วารสารวิจัย มข. 15 (10) : ตุลาคม 2553

ประสิทธิภาพของเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ไอโซเลตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

The Efficiency of Northeastern Isolates of Green Muscardine fungi *Metarhizium* spp. on Controlling Economic Insect Pests

*อัญชลี นาทองคำ (Anchalee Natongkham)[1] ศิวิลัย สิริมังคารัตน์ (Sivilai Sirimungkararat)[2,4,5]**
วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (Weerasak Saksirirat)[2,4] หทัยรัตน์ อุไรรงค์ (Hathairat Urairong)[3]
เบญจมาศ แก้วรัตน์ (Benjamat Kaewrat)[3]

บทคัดย่อ

เชื้อราเขียว *Metarhizium* sp. เป็นเชื้อก่อโรคแมลงที่สำคัญชนิดหนึ่ง โดยสามารถทำลายแมลงได้มากมายทั่วโลก จึงได้มีการสุ่มนำเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. จำนวน 16 ไอโซเลต ซึ่งรวบรวมได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย สำหรับใช้ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณ รวมทั้งประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูที่สำคัญคือ ตัวเต็มวัยยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) พาหะนำโรคเท้าช้างหรือโรคฟิลาเรีย และหนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) แมลงศัตรูที่สำคัญทางการเกษตร โดยที่ในระหว่างการเข้าทำลายแมลงนั้น เชื้อราจะมีการสร้างเอนไซม์หลายชนิดขึ้นมา ซึ่งไคติเนสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการทำลายแมลง จึงมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส พบว่ามีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 6.88 - 127.75 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสามอันดับแรกคือ ไอโซเลต IPKKU222, IPKKU184 และ IPKKU241 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 127.75, 70.61 และ 57.39 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยไอโซเลต IPKKU222 มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับเชื้อไอโซเลตอื่นๆ ส่วนการทดสอบกับแมลงศัตรูในสภาพห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 28±2 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 75-83 % เมื่อทดสอบกับตัวเต็มวัยยุงรำคาญ ด้วยความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 6x108 สปอร์/มล ให้ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายอยู่ในช่วง 6.00 - 80.67 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต IPKKU234 มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายสูงที่สุดคือ 80.67% และมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับไอโซเลต IPKKU178 (70.67%) และ IPKKU230 (66.00%) ส่วนการทดสอบกับหนอนกระทู้หอมที่ความเข้มข้นเชื้อเท่ากับ 1x108 สปอร์/มล พบว่าค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายหนอนกระทู้หอมอยู่ในช่วง 3.33-40.00% ซึ่งไอโซเลตที่สามารถทำลายหนอนกระทู้หอมได้มากที่สุดคือ ไอโซเลต IPKKU249 (40.00%) รองลงมาคือ ไอโซเลต IPKKU234 (36.67%) และ IPKKU178 (33.33%) โดยเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

[1] *นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3] *นักวิชาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี*
[4] *สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE) และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[5] *กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
* *Corresponding author, e-mail: sivilai@kku.ac.th*

Abstract

Green muscardine fungus, *Metarhizium* sp. is one of the most important entomopathogenic fungi. It is able to infect diverse insects worldwide. Therefore, this study was undertaken with 16 randomized isolates of *Metarhizium* spp., collected from the northeast of Thailand. Of these, the quantitative chitinase activity and effectiveness on control of the major insect pests were carried out. The adults of Culex mosquito (*Culex quinquefasciatus*) (vector of elephantiasis or filariasis) and larvae of beet armyworm (*Spodoptera exigua*) (Agricultural key insect pest) were the representative test insects. During the infection process of the fungus, there were various produced enzymes. Chitinase is one of the enzymes, which plays an important role in infection process. Hence, the quantitative chitinase activity was investigated. It was found that average chitinase activities were among 6.88-127.75 GlcNAc-µmol/mg protein/hr. The three highest chitinase activities were isolates IPKKU222, IPKKU184 and IPKKU241 with values of 127.75, 70.61 and 57.39 GlcNAc-µmol/mg protein/hr, in descending order. Chitinase activity of isolate IPKKU222 was significantly different ($P<0.05$) with other isolates. In addition, the ability on infection of insect pests under laboratory conditions at 28±2°C, 75-83 % RH was tested. The results showed that the adult of Culex mosquito had average mortality percentages of 6.00-80.67 by using spore concentration of $6x10^8$ spore/ml. Of these, the most effective isolate was IPKKU234 (80.67%) followed by IPKKU178 (70.67%) and IPKKU230 (66.00%). The infection rate of IPKKU234 was significantly different ($P<0.05$) with IPKKU178 and IPKKU230. On beet armyworm using spore concentration of $1x10^8$ spore/ml., the average infection was 3.33-40.00%. The highest infection was IPKKU249 (40.00%) followed by isolates IPKKU234 (36.67%) and IPKKU178 (33.33%), which were not significantly different ($P>0.05$).

