

การควบคุมการแพร่ระบาดของตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ด้วยเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. และการโคลนยีนโปรตีเอส (*pr1*)

Controlling on Adult Dengue Mosquito (*Aedes aegypti*) Dissemination by Using Green Muscardine Fungi *Metarhizium* spp. and Protease (*pr1*) Gene Cloning

อิทธิเดช พิริยะนิตติ (Ittdate Piriyaniti)¹

ศิริลัย สิริมังการรัตน์ (Sivilai Sirimungkararat)^{2*}

วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ (Weerasak Saksirirat)³

หทัยรัตน์ อุไรรงค์ (Hathairat Uairong)⁴

เบญจมาศ แก้วรัตน์ (Benjamat Kaewrat)⁵

บทคัดย่อ

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ตัวเต็มวัยเป็นแมลงพาหะนำโรคที่สำคัญหลายชนิดสู่คน การลดจำนวนประชากรตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านโดยเฉพาะช่วงที่มีการระบาด จะเป็นแนวทางการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคได้อย่างดียิ่ง การวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นการป้องกันกำจัดเพื่อลดอันตรายจากการใช้สารเคมีฆ่าแมลง โดยการนำเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. จำนวน 15 ไอโซเลตที่รวบรวมได้จากภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมาใช้ศึกษาและทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน ซึ่งจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (*Pr1*) ในเชิงปริมาณ พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 3.36 - 379.21 ไทโรซีน-โมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงคือ IPKKU 218, Lop2/2 และ IPKKU 216 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 379.21, 100.07 และ 64.43 ไทโรซีน-โมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนความสามารถของเชื้อราในการทำลายตัวเต็มวัยยุงนั้นอยู่ในช่วง 28.67 - 81.33 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลต Lop2/2 มีประสิทธิภาพสูงสุด (81.33 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือไอโซเลต IPKKU 218 (78.00 เปอร์เซ็นต์) และ IPKKU 216 (71.33 เปอร์เซ็นต์) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ทั้ง 3 ไอโซเลต สำหรับการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (*pr1*) ของเชื้อ ไอโซเลต Lop2/2 ที่มีประสิทธิภาพในการทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้านสูงสุดและมีกิจกรรมของเอนไซม์ *Pr1* สูงนั้น ดำเนินการโดยเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *Pr1F1* และ *Pr1R1* แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้เชื่อมเข้ากับพลาสมิด pDrive cloning vector ส่งถ่ายเข้าสู่ QIAGEN EZ competent cell คัดเลือกโคลน สกัดพลาสมิดที่มีส่วนผลิตภัณฑ์ PCR

¹ นักศึกษาปริญญาโท, ^{2,3} รองศาสตราจารย์, ^{4,5} นักวิชาการเกษตร

^{1,2,3} สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา (AG-BIO/PERDO-CHE)

^{2,3} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ป่นเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม มหาวิทยาลัยขอนแก่น

^{4,5} สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี

* Corresponding author, e-mail: sivilai@kku.ac.th

เป้าหมายนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน elastase-like serine protease ของเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* (AB073327) ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพที่ดีของเชื้อราเขียว *M. anisopliae* เพื่อนำไปใช้ป้องกันกำจัดตัวเต็มวัยยุงลายบ้านโดยตรง แนวทางการนำไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นแบบผสมผสาน และการประยุกต์ใช้ยีน *pr1* เพื่อผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อเพิ่มศักยภาพในการควบคุมยุงลายบ้านและแมลงศัตรูชนิดอื่นอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

