำใจช่วยเหลือและให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ท้ายที่สุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณอำพร และคุณสมพิศ พิริยะนิติ (บิดา และ มารดา) ผู้ซึ่งให้ร่างกายที่สมบูรณ์ จิตใจที่เข้มแข็ง รวมถึงครอบครัวและญาติๆ ที่ให้ความอบอุ่น เป็นกำลังใจอันสำคัญยิ่งในการทำงานและหลักในการดำเนินชีวิตที่ดีเสมอมา

อิทธิเดช พิริยะนิติ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
คำอุทิศ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
3. ขอบเขตของการวิจัย	2
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
1. เชื้อ *Metarhizium* spp.	4
1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	5
1.2 กลไกการเข้าทำลายแมลง	6
1.3 สารพิษจากเชื้อรา	6
1.4 เอนไซม์ย่อยผนังลำตัวแมลง	11
1.5 ประโยชน์ของเชื้อ	13
2. ยุงลายบ้าน	15
2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	15
2.2 ความสำคัญ	15
2.3 การป้องกันกำจัด	16
3. การโคลนยีน	18
3.1 ยีน	18
3.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอ	18
3.2.1 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจาก mRNA	19
3.2.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอโดยกระบวนการทางเคมี	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 การนำยีนหรือดีเอ็นเอเข้าเซลล์เจ้าบ้าน	21
3.3.1 พลาสมิด	21
3.3.2 ฝาจแลมบ์ด้า	21
3.3.3 คอสมิด	21
3.4 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าเซลล์ผู้รับ	21
3.5 การตรวจหาโคลนที่ต้องการ	21
4. การศึกษาการโคลนยีนในเชื้อ *Metarhizium* spp.	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	27
1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ *Metarhizium* spp.	27
1.1 การสำรวจและรวบรวมตัวอย่างดินและตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา	27
1.2 การแยกหาเชื้อ	27
1.2.1 ตัวอย่างดิน	27
1.2.2 ตัวอย่างแมลง	28
1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์	28
1.4 การเก็บรักษาเชื้อ	28
2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.	28
2.1 การเตรียม culture filtrate	28
2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	29
3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.	29
3.1 การวิเคราะห์โปรตีน	29
3.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	29
4. การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ *Metarhizium* spp.	30
4.1 เชื้อรา	30
4.2 แมลงทดสอบ	30

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 หนอนนก	30
4.2.2 ยุงลายบ้าน	30
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ	31
4.3.1 หนอนนก	31
4.3.2 ยุงลายบ้าน	31
5. การศึกษาการสกัดสารพิษ destruxin ของเชื้อ *Metarhizium* spp.	32
5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ	32
5.2 การสกัดสารพิษ	32
5.3 การตรวจหาสารพิษ	32
6. การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.	33
6.1 การเตรียมเชื้อ	33
6.2 การเตรียมดีเอ็นเอ	33
6.3 ขั้นตอนการโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	34
6.3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส	34
6.3.2 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์	34
6.3.3 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจล	35
6.3.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับเวคเตอร์	35
6.3.5 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์	36
6.4 การคัดเลือกโคลน	37
6.5 การหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน *pr1* ที่โคลนได้	37
6.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pr1* ที่โคลนได้	37
บทที่ 4 ผลการทดลอง	38
1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อ *Metarhizium* spp.	38
2. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.	38
3. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.	42
4. ประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ *Metarhizium* spp.	45
4.1 หนอนนก	45
4.2 ยุงลายบ้าน	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสและประสิทธิภาพในการทำลายแมลง	48
5. สารพิษ destruxin ของเชื้อ *Metarhizium* spp.	50
6. การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.	54
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	57
1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อ *Metarhizium* spp.	57
2. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.	57
3. ประสิทธิภาพของเชื้อในการทำลายแมลง	58
4. สารพิษ destruxin ของเชื้อ *Metarhizium* spp.	60
5. โคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.	61
บทที่ 6 ข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา	77
ภาคผนวก ข สูตรอาหารสำหรับการแยก เลี้ยงเชื้อรา ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส และสูตรอาหารสำหรับสกัดสารพิษ destruxin	86
ภาคผนวก ค การเตรียม buffer และสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส	89
ภาคผนวก ง สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุล	91
ประวัติผู้เขียน	95

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 สารพิษของเชื้อรา ก่อโรคแมลงบางชนิด	8
ตารางที่ 2 ชนิดและหน้าที่ของเอนไซม์ที่สร้างโดยเชื้อ *Metarhizium anisopliae*	12
ตารางที่ 3 เปรียบเทียบอัตราการตายของหนอนใบยาสูบ (tobacco hornworm, *Manduca sexta*) ที่ปลูกด้วยเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์คัดแปรพันธุกรรม	25
ตารางที่ 4 กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่างๆ จากการย่อยสารละลายเจลลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffer 0.1 M, pH 7.0	40
ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่างๆ	43
ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่าง ๆ ที่ได้จากการสุ่มในการทำลายหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.)	46
ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่าง ๆในการทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*)	47
ตารางที่ 8 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณ เชิงปริมาณ และความสามารถในการทำลายแมลง จำนวน 15 ไอโซเลต	49
ตารางที่ 9 ค่า R*f* จากแผ่น Thin layer chromatography ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	52
ตารางที่ 10 ค่า R*f* จากแผ่น Thin layer chromatography ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	54

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* บนซากของแมลง	4
ภาพที่ 2 ลักษณะของเชื้อ *Metarhizium*	5
ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของสาร destruxin A, B และ E	7
ภาพที่ 4 เชื้อรา *Alternaria brassicae*	9
ภาพที่ 5 เชื้อรา *Trichothecium roseum*	9
ภาพที่ 6 ระยะการเจริญของยุงลายบ้าน	16
ภาพที่ 7 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจาก mRNA	20
ภาพที่ 8 ขั้นตอนการโคลนยีน	22
ภาพที่ 9 พลาสมิด pBGFP	23
ภาพที่ 10 เส้นใยของเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ที่ได้รับยีน *gfp* (green fluorescent protein)	24
ภาพที่ 11 หนอนใบยาสูบ (tobacco hornworm, *Manduca sexta*) วัย 5 ที่ปลูกด้วยเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ที่ความเข้มข้น 5×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร	26
ภาพที่ 12 ปริมาณเชื้อ *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ดั้งเดิมและสายพันธุ์ดัดแปรพันธุกรรมในเลือดของหนอนใบยาสูบ(tobacco hornworm, *Manduca sexta*)	26
ภาพที่ 13 แผนผัง restriction site ของพลาสมิด pDrive cloning vector	36
ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.	39
ภาพที่ 15 จำนวนไอโซเลตของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่มีและไม่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณ	39
ภาพที่ 16 จำนวนไอโซเลตของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่มีและไม่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณ	43
ภาพที่ 17 ตัวอย่างลักษณะของหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) ที่ถูกเชื้อ *Metarhizium* sp. เข้าทำลาย	47
ภาพที่ 18 ตัวอย่างของลักษณะตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่ถูกเชื้อ *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop2/2 เข้าทำลาย	48
ภาพที่ 19 แผ่น Thin layer chromatography ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร	51
ภาพที่ 20 แผ่น Thin layer chromatography ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 21 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Metarhizium* sp. เมื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *pr1* ด้วยไพรเมอร์ Pr1F1 และ Pr1R1 55

ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pr1* ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop2/2 กับยีน *pr1* elastase-like serine protease จากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* (AB073327) จากฐานข้อมูล GenBank 56