คำสำคัญ: เชื้อราเขียว, ตัวเต็มวัยยุงรำคาญ, ประสิทธิภาพ, หนอนกระทู้หอม, เอนไซม์ไคติเนส
Keywords: adult Culex mosquito, beet armyworm, chitinase, efficiency, *Metarhizium* spp.

บทนำ

เชื้อ *Metarhizium* spp. หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungus) เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง ซึ่งมีการรายงานถึงความสามารถในการทำลายแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด (species) (Zimmerman, 1992) อีกทั้งเป็นเชื้อที่เพาะเลี้ยงได้ง่าย และพบทั่วไปในดิน จึงได้รับความนิยมนำไปใช้ในรูปแบบของสารชีวินทรีย์ฆ่าแมลง (mycoinsecticide) (Valaderes-Inglis et al., 1997) จากลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราเขียวที่จะต้องมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยผนังลำตัวแมลง และเพื่อช่วยเสริมความรุนแรงของเชื้อในการเข้าทำลายแมลง ซึ่งไคติเนสจัดเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในเข้าทำลายแมลงของเชื้อ (Murad et al., 2006) อีกทั้งพบว่าเอนไซม์ไคติเนสยังเป็นตัวหลักในการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์และการงอกของสปอร์เชื้อราอีกด้วย โดยจะพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสอยู่ในระยะที่สองของการเข้าทำลายแมลง (St. Leger et al., 1996; Santi et al., 2010) ต่อจากเอนไซม์โปรตีเอส

สำหรับยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) นั้น จัดเป็นแมลงศัตรูที่สำคัญชนิดหนึ่ง ซึ่งมักจะอาศัยในบริเวณที่อยู่อาศัยของมนุษย์ และออกหากินในเวลากลางคืน จึงทำความเสียหาย และก่อความรำคาญ อีกทั้งเป็นแมลงพาหะนำโรค เช่น โรคเท้าช้างหรือโรคฟิลาเรียที่เกิดจากหนอนพยาธิตัวกลม ซึ่งนับเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญของมนุษย์ การป้องกันกำจัด

สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การปล่อยปลาที่กินลูกน้ำ การใช้สารสังเคราะห์ DEET (diethyltoluamide) ในการควบคุมยุงตัวเต็มวัยหรือตัวอ่อน(ลูกน้ำ) การใช้สารเคมีฆ่าแมลง อาทิ Abate® ใส่ลงในภาชนะต่างๆ ซึ่งการใช้สารเคมีนั้นได้รับความนิยมสูง เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว แต่สิ่งที่ต้องตระหนักคือ จะต้องมีพิษน้อยต่อคนและสัตว์และต้องใช้อย่างถูกวิธี (สำนักโรคติดต่อจากแมลง, 2553) อย่างไรก็ตาม สารเคมีฆ่าแมลงมักมีอันตรายสูงต่อคน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อเป็นการลดอัตราเสี่ยงดังกล่าว การควบคุมทางชีววิธี โดยเฉพาะการใช้เชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรียและรา เป็นต้น

โดยที่หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) เป็นแมลงศัตรูอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการเกษตรทั่วโลก ทั้งนี้เพราะสามารถทำลายพืชได้หลายชนิด มีการระบาดค่อนข้างเร็ว การป้องกันกำจัดจึงเป็นไปได้ยาก นอกจากนั้นยังสามารถสร้างความต้านทานต่อสารเคมีฆ่าแมลงได้ดี ซึ่งการใช้สารเคมีฆ่าแมลงเป็นทางเลือกที่เกษตรกรนำมาใช้ป้องกันกำจัดเสมอ แต่กลับเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมอย่างยิ่ง ดังนั้นการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี อาทิ การใช้เชื้อรา *Metarhizium* spp. จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน เพื่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรู โดยเฉพาะยุงในระยะตัวเต็มวัยให้มีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไป

วิธีการวิจัย

1. การรวบรวมเชื้อราเขียว

เชื้อราเขียวที่นำมาศึกษาทั้งหมดจำนวน 99 ไอโซเลตนี้ ได้มาจากการรวบรวม ของห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ศิวิลัย สิริมังคารัตน์, อลงกต โพธิ์ดี และอิทธิเดช พิริยะนิติ ติดต่อส่วนตัว) ซึ่งเป็นการแยกเชื้อได้จากตัวอย่างดินหรือตัวอย่างแมลงที่สำรวจและรวบรวมได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และอีก 1 ไอโซเลตเป็นเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่มีชื่อการค้าว่า "เมทาไรเซียม" จากนั้นนำเชื้อทั้งหมดดังกล่าวนี้มาสุ่มเลือกได้เชื้อจำนวน 16 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ โดยเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-83 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการเก็บรักษาเชื้อเพื่อเป็นสต็อกนั้นได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. แมลงศัตรูสำคัญทางเศรษฐกิจ

2.1 ยุงรำคาญ

ตัวเต็มวัยของยุงรำคาญเพื่อใช้สำหรับทดลอง โดยรวบรวมลูกน้ำและดักแด้ (ไอ้โม่ง) จากแหล่งน้ำขังและบ่อบำบัดน้ำเสียของมหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาเพาะเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสขนาด 15x23x8 เซนติเมตร ที่วางไว้ในกรงตาข่ายขนาด 30x30x30 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 23-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 64-82 เปอร์เซ็นต์ ของห้องเลี้ยงแมลง สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัย ให้อาหารโดยใช้สำลีชุบน้ำผึ้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

2.2 หนอนกระทู้หอม

เพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณหนอนกระทู้หอมด้วยอาหารเทียม ในถ้วยพลาสติกที่มีฝาปิดสูง 5 เซนติเมตร และมีเส้นผ่าศูนย์กลางของปากถ้วย 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 23-30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 64-82 เปอร์เซ็นต์ ในห้องเลี้ยงแมลง เพื่อใช้สำหรับทดลองและเพื่อเป็นสต็อก

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณ

เพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 14 วัน กรองเอา culture filtrate เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ส่วนการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณ

โดยนำ culture filtrate มาจำนวน 1 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลาย colloidal chitin 1 เปอร์เซ็นต์ ใน acetate buffer pH 5.0 จำนวน 1 มิลลิลิตร (reaction mixture) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยต้มหลอด reaction mixture ในน้ำเดือด 20 นาที แล้วนำ reaction mixture จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้ N-acetylglucosamine (GlcNAc) เป็นน้ำตาลรีดิวซ์มาตรฐานตามวิธีของ Somogyi (1952) และประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนส จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ถูกย่อยออกจาก colloidal chitin คิดเป็นไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) มี 16 กรรมวิธี (ไอโซเลต) แต่ละกรรมวิธีมี 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนส ด้วย least significant difference (LSD)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวในการทำลายแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

4.1 ยุงรำคาญ

การปลูกเชื้อราเขียวให้กับตัวเต็มวัยของยุงรำคาญนั้นประยุกต์ตามวิธีของ Scholte et al. (2003; 2007) โดยดูดสารแขวนลอยสปอร์ที่มีความเข้มข้น 6 x 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ใน Tween 20® เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 มิลลิลิตร ปาดลงบนกระดาษถ่ายเอกสารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 12x20 เซนติเมตร หยดเชื้อให้กระจายทั่วกระดาษ รอจนกระดาษแห้งหมาดๆ นำกระดาษมาวางด้านในแก้วพลาสติกขนาด 20 ออนซ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางปากแก้ว 9.5 เซนติเมตร สูง 17.5 เซนติเมตร) หลังจากนั้นปล่อยตัวเต็มวัยยุงรำคาญใส่ในแก้วที่เตรียมไว้จำนวน 50 ตัวต่อซ้ำ ทำ 3 ซ้ำต่อไอโซเลต ปิดปากแก้วด้วยแผ่นพลาสติกใส และใช้ยางรัดที่พลาสติก ในส่วนกรรมวิธีควบคุม (control) ใช้ Tween 20® เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้สารแขวนลอยสปอร์ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับกรรมวิธีทดลอง และใช้สำลีชุบน้ำผึ้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ วางภายในแก้วพลาสติกเพื่อเป็นอาหารตัวเต็มวัย รวมทั้งใส่สำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วเพื่อให้ความชื้น โดยให้น้ำผึ้งและความชื้นเท่าๆ กันทุกซ้ำตลอดช่วงของการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-83 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายกระดาษที่มีสปอร์ของเชื้อราออกจากแก้ว และตรวจสอบการตายของยุงทุกวัน เพื่อนำไปตรวจหาและคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงเนื่องจากเชื้อ *Metarhizium* spp. วางแผนการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติ ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3 โดยมีจำนวนตัวเต็มวัยของยุงรำคาญ 50 ตัวต่อซ้ำ