Abstract

Adult dengue mosquito (*Aedes aegypti*) is an important vector of human diseases. Reduction of adult mosquito population, especially in dissemination time is an effective control method of disease epidemic. This study was emphasized on reduction of insecticide application to control mosquito by using entomopathogenic fungus. The green muscardine fungi, *Metarhizium* spp. 15 isolates selected from collection in the northeast of Thailand were investigated for efficiency on controlling adult dengue mosquito. Quantitative protease (Pr1) activity was evaluated among *Metarhizium* isolates. Enzyme activities were ranked 3.36 to 379.21 tyrosine (μmol) / mg protein / hr. The 3 high protease activities were isolates IPKKU 218, Lop2/2 and IPKKU 216 with values 379.21, 100.07 and 64.43 tyrosine (μmol)/mg protein/hr, respectively. The pathogenic test of these fungi on dengue mosquito revealed percent mortality rates of 28.67 - 81.33%. The highly effective isolates with mortality percentage in parenthesis were Lop2/2 (81.33 %), IPKKU 218 (78.00 %) and IPKKU 216 (71.33%), which were not significantly different ($P>0.05$). DNA fragment coding protease gene (*pr1*) from the most effective isolate (Lop 2/2) against *Ae. aegypti* and the high Pr1 activity was amplified by polymerized 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, extracted for plasmid containing target PCR product and submitted for base sequencing. The base sequences were compared by subsection the sequence to GenBank database and found that it was similar to elastase-like serine protease from *Metarhizium anisopliae* (AB073327) with 96% similarity. This research indicates the good 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 either the protease production using genetic engineering technology or the effective control on adult dengue mosquito and other pests.

คำสำคัญ : การควบคุม, การโคลนยีนโปรตีเอส, เชื้อราเขียว, ตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน

Keywords: Adult dengue mosquito, control, *Metarhizium* spp., protease gene cloning

บทนำ

ยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti* L.) จัดเป็นแมลงพาหะที่มีความสำคัญต่อมนุษย์อีกชนิดหนึ่ง โดยเป็นพาหะนำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคที่สำคัญหลายชนิด เช่น โรคไข้เลือดออก (dengue fever) โรคไข้เหลือง (yellow fever) และ โรคชิกุนกูญา (chikungunya) (Platt et al., 1997; Harrington et al., 2001; MacKenzie et al., 2004) ในการป้องกันกำจัด ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัยนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การลดแหล่งเพาะพันธุ์ของยุง การใช้สารเคมีซึ่งการใช้สารเคมีนั้นได้รับความนิยมสูง เนื่องจากให้ผลรวดเร็ว แต่สิ่งที่ต้องตระหนักคือ สารเคมีควรมีประสิทธิภาพสูง ขณะเดียวกันมีพิษน้อยต่อคนและสัตว์ การใช้ต้องมีความระมัดระวังและถูกวิธี (สำนักโรคติดต่อจากแมลง, 2553) อย่างไรก็ตามไปสารเคมีฆ่าแมลงมักมีอันตรายสูงต่อ คน สัตว์ และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นเพื่อเป็นการลดอัตราเสี่ยงดังกล่าว การควบคุมทางชีววิธี โดยเฉพาะการใช้เชื้อจุลินทรีย์จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น การใช้เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อรา

สำหรับเชื้อราสาเหตุโรคแมลงชนิดที่ได้รับความนิยมทั่วโลกคือ เชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ซึ่งมีรายงานถึงความสามารถในการเข้าทำลายแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด (species) (Zimmermann, 1992) รวมทั้งมีการรายงานถึงความสามารถในการควบคุมยุงหลายชนิด เช่น ยุงลายบ้าน ยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) ยุงรำคาญ (*Culex quinquefasciatus*) และยุงก้นปล่อง (*Anopheles gambiae* s.s.) (Scholte et al., 2003; Scholte et al., 2007) ด้วยเหตุนี้การนำเชื้อ *Metarhizium* spp. มาใช้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านจึงเป็นทางเลือกที่กำลังได้รับความสนใจเพื่อลดประชากรในช่วงที่มีการระบาดของโรคที่ตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านเป็นพาหะ การวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาประสิทธิภาพในการเข้าทำลายตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน กิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อราในการย่อยผนังลำตัวของแมลงโดยเฉพาะเอนไซม์โปรตีนเอส (Pr1) เนื่องจากผนังลำตัวของแมลงมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70 % (Clarkson and Charnley, 1996) รวมทั้งการ

โคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส (pr1) ของเชื้อราเขียวจาก ไอโซเลตท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เพื่อการนำไปประยุกต์อย่างมีประสิทธิภาพ โดยอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพและการนำไปใช้เพื่อการควบคุมโดย ชีววิธีโดยตรงหรือโดยการผสมผสาน ซึ่งจะเป็นแนวทางในการอนุรักษ์สภาพแวดล้อม และช่วยลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงได้อย่างดียิ่งอีกทางหนึ่งต่อไป

วิธีการวิจัย

1. เชื้อราเขียว

เชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. จำนวน 100 ไอโซเลตที่รวบรวมนั้น ได้รับความอนุเคราะห์จากศิริลย์สิริมังกรรัตน์และอลกต โพธิ์ดี ห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างดินหรือตัวอย่างแมลงที่สำรวจ และรวบรวมได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากนั้นนำมาสุ่มเลือกเชื้อราดังกล่าวจำนวน 15 ไอโซเลต เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยนี้ โดยนำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณในอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ส่วนการเก็บรักษาเชื้อเพื่อเป็นสต็อกนั้นจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ยุงลายบ้าน

สำรวจและเก็บตัวอ่อน (ลูกน้ำ) ยุงลายบ้าน (*Ae. aegypti*) จากภาชนะที่ใส่น้ำในเขตที่อยู่อาศัยของคน นำมาเพาะเลี้ยงด้วยอาหารกระด้างแบบเม็ด และให้อาหารตัวเต็มวัย (ยุง) ด้วยน้ำหวาน 10 เปอร์เซ็นต์ผสมวิตามินรวม เลี้ยงในกรงขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร ที่มีฝาเป็นตาข่าย ในการเพาะเลี้ยงยุงลายบ้านนั้นได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในเชิงปริมาณ

เพาะเลี้ยงเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เขย่าที่ความเร็วรอบ 120

รอบก่อนที่ นาน 14 วัน กรองเอา culture filtrate มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน นำ culture filtrate จำนวน 0.5 มิลลิลิตรต่อไอโซเลต ไปบ่มร่วมกับสารละลายเคซีน (casein) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3.0 มิลลิลิตร ผสมส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.4 M โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 2.5 มิลลิลิตร และ Folin Ciocalteu phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สารละลายที่ได้นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส (Pr1) โดยการวิเคราะห์กิจกรรมจากปริมาณกรดอะมิโนคิดเป็นไมโครกรัมโมเลกุล (μmol) ที่ถูกย่อยออกจากเคซีน ซึ่งใช้ tyrosine เป็นมาตรฐาน (tyrosine equivalent) ต่อมิลลิกรัมของโปรตีนในเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงตามวิธีของ Yang and Wang, 1999) วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) โดยการทดลองทั้งหมด มี 15 กรรมวิธี (ไอโซเลต) จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวต่อยุงลายบ้าน

การปลูกเชื้อราเขียวให้กับตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านนั้นประยุกต์ตามวิธีของ Scholte et al. (2003) โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตรใน Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 5 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษถ่ายเอกสารที่นิ่งมาเชื้อแล้ว ขนาด 12 x 20 เซนติเมตร หยดเชื้อให้กระจายทั่วกระดาษ รองกระดาษแห้งหมาดๆ นำกระดาษมาวางด้านในแก้วพลาสติกขนาด 20 ออนซ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางปากแก้ว 9.5 เซนติเมตร สูง 17.5 เซนติเมตร) หลังจากนั้นปล่อยตัวเต็มวัยยุงลายบ้าน ใส่ในแก้วที่เตรียมไว้จำนวน 50 ตัวต่อซ้ำทำ 3 ซ้ำต่อไอโซเลต ปิดปากแก้วด้วยแผ่นพลาสติกใส และใช้หนัวยารัดที่พลาสติก ในส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้ Tween 20 เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้สารแขวนลอยสปอร์

โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับกรรมวิธีทดลอง ใช้สำลีชุบน้ำฝึความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์วางภายในแก้วเพื่อเป็นอาหารตัวเต็มวัยและใส่สำลีชุบน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อแล้วเพื่อให้ความชื้น โดยให้น้ำฝึและความชื้นเท่าๆ กันทุกซ้ำๆ ตลอดช่วงของการทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายกระดาษที่มีสปอร์ของเชื้อราออกจากแก้ว และตรวจสอบการตายของยุงทุกวัน เพื่อนำไปตรวจหาและคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายที่แท้จริงจากเชื้อ *Metarhizium* spp.

