รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน
2. **โครงการวิจัย** : การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตไคติเนสจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Chitinase production from Entomopathogenic Fungi

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ
สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน :

นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาวจีรภา ปัญญศิริ สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง สังกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

5. **บทคัดย่อ**

รวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคแมลงในแหล่งต่างๆ และจากแหล่งที่เก็บรักษาเชื้อราของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่เก็บรวบรวมในสภาพธรรมชาติที่เป็นสาเหตุโรคของแมลงและสามารถผลิตไคติเนส ได้แก่ เชื้อ เมตาไรเซียม และเชื้อ *Isaria spp* ส่วนเชื้อราที่นำมาศึกษาจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ได้แก่เชื้อเมตาไรเซียม บิววาเลีย เลือกนำเชื้อราเมตาไรเซียมและบิววาเลีย มาผลิตเอนไซม์ไคติเนส เพื่อเตรียมไปทดสอบกับหนอนผีเสื้อ ผลิตไคติเนสเพื่อที่จะนำไปทดสอบกับหนอนผีเสื้อ โดยนำเชื้อราเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม chitin ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยใช้ระยะเวลา 5 วัน โดยใช้เชื้อราในการเริ่มต้น 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร แล้วน้ำใสไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dye ในการทดสอบการยับยั้งอาหารจากเอ็นไซม์ไคติเนสพบว่าหนอนบางตัวไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปะปนอยู่ในอาหาร ทำให้หนอนไม่เจริญเติบโตตามปกติ

ขนาดตัวจะเล็กกว่าหนอนจากกรรมวิธีควบคุม หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะเริ่มตายหลังจากกินอาหารไป 24 ชั่วโมง แต่จะเริ่มตายมากขึ้นหลังจากกินอาหารไป 5 วัน บางตัวจะสามารถอยู่ได้ถึง 30 วันหลังจากการทดลอง และตายไปโดยที่ไม่สามารถเข้าดักแด้ได้ ในขณะที่วิธีการควบคุมหนอนจะกินอาหารเทียมไปเรื่อยๆ และมีการเจริญเติบโตตามปกติ สามารถเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อได้ การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง โดยทำการหยดเอนไซม์ไคติเนสที่ที่ส่วนอกด้านหลัง หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 พบว่าหนอนบางตัวที่ได้รับเอ็นไซม์จะตายช่วงที่เข้าดักแด้ โดยหนอนจะเข้าดักแด้ไม่ได้หรือตายในช่วงเข้าดักแด้ไม่สามารถเจริญเป็นผีเสื้อได้

Abstract

Entomopathogenic Fungi were collected in various sources and from fungal preservation of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology . It was found that the fungal pathogens collected in natural conditions that caused the disease of insects and could produce chitinase were *Metarhizium* spp and *Isaria* spp.. Entomopathogenic Fungi from the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology were Metarhizium and Beuveria. Both of Metarhizium and Beaveria were studied to produce enzyme chitinase and to be tested with cutworm. The fungus was fed on PDB that added chitin at 30 ° for 5 days and using the fungus starting at 10^7 spores / ml. Sfupernatant that contained chitinase was dried with the freeze dye . To test the food inhibition from chitinase enzymes, it was found that some cutworms did not eat foods that contain Chitinase enzymes mixed in food. The cutworms that ate contaminate food with chitinase did not grow normally and the body size was smaller than the cutworm from the control treatment. The cutworms that received chitinase enzymes died after eating for 24 hours and the dead number increased after eating food for 5 days. Some cutworms could be able to stay up to 30 days after got chitinse and died without being able to change to pupae. The control treatment found that the cutworm could continue to eat artificial food and have normal growth. The cutworms can changed to pupae and butterflies Insect growth inhibition test by dropping the

chitinase enzyme at the back of the chest of the 4 instar of cutworm found that some cutworms that received enzymes died during the pupa period. Some cutworm could not change to pupae or die during the pupa and could not change to be butterflies.