4.2 หนอนกระทู้หอม

สำหรับการปลูกเชื้อ *Metarhizium* spp. ให้กับหนอนกระทู้หอม ดัดแปลงตามวิธีการของ Hartwig และ Oehmig (1992) และ Lezama-Gutierrez et al. (2000) โดยใช้หนอนกระทู้หอมวัย 3 จำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ และมี 3 ซ้ำ ต่อไอโซเลต ทดสอบโดยนำหนอนกระทู้หอมจุ่มนาน 5 วินาที ในสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อ *Metarhizium* spp. แต่ละไอโซเลต ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 1x10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร สำหรับกรรมวิธีควบคุม ใช้สารละลาย Tween 20® เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นย้ายหนอนกระทู้หอมไปเลี้ยงด้วยอาหารเทียมในกล่องฟิล์ม (ฝาเจาะรูปิดด้วยตาข่ายทองเหลือง) สำหรับเลี้ยงหนอน และให้ความชื้นด้วยสำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75-83 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ให้แสงสว่าง ตรวจสอบการตายของหนอนกระทู้หอมทุกวัน เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การตายเนื่องจากเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ที่ปลูกให้ วางแผนการทดลอง วิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทางสถิติปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3

ผลการวิจัย

1. การรวบรวมเชื้อ *Metarhizium* spp.

เชื้อ *Metarhizium* spp. ที่สุ่มคัดเลือกได้ 16 ไอโซเลตสำหรับใช้ในการทดลองเป็นไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และได้เก็บรักษาเชื้อไว้ที่ห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการ

วิจัยของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 15 ไอโซเลต ได้แก่ IPKKU165, IPKKU170, IPKKU175, IPKKU178, IPKKU184, IPKKU198, IPKKU204, IPKKU205, IPKKU221, IPKKU222, IPKKU230, IPKKU234, IPKKU241, IPKKU242 และ IPKKU249 และอีก 1 ไอโซเลตแยกได้จากดินแปลงปลูกยางพาราในจังหวัดหนองบัวลำภูคือ ไอโซเลต Npp2/1

2. กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณ

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณ คำนวณโดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนใน culture filtrate พบว่าเชื้อราเขียวทั้ง 16 ไอโซเลต มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไคติเนส ซึ่งวัดค่าได้อยู่ในช่วง 6.88-127.75 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยไอโซเลต IPKKU222 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณสูงที่สุดคือ สามารถย่อยสลาย colloidal chitin ได้ GlcNAc 127.75 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับไอโซเลตอื่นๆ และไอโซเลตที่มีค่าสูงเป็นลำดับรองลงมา 2 อันดับ คือไอโซเลต IPKKU184 และ IPKKU241 ที่มีค่าเท่ากับ 70.61 และ 57.39 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสน้อยที่สุดคือ ไอโซเลต IPKKU249 โดยมีค่าเท่ากับ 6.88 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1. กิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.

ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์ [GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง] [1/]
IPKKU165	13.45 hi
IPKKU170	40.12 def
IPKKU175	37.72 def
IPKKU178	51.49 cd
IPKKU184	70.61 b
IPKKU198	34.96 efg
IPKKU204	27.60 fgh
IPKKU205	48.03 cde
IPKKU221	20.21 ghi
IPKKU222	127.75 a
IPKKU230	9.91 i
IPKKU234	16.38 hi
IPKKU241	57.39 bc
IPKKU242	33.16 efg
IPKKU249	6.88 i
Npp2/1	29.01 fgh
C.V. (%)	24.76