5. การเตรียมดีเอ็นเอ

นำเส้นใยของเชื้อ *Metarhizium* spp. ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมยุงลายบ้านมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี CTAB ตามวิธีการของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6. การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส ของเชื้อ ไอโซเลต Lop2/2 ด้วยไพรเมอร์ ซึ่งได้ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของยีน *pr1* จากฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งได้ไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'-CTCAGGCTGAGAGCAT CATT-3' (Pr1F1) และ 5'-TCATAATGTACTTGGT-GAAG-3' (Pr1R1) สารละลายปฏิกิริยา (master mix) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 200 นาโนกรัม ต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, คีอ็อกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, แมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl_2) 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc.) 500 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 15 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle ด้วยโปรแกรม ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส

นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ ขึ้นสุดท้าย 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ

เชื่อมต่อไปดักกันท์ PCR กับเวกเตอร์ pDrive cloning vector และใช้ชุด QIAGEN PCR Cloning kit เพื่อส่งถ่ายเข้าคอมพีเทนต์เซลล์ (QIAGEN EZ competent cell) เลี้ยงคอมพีเทนต์เซลล์ดังกล่าวบนอาหาร Luria Bertani medium (LB) ที่มี ampicillin อยู่ 80 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ซึ่งได้ spread สาร IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactopyranoside) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนจึงคัดเลือกโคลนี (โคลน, clone) ที่มีสีขาวซึ่งมีผลิตภัณฑ์ PCR ในเซลล์ (blue - white selection) นำโคลนที่คัดเลือกได้มาทำให้บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณ จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Gene Jet[™] Plasmid Miniprep kit ส่งพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR เป้าหมายที่สกัดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้บริการของบริษัท 1st BASE จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank

ผลการวิจัย

1. การรวบรวมและคัดเลือกเชื้อ *Metarhizium* spp.

เชื้อ *Metarhizium* spp. ที่สุ่มคัดเลือกได้ 15 ไอโซเลตนี้เพื่อใช้ในการทดลอง โดยเป็น ไอโซเลตที่แยกได้จากตัวอย่างดิน และได้เก็บรักษาเชื้อไว้ในห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการวิจัยของศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางเกษตรกรรมมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ IPKKU 169 IPKKU 178, IPKKU 186, IPKKU 200, IPKKU 208, IPKKU 210, IPKKU 212, IPKKU 214, IPKKU 215, IPKKU 216, IPKKU 218, IPKKU 219 และ IPKKU 242 (อลงกต โพธิ์ดี และ ศิวัญ สิริมงคลรัตน์ ติดต่อบริษัท) และอีก 2 ไอโซเลต

แยกได้จากดินจากแปลงปลูกยางพาราในจังหวัดเลยและหนองบัวลำภูคือ ไอโซเลต Lop2/2 และ Npp2/6

2. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณและประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายบ้านของเชื้อ *Metarhizium* spp.

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณ คำนวณโดยเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนใน culture filtrate และความสามารถในการย่อยสารละลาย เคซีน (casein) แสดงให้เห็นถึงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสมีค่าอยู่ระหว่าง 3.36 - 379.21 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง โดยไอโซเลต IPKKU 218 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงที่สุด (379.21 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) กับ 2 อันดับรองลงมาคือ Lop2/2 (100.07 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) และ IPKKU 216 (64.43 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) ตามลำดับ โดยไอโซเลต IPKKU 219 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสต่ำที่สุด (3.36 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) และเมื่อนำเชื้อมาทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต Lop2/2 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด โดยทำให้ยุงตายมีค่าเท่ากับ 81.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถสังเกตจากเส้นใยและสปอร์สีเขียวเจริญปกคลุมยุง (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) กับไอโซเลต IPKKU 218 และ IPKKU 216 ที่ทำให้ยุงมีเปอร์เซ็นต์การตายด้วยเชื้อ 78.00 และ 71.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 1. ลักษณะยุงลายบ้านที่ถูกเชื้อราเชื้อ *Metarhizium* sp. (Lop2/2) เข้าทำลาย