6. คำนำ :

ราสาเหตุโรคแมลงมีประโยชน์ในการนำมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารชีวภาพในการกำจัดแมลงกันอย่างกว้างขวาง ราที่ใช้กำจัดแมลงที่เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปคือราเขียว (*Metarhizium* spp.) และราขาว *(Beavaria* spp.) นอกจากนี้ยังมีเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดอื่นอีก เช่น *Verticilium* spp. *Ascesersonia spp. Paecilomyces spp. ,Isaria* spp. เชื้อราดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์ทำลายผนังแมลง เช่น ไคติเนส (chitinase) โปรติเอส (protiease) ไลเปส (lipase)

การศึกษาเอ็นไซน์ไคติเนสได้รับความสนใจมากเนื่องจากสามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง เอนไซม์ไคติเนสสามารถย่อยไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างแมลง โดยมากพบที่เปลือกหุ้ม (cuticle) และ peritrophic membrane ในสำไส้แมลง โดยปกติแมลงจะสร้างเอนไซม์ไคติเนสเพื่อใช้ในการลอกคราบ โดยจะสร้างในปริมาณที่พอดีกับความต้องการในขณะนั้น ดังนั้นหากแมลงได้รับเอนไซม์นี้ในปริมาณมากเกินความต้องการในช่วงที่ไม่ต้องการเอนไซม์ไคติเนสอาจมีผลต่อการเจริญของแมลงและอาจทำให้แมลงตายได้ ได้มีการใช้เชื้อราในการกำจัดแมลงเนื่องจากเชื้อราสามารถทำให้แมลงเป็นโรค โดยแมลงรับเชื้อราเข้าไปโดยตรงจากการกินหรือทางอ้อมจากเส้นใยที่ผ่านผนังลำตัวแมลง เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถสกัดได้จากหลายแหล่งด้วยกัน ซึ่งราสาเหตุโรคแมลงก็เป็นแหล่งที่สำคัญ ทั้งเชื้อราเขียว Metarhizium ราขาว Beavaria และราอื่นๆ

ไคติเนสเป็นยีนที่พบได้ทั้งในเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย และไวรัสของแมลง (Muzzarelli, 1977) ยีนนี้เป็นยีนที่มีประสิทธิภาพในด้านการป้องกันกำจัดศัตรูพืชทั้งแมลง ไส้เดือนฝอยและเชื้อรา (Carr and Klessig, 1989; Linthorst, 1991; Sasai and Manocha, 1993) ในด้านแมลงจะมีผลต่อขบวนการลอกคราบโดยกลไกการเข้าทำลายแมลงของเอนไซม์ไคติเนสเกิดขึ้นเมื่อแมลงกินชิ้นส่วนของพืชที่มีไคติเนสเข้าไปในทางเดินอาหาร เอนไซม์ทำลายเยื่อบุผนังทางเดินอาหาร เนื่องจากผนังทางเดินอาหารมีไคติเนสเป็นส่วนประกอบ (ทิพย์วดี, 2549) ซึ่งแมลงที่มีรายงานการใช้ยีนไคติเนส ในการป้องกันกำจัดเป็นพวกหนอนกระทู้ เช่น Spodoptera frugiperda, S. littoralis, S. exigua, หนอนเจาะสมอฝ้าย Heliothis virescens และหนอนกินใบยาสูบ

Manduca sexta นอกจากนั้นยังมีผลกับเพลี้ยอ่อน (Myzus pericae) โดยลดการเจริญเติบโตและลดประชากรรุ่นลูกของเพลี้ยอ่อน (Kramer and Muthukrishnan, 1997)

ในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จะมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่าง เช่น pH อุณหภูมิ ไคติน อายุของเชื้อ แล้วยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น glucosamine N-acetylglucosamine Chitobiose Chitooligosaccaride การสังเคราะห์ extracellular chitinase ใน Metarhizium จะมีกลไกชักนำที่ขึ้นกับ N-acetylglucosamine เชื้อ Metarhizium จะผลิตไคติเนส ช่วงที่เข้าทำลายผนังของแมลง ช่วงนั้นเอนไซม์จะมีผลผลิตของไคตินเป็นจำนวนมาก เชื้อราจะเจริญในช่วง pH กว้างๆตั้งแต่ 2.5-10.5 การผลิตเอนไซม์จะใช้เวลา 20-40 ชั่วโมง (Rustiguel et al., 2012)

ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสต่อแมลง Wu et al., (2010) ได้ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอนไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Metarhizium anisopliae* ในรูปสารกำจัดแมลงกับหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่าหนอนจะลดการกินลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้ Binod et al., (2007) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ไคติเนสจากเชื้อ *Trichoderma harianum* ต่อหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Helicoverpa armigera*) พบว่าอัตราการกินของหนอนจะน้อยลง น้ำหนักตัวจะลดลง การเข้าดักแด้จะลดลง และเพิ่มอัตราการตายในช่วงหนอนและดักแด้

ดังนั้นการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไคติเนสเพื่อที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการกำจัดแมลง จึงทำให้ทราบถึงข้อมูลพื้นฐานถึงปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ตลอดจนทราบผลของเอนไซม์ที่มีต่อแมลง ซึ่งสามารถขยายผลในการนำเอนไซม์ไปผสมกับสารกำจัดแมลงชนิดอื่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดีขึ้น

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, –20 และ -80 องศาเซลเซียส
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- เครื่อง electrophoresis
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer

- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 μl, 20 μl, 200 μl และ 1000 μl
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- ตู้อบ

- วิธีการ

<u>การเก็บตัวอย่างเชื้อรา</u>

1.ทำการเก็บตัวอย่างราสาเหตุโรคแมลง โดยเก็บตัวอย่างแมลงที่ตายที่คาดว่าน่าจะมีสาเหตุมาจากเชื้อราใส่ในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มล. สำหรับแมลงที่มีขนาดเล็ก เก็บใส่หลอดขนาด 5 มล. สำหรับแมลงที่มีขนาดใหญ่ ส่วนแมลงที่มีขนาดใหญ่มากๆ เช่นผีเสื้อ เก็บตัวอย่างในถุงพลาสติก โดยทำการเก็บตัวอย่างจากจังหวัดต่างๆ ดังนี้ นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี เชียงใหม่

2.แยกเชื้อราออกจากตัวแมลง แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน จนเกิดโคโลนีของเชื้อรา

3. แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์โดยแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา โดยดูลักษณะสีของโคโลนี และนำเส้นใยไปส่องดูจากกล้องจุลทรรศน์ บันทึกภาพไว้

<u>การศึกษากิจกรรมของเอ็นไซม์ไคติเนส</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสม colloidal chitin 2% (colloidal chitin agar (CCA))
2. ใช้ cock borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 mm เจาะลงในอาหารที่มีเส้นใยของเชื้อราที่ต้องการตรวจสอบ
3. นำไปวางตรงกลางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ CCA
4. บ่มที่ 27 ° C เป็นเวลา 3-7 วัน
5. วัดกิจกรรมเอ็นไซม์โดยเท 0.01 % Congo red บนอาหาร ทิ้งไว้ 30 นาที

6. ล้างออกด้วยน้ำประปา

7. เท 1 N NaCl ลงบนอาหาร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วเทออก

8. สังเกตแถบใสที่เกิดขึ้น

<u>จำแนกเชื้อราแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล</u>

1.ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อรา โดยใช้ชุดสกัด DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ได้ เก็บไว้ที่ -20 °C

2.ทำ PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4

ทำการเพิ่มปริมาณยีนในส่วน ITS ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ forward primer ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และ reverse primer ITS 4 (AGGCATCCACTTGGACGCC)

ในปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย โดยมีส่วนประกอบในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 ng/µl)	1	µl
forward primer (10 pmol/µl)	1	µl
reverse primer (10 pmol/µl)	1	µl
10 x buffer	5	µl
2.5 mM dNTPs	2	µl
Taq Polymerase	1	µl
น้ำ	39	µl
รวมปริมาตร	50	µl

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมตามสัดส่วนข้างบนลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 ml หลังจากนั้นนำหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในเครื่อง DNA thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9700, USA). โดยมีรอบการทำ PCR และอุณหภูมิที่ใช้ดังนี้

	95°C	3 นาที	จำนวน 1 รอบ
Denaturing	94°C	30 วินาที	จำนวน 30 รอบ
annealing	60°C	30 วินาที	
extension	72°C	1 นาที	
	72°C	5 นาที	
	4°C	hold	

3.ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดย 1% agarose gel ใน 1x TAE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ 60 นาที ย้อม gel ด้วย ethidium bromide 15 นาที และตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต

4.3 การหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ยีน ITS

4.ทำ PCR ให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด kit Wizard ®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปหาลำดับเบสที่บริษัทที่รับวิเคราะห์ลำดับเบส นำลำดับเบสที่ได้จากยีน ITS มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

<u>การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส</u>

โดยใช้เชื้อราตั้งต้นที่ความเข้มข้น 10^5 สปอร์/มล. และ 10^6 สปอร์/มล. ที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ระยะเวลา 1- 7 วัน เก็บตัวอย่างของเอ็นไซม์ที่ผลิตได้ทุก 24 ชั่วโมง จนครบ 7 วัน

<u>การผลิตเอนไซม์ไคติเนส</u>

1. การเตรียมสปอร์เชื้อรา โดยนำตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคแมลง มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วบ่มไว้ที่ 27 °C เป็นเวลา 10 วัน เก็บสปอร์ไว้ในน้ำกลั่น นับสปอร์ด้วย heamocytometer ให้มีความเข้มข้น $1x10^7$ สปอร์/มล.
2. การเตรียมเอนไซม์ไคติเนส นำเชื้อราเขียวเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม 1% chitin นำไปบ่มที่ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 5 วัน เก็บตะกอนโดยปั่นเหวี่ยงที่ 1000 g ที่ 4°C 10 นาที
3. น้ำใสจะถูกทำให้แห้งโดยการเอาเข้าเครื่อง freeze dye

<u>การทดสอบ Bioassay กับหนอนผีเสื้อ</u>

1. การเตรียมหนอนกระทู้ผัก

ได้รับความอนุเคราะห์หนอนกระทู้ผักและอาหารเทียมเลี้ยงหนอนจากสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

2. การทดสอบการไม่อยากกินอาหาร (antifeedant)

ทดสอบหนอนกระทู้ผักวัยที่ 2 โดยให้อดอาหารก่อน 1 วัน แล้วให้กินอาหารเทียมขนาด 0.5x0.5x0.5 cm แล้วนำไปจุ่มในเอ็นไซม์ไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อต่างๆ โดยใช้น้ำกลั่นเป็นวิธีควบคุม ให้หนอนกินอาหารเทียมที่มีไคติเนสจนหมด จึงเปลี่ยนอาหารเทียมใหม่ บันทึกผลการทดลองทุกวันจนกว่าหนอนจะเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อ

3.การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibition)

โดยใช้หนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 ทำการหยดเอนไซม์ไคติเนส 5 ul ติดต่อกัน 3 วัน ที่ส่วนอกด้านหลัง โดยใช้น้ำกลั่นเป็นวิธีควบคุม ให้หนอนกินอาหารปกติ บันทึกระยะเวลาการเข้าดักแด้ จำนวนหนอนที่ตาย

4.วิเคราะห์ผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

เวลา : ตุลาคม 2559 -กันยายน 2561

สถานที่ทำการทดลอง : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

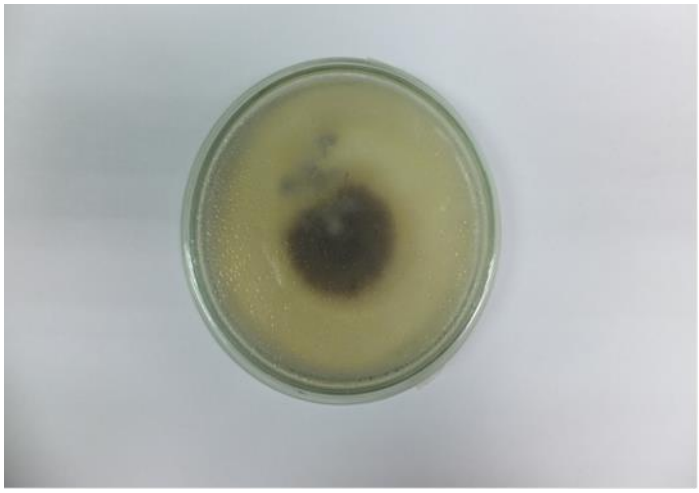
8. ผลการทดลองและวิจารณ์

<u>การเก็บตัวอย่างเชื้อรา</u>

ทำการรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงจากจังหวัด นครราชสีมา ปราจีนบุรี ปทุมธานี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ จันทบุรี เชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างจากแมลงที่ตายโดยมีลักษณะการตายที่น่าจะมาจากเชื้อรา ทั้งระยะตัวหนอน ตัวเต็มวัย แล้วทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อราที่อยู่ในตัวแมลงโดยการใช้เข็มเขี่ยชิ้นส่วนแมลงที่มีเชื้อรานำมาเลี้ยงในอาหาร PDA ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 วัน