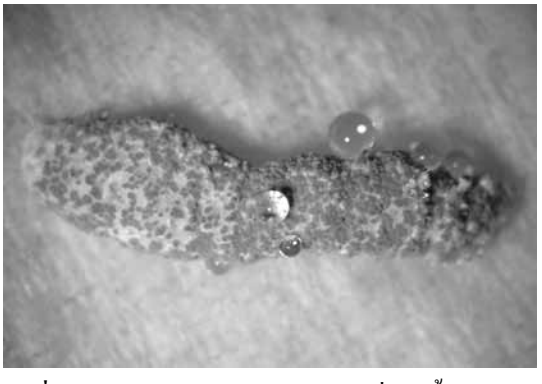
[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$, LSD $0.05=16.076$)

3. ประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวต่อแมลงศัตรู

เมื่อนำเชื้อ *Metarhizium* spp. ทั้ง 16 ไอโซเลต ไปทดสอบกับแมลงศัตรูคือ ตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอม โดยในตัวเต็มวัยยุงรำคาญ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยอยู่ในช่วงระหว่าง 6.00-80.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งไอโซเลต IPKKU234 ให้เปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุดเท่ากับ 80.67 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้สามารถสังเกตได้จากเส้นใยและสปอร์สีเขียวเจริญปกคลุมยุง(รูปที่ 1) โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงรองลงมาคือ ไอโซเลต IPKKU178 และ IPKKU230 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 70.67 และ 66.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเชื้อราเขียวไอโซเลต Npp2/1 นั้น มีประสิทธิภาพในการทำลายยุงรำคาญต่ำที่สุดคือ มีค่าเท่ากับ 6.00 เปอร์เซ็นต์

รูปที่ 1. ลักษณะยุงรำคาญที่ถูกเชื้อราเขียว *Metarhizium* sp. (ไอโซเลต IPKKU234) ทำลาย

ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวกับหนอนกระทู้หอมนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อราเขียวสามารถทำลายหนอนกระทู้หอมได้ทั้ง 16 ไอโซเลต โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.33-40.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การตายสูงที่สุด (40.00 เปอร์เซ็นต์) เกิดจากไอโซเลต IPKKU249 (รูปที่ 2) ทั้งนี้ให้ค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับไอโซเลตรองลงมา 2 ไอโซเลตคือ IPKKU234 (36.67 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU178 (33.33 เปอร์เซ็นต์) ส่วนไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพต่ำที่สุดคือ IPKKU175, IPKKU205 และ IPKKU241 ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลตให้เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนเท่ากันคือ 3.33 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2. ลักษณะหนอนกระทู้หอมที่ถูกเชื้อราเขียว *Metarhizium* sp. (ไอโซเลต IPKKU249) ทำลาย

ตารางที่ 2. ประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ในการทำลายตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอม

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์การตาย[1/]	
	ตัวเต็มวัยยุงรำคาญ	หนอนกระทู้หอม
IPKKU165	24.00 f	16.67 de
IPKKU170	27.33 f	10.00 ef
IPKKU175	26.00 f	3.33 f
IPKKU178	70.67 b	33.33 ab
IPKKU184	26.67 f	6.67 f
IPKKU198	36.00 d	30.00 bc
IPKKU204	18.67 g	16.67 de
IPKKU205	14.00 gh	3.33 f
IPKKU221	33.33 de	23.33 cd
IPKKU222	9.33 hi	10.00 ef
IPKKU230	66.00 b	10.00 ef
IPKKU234	80.67 a	36.67 ab
IPKKU241	18.00 g	3.33 f
IPKKU242	28.67 ef	20.00 d
IPKKU249	50.00 c	40.00 a
Npp2/1	6.00 i	20.00 d
LSD 0.05	5.2043	9.2973
C.V. (%)	9.35	31.57

[1/] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05, LSD)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ไอโซเลตภาคตะวันออกเฉียงเหนือทุกไอโซเลตที่สุ่มมาศึกษา จำนวน 16 ไอโซเลต มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณอยู่ในช่วง 6.88-127.75 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยไอโซเลต IPKKU222 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสสูงสุด (127.75 GlcNAc - ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) รองลงมาคือ IPKKU184 และ IPKKU 241 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ในเชิงปริมาณเท่ากับ 70.61 และ 57.39 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยกิจกรรมเอนไซม์ ไคติเนสของไอโซเลต IPKKU222 มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) กับเชื้อทุกไอโซเลต ซึ่งการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสนั้น มีปัจจัยที่เข้ามาเกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น สารตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ Barreto et al. (2004) ที่พบว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. จะผลิต extracellular chitinase ออกมา เมื่ออาหารตรวจสอบมีไคตินเป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้เพราะไคตินมีส่วนต่อการชักนำให้มีการ