ตารางที่ 1. กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณและประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* spp. ในการทำลายตัวเต็มวัยของยุงลายบ้าน

ไอโซเลต	กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณ [ไทโรซีน-โมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง] ¹	เปอร์เซ็นต์การตาย ^{1,2}
IPKKU 169	10.46 efg	35.33 e
IPKKU 178	20.88 d-g	69.33 bc
IPKKU 186	14.55 efg	47.33 d
IPKKU 200	5.81 fg	64.67 c
IPKKU 208	39.51 cde	68.00 bc
IPKKU 210	25.56 d-g	50.00 d
IPKKU 212	27.42 d-g	61.33 c
IPKKU 214	35.98 c-f	67.33 bc
IPKKU 215	32.09 d-g	62.00 c
IPKKU 216	64.43 c	71.33 abc
IPKKU 218	379.21 a	78.00 ab
IPKKU 219	3.36 g	35.33 e
IPKKU 242	7.11 fg	28.67 e
Lop 2/2	100.07 b	81.33 a
Npp 2/6	51.03 cd	64.00 c
C.V. (%)	30.24	9.88

^{1/} ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$, DMRT)

^{2/} เปอร์เซ็นต์การตายแก้ไขโดยใช้ Abbott's formula (Abbott, 1925)

3. การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* sp.

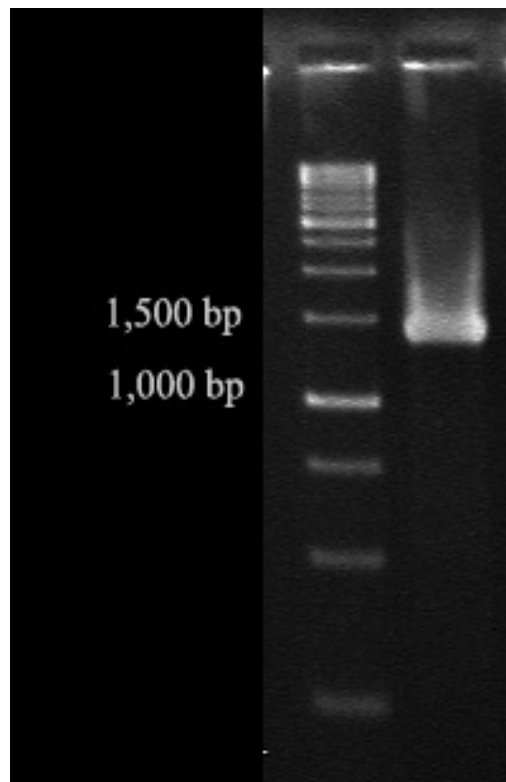
เนื่องจากประสิทธิภาพในการเข้าทำลายยุงลายบ้านของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop 2/2 นั้นมีค่าสูงสุด จึงได้คัดเลือกเชื้อไอโซเลตนี้มาเพิ่มปริมาณในส่วนของการควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ด้วยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 2) จึงนำผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อรา

Metarhizium ไอโซเลต Lop2/2 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกำจัดยุงลายบ้านไปโคลนแล้วสกัดดีเอ็นเอจากพลาสมิดที่มียื่นเป้าหมาย นำยื่นเป้าหมายนั้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งได้ลำดับ นิวคลีโอไทด์จำนวน 1,439 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ผลการเปรียบเทียบแสดงให้เห็นว่า ลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pr1* elastase-like serine protease ของเชื้อรา *M. anisopliae* (accession number AB073327)