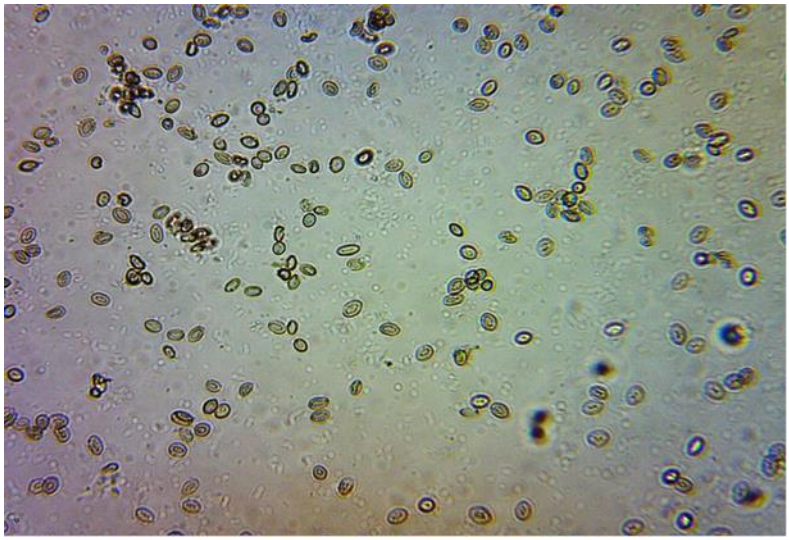
ภาพที่ 1 ตัวอย่างของแมลงที่ตายจากเชื้อรา

คัดเลือกเชื้อราที่คาดว่าจะเป็นเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง สามารถคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคของแมลงที่ผลิตไดติเนสได้โดยคัดเลือกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ chitin agar ไม่น้อยกว่า 10 ตัวอย่าง



ภาพที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสาเหตุโรคของแมลง

จากการจำแนกลักษณะของเชื้อราทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเชื้อราในบางตัวอย่าง มีลักษณะคล้ายสปอร์ของเชื้อ *Metarhizium* spp.

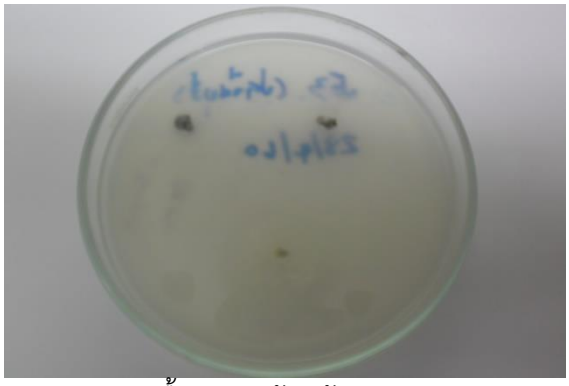


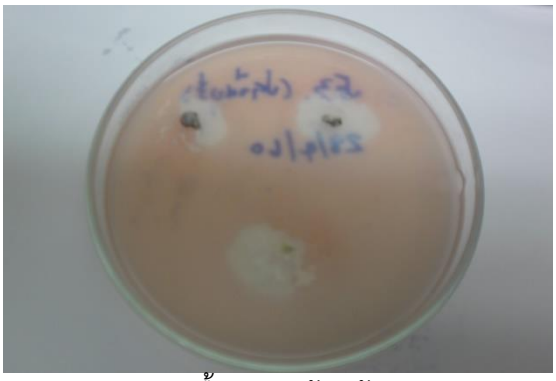
ภาพที่ 4 ลักษณะสปอร์ของเชื้อราที่ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>การตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ไคติเนส</u>

นำเชื้อราที่ได้จากแมลง มาเลี้ยงบน Chitin selective agar ซึ่งมี colloidal chitin ผสมอยู่ เป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตวงใสที่ปรากฏบนผิวหน้าอาหาร หลังย้อมด้วย congo red