สร้างเอนไซม์ไคติเนส และพบว่าน้ำตาล GlcNAc มีบทบาทพิเศษในการผลิตเอนไซม์ไคติเนสด้วย นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไคติเนส ดังเช่นจากการศึกษาของ St. Leger et al. (1998) พบว่าความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยผนังลำตัวของเชื้อ *M. anisopliae* ยังขึ้นอยู่กับค่าpH โดยค่า pH ที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสนั้นมีค่าเท่ากับ 5 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เป็นกรด

ส่วนการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อรา *Metarhizium* spp. กับแมลงศัตรูที่สำคัญทางเศรษฐกิจ คือ ตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอมนั้น พบว่าในการทดสอบกับตัวเต็มวัยยุงรำคาญนั้น มีการตายเฉลี่ยของยุงอยู่ในช่วง 6.00 - 80.67 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต IPKKU234 สามารถเข้าทำลายตัวเต็มวัยยุงรำคาญได้สูงที่สุดเท่ากับ 80.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับเชื้อทุกไอโซเลต และไอโซเลตที่เข้าทำลายยุงรำคาญรองลงมา 2 อันดับ คือ ไอโซเลต IPKKU178 (70.67 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU230 (66.00 เปอร์เซ็นต์) ส่วนในหนอนกระทู้หอมมีเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยอยู่ในช่วง 3.33 - 40.00 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต IPKKU249 มีประสิทธิภาพมากที่สุดเท่ากับ 40.00 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับสองไอโซเลตรองลงมาคือ IPKKU234 (36.67 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU178 (33.33 เปอร์เซ็นต์) สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อในการเข้าทำลายหนอนกระทู้หอมในการศึกษาครั้งนี้ จัดว่าการตายสูงสุดมีค่าเพียง 40 เปอร์เซ็นต์นั้น จัดว่ายังอยู่ในระดับต่ำ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับวิธีการในการควบคุมหรือทดสอบ หรือความเข้มข้นของเชื้อ รวมทั้งความรุนแรงของเชื้อ ซึ่งเป็นไปได้ว่าไอโซเลตของเชื้อที่สุ่มมา สำหรับใช้ในการศึกษานี้จำนวน 16 ไอโซเลต จาก 100 ไอโซเลต อาจยังไม่เหมาะสมต่อแมลงชนิดนี้ หรืออาจขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของหนอนกระทู้หอมที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของแมลงที่นำมาทดสอบ (biotype ของแมลง) ดังรายงานการทดสอบกับหนอนกระทู้หอมของ Lin และ Leu (n.d.) ที่ฉีดพ่นสปอร์เชื้อราเขียว *M. anisopliae* ให้กับหนอนกระทู้หอม ด้วยการฉีดพ่นทุกวัน และเว้นระยะห่างกัน 1 วัน พบว่าหนอนมีเปอร์เซ็นต์การตายที่สูงเท่ากับ 70.0-73.3 และ 73.3-78.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงควรมีการทดสอบกับไอโซเลตอื่นๆ ที่ไม่ได้รับการสุ่มร่วมด้วยในโอกาสต่อไป เมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสกับประสิทธิภาพในการทำลายแมลงศัตรูนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. ต่างไอโซเลตกัน มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงชนิดเดียวกันได้แตกต่างกัน และแม้ว่าจะมีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสในปริมาณสูงแต่ก็ไม่ได้มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายสูงตามไปด้วยเสมอ ดังเช่น ไอโซเลต IPKKU222 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณที่สูงที่สุด (127.75 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) แต่กลับมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอมค่อนข้างต่ำคือ 9.33 และ 10.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และในบางไอโซเลตของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่นำมาศึกษานี้ให้ผลในทางกลับกัน กล่าวคือ ไอโซเลต IPKKU234 สามารถทำลายตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอมได้ จากผลการทดสอบกับแมลงศัตรูแต่ละชนิดภายใต้เงื่อนไขที่กำหนดในครั้งนี้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 80.67 และ 36.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพในการควบคุมอยู่ในระดับมากที่สุดและมาก แต่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสที่ต่ำคือ 16.38 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง หรือในไอโซเลต IPKKU178 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสอยู่ในระดับปานกลาง (51.49 GlcNAc-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) แต่มีประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยยุงรำคาญอยู่ในระดับเกือบมากที่สุด (70.67 เปอร์เซ็นต์) และสามารถทำลายหนอนกระทู้หอมได้ในระดับมาก (33.33 เปอร์เซ็นต์) ใกล้เคียงกับไอโซเลต IPKKU234 (36.67 เปอร์เซ็นต์) โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติกับไอโซเลต IPKKU234 ในการทำลายหนอนกระทู้หอม จากผลการทดลองกับไอโซเลตต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้ ชี้ให้เห็นว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสในเชิงปริมาณไม่มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการเข้าทำลายตัวเต็มวัยยุงรำคาญและหนอนกระทู้หอม อย่างไรก็ตาม ในแมลงบางชนิดมีรายงานว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสนั้น

มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการเข้าทำลายของเชื้อราเขียว เช่น จากรายงานการศึกษาในการใช้เชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตต่างๆ ควบคุมด้วงถั่วเขียว (cowpea weevil, *Callosobruchus maculates*) พบว่าเชื้อ *Metarhizium* sp. ไอโซเลต CG34 ทำให้ด้วงถั่วเขียวตายมากที่สุดเท่ากับ 26.7 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำไปตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคติเนสพบว่าเชื้อไอโซเลตนี้สามารถผลิตไคติเนสได้สูง (Murad et al., 2006) โดยในการศึกษาของ Murad และคณะนี้ยังจัดว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายที่อยู่ในระดับต่ำ ส่วน St. Leger et al. (1996) พบว่าระหว่างการเข้าทำลายผนังลำตัวหนอนใบยาสูบ (*Manduca sexta*) ในระยะเริ่มแรก เชื้อ *Metarhizium* spp. มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสในระดับต่ำมาก และจะเพิ่มขึ้นในช่วงที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ลดลง ซึ่งการปลดปล่อยเอนไซม์ไคติเนสนั้น จะขึ้นอยู่กับการย่อยสลายของโปรตีนของแมลงอันเนื่องมาจากเอนไซม์โปรตีเอสก่อน อีกทั้งพบว่าเอนไซม์ไคติเนสไม่เพียงแต่เกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายแมลงเท่านั้น ยังเป็นเอนไซม์หลักในการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์และการงอกของสปอร์เชื้อรา โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสนั้นอยู่ในระยะที่สองของการเข้าทำลายแมลง (St. Leger et al., 1996; Santi et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับ Liu et al. (1999) ที่สรุปว่าเชื้อ *Metarhizium* spp. จะสร้างเอนไซม์โปรตีเอสในช่วงแรกของการเข้าทำลายแมลง เพื่อใช้ย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังลำตัว ซึ่งจะถูกผลิตขึ้นโดยมีความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายผนังลำตัวชนิดอื่นๆ โดยในผนังลำตัวของแมลง พบว่ามีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (Clarkson and Charnley, 1996) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ไคติเนสก็ยังคงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมในการเข้าทำลายแมลงของเชื้อ *Metarhizium* spp. ซึ่งจากผลการศึกษาของ Boucias และ Penland (1998) รายงานถึงเอนไซม์ของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ใช้ในการย่อยผนังลำตัวของแมลงมีหลายชนิด เช่น โปรตีเอส, ไคติเนส, ไดเปปติดิลเปปติเดส (dipeptidylpeptidase), อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) และคาร์บอกซีเปปติเดส (caboxypeptidase) นอกจากนี้อาจมีปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการเข้าทำลายแมลงของเชื้อนอกจากเอนไซม์ไคติเนส และค่า pH ซึ่งมีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ไคติเนส (St. Leger et al., 1998) รวมทั้งสารพิษ destruxin เป็นตัวแปรที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเข้าทำลายของเชื้อ *Metarhizium* spp. ได้เช่นกัน (Boucias and Pendland, 1998) จากข้อมูลดังกล่าวนี้สามารถใช้เป็นแนวทางนำไปสู่การศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไคติเนสของเชื้อราเขียวนี้ และประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูต่างๆ ในโอกาสต่อๆ ไปได้อย่างดียิ่งอีกทางหนึ่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับยุงรำคาญ หรือยุงชนิดอื่นๆ ในช่วงที่มีโรคที่เกิดจากยุงเป็นพาหะระบาด จำเป็นต้องรีบควบคุมประชากรยุงให้ลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งการควบคุมตัวเต็มวัยยุงนี้ จะเป็นแนวทางลดประชากรของยุง โดยไม่ใช้สารเคมีได้อย่างดียิ่งอีกทางหนึ่งในเวลาอันสั้น ทั้งนี้จัดว่าเป็นแนวทางใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในต่างประเทศ (Mohanty et al., 2008) นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางสำคัญเพื่อการประยุกต์ใช้เชื้อรานี้ ซึ่งเป็นไอโซเลตท้องถิ่นโดยเฉพาะของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อให้ได้แนวทางควบคุมที่เหมาะสมกับแมลงเฉพาะพื้นที่ ทั้งทางตรงและโดยการผสมผสาน หรือโดยการนำเชื้อไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงไปพัฒนา โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อปรับปรุงการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูให้ดียิ่งหรือมีฤทธิ์ที่กว้างขึ้นในโอกาสต่อไป ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างดำเนินการอยู่โดยทีมงานวิจัยนี้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE), ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน และกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์และสถานที่ทดลอง, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยี

ชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์การใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัยและขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพงศ์ ลิมป์วิโรจน์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

สำนักโรคติดต่อจากแมลง. 2553. **การป้องกันและควบคุมโรคไข้ปวดข้อยุงลาย** [ออนไลน์] [อ้างเมื่อ 26 ม.ค. 2553] เข้าถึงได้จาก: http://www.thaivbd.org/cms/ index. php?option= com_ content& task=view&id=148&Itemid=0

Barreto, C.C., Staats, C.C., Schrank, A. and Vainstein, M.H. 2004. Distribution of chitinase in the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and effect of N-acetylglucosamine in protein secretion.**Current Microbiology** 48: 102-107.

Boucias, D.G. and Pendland, J.C. 1998. **Principles of insect pathology.** Kluwer Academic Publishers: Massachusetts.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.

Clarkson, J.M. and Charnley, A.K. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology** 4(5): 197-203.

Hartwig, J. and Oehmig, S. 1992. Bio 1020-behavior in the soil and important factors affecting its action. **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer** 45(63): 159-176.

Lezama-Gutierrez, R., Trujillo-De La Luz, A., Molina-Ochoa, J., Rebolledo-Dominguez, O., Pescador, A.R., Lopez-Edwards, M. and Aluja, M. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera : Tephritidae) : Labolatory and field trials. **Journal of Economic Entomology** 93(4): 1080-1084.

Lin, C.-Y. and Leu, W.-T. n.d. Control of beet armyworm with entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae.* **Bulletin of the Hualien District Agricultural Improvement Station** 7: 131.

Liu, B.L. and Tzemg, Y.M. 1999. Water content and water activity for production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae.* **Biotechnology Letter** 21: 657-661.

Mohanty, S.S., Raghavendra, K., Mittal, P.K. and Dash, A.P. 2008. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus.* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 35: 1199-1202.

Murad, A.M., Laumann, R.A., Lima, T.A., Sarmento, R.C., Norohha, E.F., Rocha, T.L., Valadares-Ingglis, M.C. and Franco, O.L. 2006. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 142: 365–370.

Santi, L., Silva, W.O.B., Pinto, A.F.M., Schrank, A. and Vainstein, M.H. 2010. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology** 114: 312-319.

Scholte, E.-J., Takken, W. and Knols, B.G. 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Acta Tropica** 102: 151-158.

_____ , Njiru, B.N., Smallegange, R.C., Takken, W. and Knols, B.G.J. 2003. **Infection of malaria (*Anopheles gambiaes* s. s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vector with entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae.** [Online][cited 22 Nov 2009] Available from: URL: http://www.malaria-ajournal.com/content/2/1/29.

Somogyi-Nelsons, M. 1952. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry** 195: 19-23.

St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D. 1998. Ambient pH is major determinant in expression of cuticle-degrading enzyme and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology** 64(2): 709-713.

_____ , Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93: 6349-6354.

Valadares – Inglis, M.C. and Peberdy, J.F. 1997. Location of chitinolytic enzymes in protoplast and whole cells of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research** 101(2): 1393-1396.

Zimmerman, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus, pp. 113-128. *In* Ester, M. (ed.), **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer** 45(63): 113-128.