96 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 3) พบว่ายีน *pr1* ประกอบด้วย 4 exon (1..192, 269..454, 514..1026, 1099..129) หรือเรียกว่าเป็นส่วนของ coding sequence ซึ่งสามารถแปลเป็นรหัสโปรตีน (translation) ได้กับ 3 intron (193..268,

455..513, 1027..1098) และพบว่าความยาวนิวคลีโอไทด์ของ intron มีความผันแปรตั้งแต่ 58-75 คู่เบส และมีลำดับเบสซ้ำที่อยู่ระหว่าง exon : intron คือ NGGTAAGT อยู่ช่วงต้นของทุก intron เหมือนกันทั้งสามแห่ง

1 2



รูปที่ 2. ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อรา *Metarhizium* sp. เมื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *pr1* ด้วยไพรเมอร์ Pr1F1 และ Pr1R1
 เลนที่ 1 : 1 kb DNA Ladder Plus
 เลนที่ 2 : เชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop2/2

ด้วยเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. และการโคลนชิ้นโปรตีนเอส (pr1)

```

gi|16506135|dbj|AB073327.1| ACTCCTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCGACAAAGTATATTGTCAAAGTTCAA 50
Lop2/2pr1 ----CTCAGGCTGAGAGCATCATTGCCAGACAAAGTATATTGTCAAAGTTCAA 46
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| GGATGATATTGCCCCGATCGCTACCGATGACACGGTGACCGCTCTTACCT 100
Lop2/2pr1 GGATGATATTGCCCCGATCGCTACCGATGACACGGTGACCGCTCTTACCT 96
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCGCTTCCATGGGTTTGACGGCTCC 150
Lop2/2pr1 CCAAAGCCGACTTCGTTTACGAGCACGCGCTTCCATGGGTTTGACGGCTCT 146
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CTCACC AAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGTAC 200
Lop2/2pr1 CTCACC AAGGAGGAGCTGAAGATGCTTCGTGAGCACCCCGGTGTAAGTAC 196
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CCCCTCCACCTTACCTAGGTAGTCAAGGGAGACATGTAGGTGTTTGTTC 250
Lop2/2pr1 CCCCTCCACCTTACCTAGGTAGTCAAGGGAGACATGTAGGTGTTTGTTC 246
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TGACCCGCTGCCCATAGGTCGATTTTCATTGAGAAGGACGCCGTGATGCG 300
Lop2/2pr1 TGACCTGCTGCCCATAGGTCGATTTTCATTGAGAAGGACGCCGTGATGCG 296
****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TATCAGCGGCATCACTGAGCAGACGCGTGTCCCTGGGGCTTTGGGCGCA 350
Lop2/2pr1 TATCAGCGGCATCACTGAGCAGACGCGTGTCCCTGGGGCTTTGGGCGCA 346
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TCTCACCACCGCCAGAAAGGAAAGCAACACCTATCGCTACGATGATAGTGCC 400
Lop2/2pr1 TCTCACCACCGCCAGAAAGGAAAGCAACACCTATCGCTACGATGATAGTGCC 396
****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| GGTGAGGGTACTTGCCTATATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCCTTCA 450
Lop2/2pr1 GGTGAGGGTACTTGCCTATATATCATTGACACTGGTATTGAGGCCCTTCA 446
****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CCCCCTAAGTTGTGCCGCAAAACTCCATAGTGGGAGTAGGAAATTTAC 500
Lop2/2pr1 CCCCCTAAGTTGTGCCGCAAAACTCCATAGTGGGAGTAGGAAATTTAA 496
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CAATATCATCCAGGATTTTGGGGGTCGCGCACCTTTTCTTAAAGCTTTCA 550
Lop2/2pr1 CAATATCATCCAGGATTTTGGGGGTCGCGCACCTTTTCTTAAAGCTTTTA 546
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TCAGCGGTCAAAACAGTGCATGGCCACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGT 600
Lop2/2pr1 TCAGCGGTCAAAACAGTGCATGGCCACGGCCATGGGACTCACTGCGCTGGT 596