พบว่าราที่ผลิตไคติเนสได้จะให้วงใสหลังย้อมด้วย congo red





A= เชื้อราก่อนย้อมด้วย congo red B=เชื้อราหลังย้อมด้วย congo red

ภาพที่ 5 ลักษณะวงใสที่เกิดจากเอ็นไซม์ไคติเนสจะปรากฏในภาพ B

<u>จำแนกเชื้อราแมลงด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล</u>

นำเชื้อราที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเหมือนราสาเหตุโรคของแมลง เช่น เชื้อราเขียว เชื้อราขาว โดยดูจากลักษณะสีเส้นใย และลักษณะของสปอร์ รวมไปถึงการย่อยไคติน ในการเกิด clear zone เมื่อนำเชื้อราจากแมลงไปสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณขนาดของชิ้นส่วน ITS โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1 และ 4 ไปหาลำดับเบสแล้ว พบว่าในส่วนที่เชื้อราสีเขียนเมื่อนำไปหาลำดับเบส มีทั้งเชื้อ ราเขียว *Metharhizium* *Aspergillus* ส่วนเชื้อราสาเหตุแมลงอื่นที่พบคือ *Isaria* ที่พบในจักจั่น

จากการจำแนกเชื้อที่ได้พบว่ามีเชื้อที่เป็นสาเหตุของแมลงที่ตาย และเชื้อราที่ไม่ใช่สาเหตุของโรคแมลง ซึ่งคาดว่าเชื้อราดังกล่าว เช่น Aspergillus น่าจะเกิดขึ้นภายหลังจากที่แมลงตายแล้ว แต่ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ Aspergillus สามารถผลิตไคติเนสได้ด้วย (Krishnaveni and Ragunathan, 2014) จึงทำเกิดปฏิกริยาเมื่อทำ clear zone ด้วย

<u>การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไคติเนส</u>

ใช้ตัวอย่างเชื้อ Metarhizium มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไคติเนส เมื่อนำเชื้อราเขียวเลี้ยงบนอาหารเหลว PDB ที่เติม1% chitin นำไปบ่มที่ 30 °C ที่ความเร็วรอบ 180 rpm เป็นเวลา 1-7 วัน จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อใส่เชื้อราตั้งต้น ที่ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร จะให้ผลผลิตมากกว่าที่ 10^5 สปอร์/มิลลิลิตร ผลผลิตของ ไคติเนส จากเชื้อรา ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C จะแตกต่างกันในช่วงเวลาต่างกัน โดยจะค่อยๆเพิ่มขึ้น ในแต่ละวัน โดยจะให้ผลผลิตสูงสุด ในวันที่ 5 วัน และจะค่อยๆ ลดลงในวันที่

<u>การผลิตเอนไซม์ไคติเนส</u>

ทำการผลิตเอ็นไซม์ไคติเนส โดยใช้เชื้อราที่คัดเลือกได้ โดยมีเชื้อเมตาไรเซียม 4 ไอโซเลต และเชื้อบิววาเลีย 2 ไอโซเลต โดยแยกเป็นส่วนน้ำ และส่วนที่นำไปทำให้แห้งโดยเข้าเครื่อง freeze dye

<u>การทดสอบ Bioassay กับหนอนผีเสื้อ</u>

1. ทำการทดสอบ anti feedant การยับยั้งการกินอาหารของหนอนกระทู้ผัก โดยทำการทดสอบกับหนอนวัยที่สอง ให้หนอนอดอาหารหนึ่งวัน หลังจากนั้นจึงนำอาหารเทียม ไปจุ่มกับเอนไซม์ ซึ่งมี 2 รูปแบบ รูปแบบที่เป็นผง ละลายน้ำ 100 ul และรูปแบบที่เป็นน้ำ บันทึกการเจริญเติบโตทุกวัน

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักเมื่อได้รับไคติเนสในรูปแบบผงและรูปแบบน้ำจากการทดสอบการยับยั้งการกินอาหาร

กรรมวิธีในการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	ไคติเนสผง	ไคติเนสน้ำ	เฉลี่ย
T1	50	40	45
T2	15	50	32.5
T3	10	55	32.5
T4	15	30	22.5
T5	35	35	35
T6	35	30	32.5
T7 control	0	0	0