*
gi|16506135|dbj|AB073327.1| ACCATTGGTAGCAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGG 650
Lop2/2pr1 ACCATTGGTAGCAAAAGCTACGGTGTGGCCAAAAGGCTAAGCTCTATGG 646
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TGTCAAAGTTCTTGCACAAACAGGGCAGTGCTTCTACTCCGGTATCATCA 700
Lop2/2pr1 TGTCAAAGTTCTTGCACAAACAGGGCAGTGCTTCTACTCCGGTATCATCA 696
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| GTGGCATGGACTACGTTGACAGGACTCCAAGACCCGCGGCTGCCCTAAA 750
Lop2/2pr1 GTGGCATGGACTACGTTGACAGGACTCCAAGACCCGCGGCTGCCCTAAA 746
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| GCGGCCAATGCTTCCATGAGCCTGCGGAGGTGGCTACTCGCGCTCCGCTCA 800
Lop2/2pr1 GCGGCCAATGCTTCCATGAGCCTGCGGAGGTGGCTACTCGCGCTCCGCTCA 796
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTCAAATCTGGTGTCTTCTTGGCGCTCGCG 850
Lop2/2pr1 CCAAGGTGCTGCTGCTTTGGTCAAATCTGGTGTCTTCTTGGCGCTCGCG 846
****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAAACCTCTCCCGCTTCCGAGCCT 900
Lop2/2pr1 CTGGCAACGATAACCGGGATGCCAGAAACCTCTCCCGCTTCCGAGCCT 896
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TCTGCCGCACTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTTCCCT 950
Lop2/2pr1 TCTGCCGCACTGTTGGTGCCACTGATTCAAATGACAACCGATCTTCCCT 946
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CTCCAACTACGGCAAGTTGTCGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTT 1000
Lop2/2pr1 CTCCAACTACGGCAAGTTGTCGATATTTTCGCTCCTGGTACCGGTGTT 996
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATA 1050
Lop2/2pr1 TTTCCACCTGGATTGGTGGCAGCACTGTAAGTATTGTACCTACCTCGATA 1046
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| AGCTTAGAGACAGGCTTTTGTCTTCAAGAACAGCTCTAACAAGGTTTAGAA 1100
Lop2/2pr1 AGCTTAGAGACAGGCTTTTGTCTTCAAGAACAGCTCTAACAAGGTTTAGAA 1096
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CACCATCTCTGGCACCTCATGGCTACTCCCATATTGCGCGTCTGGCTG 1150
Lop2/2pr1 CACCATCTCTGGCACCTCATGGCTACTCCCATATTGCGCGTCTGGCTG 1146
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CCTACCTCAGTGGCTCCAAAGGCAAGACTACCCCTGCGGCTCTTTGCAAG 1200
Lop2/2pr1 CCTACCTCAGTGGCTCCAAAGGCAAGACTACCCCTGCGGCTCTTTGCAAG 1196
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| AAGATC CAGGACACTGCTACCAAGAACGCGCTCACC GGTTTCCCTCTGG 1250
Lop2/2pr1 AAGATC CAGGACACTGCTACCAAGAACGCGCTCACC GGTTTCCCTCTGG 1246
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| CACTGTCAACTACCTTGCCTACAAACGGCAACGGTGCTAAATTTCTTAAT 1300
Lop2/2pr1 CACTGTCAACTACCTTGCCTACAAACGGCAACGGTGCTAAATTTCTTAAT 1296
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| TGAGCATGGGGGGA-----ATCCTTCAGTGAAGAGACGGCGATTGGTT 1343
Lop2/2pr1 TGAGCCGGGGGGGGGAGACCTTCAGTGAAGAGACGGCGATTGGTT 1346
****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| GGTTGTATATTGAGATGATTTC AACCGTCGAATCCCCC--AAAGGT 1391
Lop2/2pr1 GGTTGTATATTGAGATGATTTC AACCGTCGAATCCCCC--AAAGGT 1396
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| ATATATTTATATTTCTATATCTTTCACCAAGTACATTATGATGATGGA 1441
Lop2/2pr1 ATATATTTATATTTCTATATTTTCACCAAGTACATTATGA----- 1439
*****
gi|16506135|dbj|AB073327.1| ACGTCA 1447
Lop2/2pr1 -----