T1 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 1
T2 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 2
T3 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 3
T4 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 4
T5 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 1
T6 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 2
T7 น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

ในการทดสอบการยับยั้งอาหารจากเอ็นไซม์ไคติเนสพบว่า หนอนบางตัวไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปะปนอยู่ในอาหาร ทำให้หนอนไม่เจริญเติบโตตามปกติ ขนาดตัวจะเล็กกว่าหนอนจากกรรมวิธีควบคุม หนอนที่ได้รับเอ็นไซม์ไคติเนสจะเริ่มตายหลังจากกินอาหารไป 24 ชั่วโมง แต่จะเริ่มตายมากขึ้นหลังจากกินอาหารไป 5 วัน บางตัวจะสามารถอยู่ได้ถึง 30 วัน หลังจากการทดลอง และตายไปโดยที่ไม่สามารถเข้าดักแด้ได้ ในขณะที่วิธีการควบคุมหนอนจะกินอาหารเทียมไปเรื่อยๆ และมีการเจริญเติบโตตามปกติ สามารถเข้าดักแด้และเปลี่ยนเป็นผีเสื้อได้

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าไคติเนสที่ได้จากเมตาไรเซียมไอโซเลตที่ 1 จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนอนกระทู้ผักได้ดีกว่าไคติเนสที่ได้จากเชื้อราอื่นๆ และในการทดลองนี้พบว่าไคติเนสที่ผลิตได้จากเชื้อเมตาไรเซียมจะมีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้สูงกว่าไคติเนสที่ได้จากบิววาเลีย

2. ทำการทดสอบ การยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอนกระทู้ผัก โดยทำการทดสอบกับหนอนวัยที่ 4 ให้หนอนอดอาหารหนึ่งวัน หลังจากนั้นจึงนำเอ็นไซม์หยดตรงด้านหลังอก 5 ul ซึ่งมี 2 รูปแบบ รูปแบบที่เป็นผง ละลายน้ำ 100 ul และรูปแบบที่เป็นน้ำ หยดติดต่อกัน 3 วัน บันทึกการเจริญเติบโตทุกวัน

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกระทู้ผักเมื่อได้รับไคติเนสในรูปแบบผงและรูปแบบน้ำจากการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโต

กรรมวิธีในการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การตาย		
	ไคติเนสผง	ไคติเนสน้ำ	เฉลี่ย
T1	10	0	5
T2	5	10	7.5
T3	0	5	2.5
T4	10	15	12.5
T5	15	10	12.5
T6	0	10	5
T7 control	0	0	0

T1 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 1

T2 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 2
T3 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 3
T4 เชื้อราเมตาไรเซียม ไอโซเลตที่ 4
T5 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 1
T6 เชื้อราบิววาเรีย ไอโซเลตที่ 2
T7 น้ำกลั่น (วิธีควบคุม)

การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง โดยทำการหยดเอนไซม์ไคติเนสที่ที่ส่วนอกด้านหลังหนอนกระทู้ผักวัยที่ 4 พบว่าหนอนบางตัวที่ได้รับเอ็นไซม์จะตายช่วงที่เข้าดักแด้ โดยหนอนจะเข้าดักแด้ไม่ได้หรือตายในช่วงเข้าดักแด้ไม่สามารถเจริญเป็นผีเสื้อได้

ในการทดสอบครั้งนี้เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อที่จะทดสอบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงหรือไม่ ซึ่งจากผลการทดสอบจะพบว่าประสิทธิภาพในการทำให้หนอนตายยังไม่ดีนัก จำนวนหนอนที่ตายไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเห็นได้ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการกินอาหาร เพราะในหนอนบางตัวจะไม่กินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปนอยู่เลย ในขณะที่บางตัวยังสามารถกินอาหารที่มีเอ็นไซม์ไคติเนสปนอยู่ ซึ่งอาจจะมาจากความแข็งแรงของหนอนแต่ละตัวที่ต่างกันออกไป และในการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตจะพบว่าหนอนจะตายในช่วงดักแด้ ก่อนที่จะเจริญเติบโตเป็นผีเสื้อ หากนำเอ็นไซม์ไคติเนสไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืช อาจต้องนำไปผสมกับสารกำจัดแมลงตัวอื่น เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ให้เพิ่มประสิทธิภาพ และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการเก็บรวบรวมเชื้อราตามแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย และ จากตัวอย่างเชื้อราจากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ ได้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้ ซึ่งมีทั้งเชื้อเมตาไรเซียม บิววาเลีย เมื่อทำการผลิตไคติเนสแล้วนำมาทดสอบกับหนอนกระทู้ผัก พบว่าเอ็นไซม์ไคติเนสสามารถทำให้แมลงตายได้ทั้งในช่วงที่เป็นหนอน ดักแด้และผีเสื้อ มีผลในการยับยั้งการกินอาหารโดยหนอนกระทู้ผักจะไม่กินอาหารที่มีไคติเนสปะปน นอกจากนี้ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตจะทำให้หนอนยืดอายุในการลอกคราบทำให้มีอายุนานกว่าหนอนปกติที่ไม่ได้รับเชื้อ เปอร์เซ็นต์การตายในช่วงดักแด้และผีเสื้อจะสูงกว่าหนอนที่ไม่ได้รับเอ็นไซม์ ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงรูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ในการนำไปใช้ในการกำจัดแมลง ตลอดจนอายุการเก็บรักษาที่จะรักษาประสิทธิภาพในการกำจัดแมลง นอกจากนี้ยังควรมีการศึกษาการนำไคติเนสไปผสมกับสารกำจัดแมมลงชนิดอื่นเพื่อช่วยเสริมประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงได้ดียิ่งขึ้น

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : เอ็นไซม์ไคติเนสสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมศัตรูพืช อาจต้องนำไปผสมกับสารกำจัดแมลงตัวอื่น เพื่อเป็นสารออกฤทธิ์ให้เพิ่มประสิทธิภาพ และควรมีการศึกษารูปแบบที่เหมาะสมของเอ็นไซม์ไคติเนสที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

11. คำขอบคุณ :

ขอขอบคุณ คุณ อิศเรส เทียนทัด นักกีฏวิทยาชำนาญการ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ให้ความอนุเคราะห์หนอนกระทู้ผักและอาหารเทียม ในการทดสอบประสิทธิภาพเอ็นไซม์ไคติเนส

12. เอกสารอ้างอิง :

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2549. ไวรัสของแมลง: นิวคลีโอโดลิฮีโดรไวรัส. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Binod, P., R.K. Sukamaran, S.V. Shirke, J.C. Rajput and A. Pandey. 2007. Evaluation of fungal culture filtrate containing chitinase as a biocontrol agent against Helicoverpa armigera. J. of Applied Micrology. 103:1845-1852

Carr, J. P. and D. P. Klessig. 1989. Genetic Engineering-Principles and Methods, Vol 11 ed. J.K. Sellow, p 65 Plenum Press, New York.

Kramer, K. L. and S. Muthikrishnan, 1997. Insect Chitinases: Molecular biology and potential use as pesticides. Insect Biochem. Molec. 27: 887-900.

Linthorst H. J.M. 1991. Pathogenesis-related proteins of plants. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 123-150.

Muzzarelli, 1977

Sahai A. S. and M. S. Manocha. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite intereaction: FEMS Microbial. Rev. 11: 317-338.

Wu J.H., S. Ali and S. X. Ren. 2010. Evaluation of Chitinase from Metarhizium

anisopliae as Biopesticide Against Plutella xylostella. Pakistan. J. Zool. 42: 521-528.

13. ภาคผนวก :

1. การเตรียม colloidal chitin (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Roberts and Selitrenikoff, 1988)

1. เติม 100 g ของผงไคตินช้าๆ ใน HCl 1.75 ลิตร แล้วเขย่าช้า 3 ชั่วโมง ด้วย magnetic stirrer
2. เติมน้ำกลั่นให้ได้เป็น 20 ลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. จะเห็นตะกอนสีขาว นำไปปั่นที่ 10,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 °C
4. ล้างตะกอนด้วยน้ำเย็นช้าๆ หลายๆครั้ง จนกระทั่ง pH ลดเหลือ 5.5
5. น้ำใสจะถูกทิ้งและ Colloidal chitin จะถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ colloidal chitin agar (CCA)

1. Colloidal chitin 2 g
2. Agar 16 g
3. Distilled water 1000 ml