```

รูปที่ 3. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *pr1* ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop2/2 กับยีน *pr1* elastase-like serine protease จากเชื้อ *M. anisopliae* (AB073327) ในฐานข้อมูล GenBank (บริเวณที่มีเครื่องหมาย * แสดงความเหมือนกันของนิวคลีโอไทด์)

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

เชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ไอโซเลตภาคตะวันออกเฉียงเหนือจำนวน 15 ไอโซเลต เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านนั้น พบว่ามีการตายอยู่ในช่วง 28.67 - 81.33 เปอร์เซ็นต์ โดยไอโซเลต Lop 2/2 มีประสิทธิภาพสูงสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 81.33 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองยังพบว่าอายุของยุงลายตัวเต็มวัยที่ได้รับการปลูกเชื้อมีอายุสั้นลง เมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Scholte et al. (2007) ที่พบว่าวงจรชีวิตของยุงลายบ้านและยุงลายสวนที่ปลูกด้วยเชื้อ *M. anisopliae* มีอายุสั้นลง เมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และจากผลการทดสอบพบว่าไอโซเลต Lop 2/2 และไอโซเลต IPKKU 218 มีประสิทธิภาพสูงสุดและสูงในการควบคุมยุงลายบ้านเท่ากับ 81.33 และ 78.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่สูง-สูงที่สุด โดยไอโซเลต Lop2/2 มีค่าเท่ากับ 100.07 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และไอโซเลต IPKKU 218 มีค่าเท่ากับ 379.21 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง และจากการวิจัยของ Sirimungkararat et al. (2009) พบว่าเชื้อราเขียวไอโซเลต IPKKU 218 มีประสิทธิภาพในการควบคุมหนอนนก (yellow mealworm; *Tenebrio molitor*) สูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 90.48% ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu et al. (2007) ที่รายงานถึงความสำคัญของเอนไซม์โปรตีนเอสว่า มีผลต่อความรุนแรงของเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยเชื้อจะปลดปล่อยเอนไซม์โปรตีนเอสในช่วงแรกของการเข้าทำลายแมลง เพื่อใช้ย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังลำตัวในแมลง และยังพบว่าเอนไซม์โปรตีนเอสที่เรียกว่า Pr1 ถูกผลิตขึ้นโดยมีความเข้มข้นที่สูงและรวดเร็วกว่าเอนไซม์ย่อยสลายผนังลำตัว (cuticle-degrading enzyme) ชนิดอื่นๆ เพื่อย่อยสลายโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของผนังลำตัวของแมลง ซึ่งในผนังลำตัวของแมลงพบว่ามีโปรตีนเป็นส่วนประกอบมากถึง 70% (Clarkson and Charnley, 1996) ดังนั้นเอนไซม์โปร

ตีนเอสจึงเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญมากที่จะช่วยส่งเสริมในการเข้าทำลายแมลงของเชื้อ แต่ก็ไม่เสมอไป ซึ่งจะเห็นได้จากการที่ไอโซเลต IPKKU200 แม้จะมีประสิทธิภาพในการควบคุมยุงลายบ้านที่สูง คือมีค่าเท่ากับ 64.67 เปอร์เซ็นต์ แต่กลับมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสต่ำมาก (5.81 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) เมื่อเทียบกับไอโซเลตอื่นๆ จึงไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการเข้าทำลาย และเมื่อทดสอบเชื้อราเขียวไอโซเลต Lop 2/2 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสที่สูง (100.07 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง) มาทดสอบกับหนอนนกกลับพบเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนนกที่ต่ำ (39.88%) (Sirimungkararat et al., 2009) แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพสูงสุดกับตัวเต็มวัยยุงลายบ้านก็ตาม ทั้งนี้ยังอาจจะมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการเข้าทำลายแมลงของเชื้อนอกจากเอนไซม์โปรตีนเอส เช่นเดียวกับผลของ Wang et al. (2002) ที่ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *M. anisopliae* ที่ไม่มียีนสร้าง Pr1 แต่ก็สามารถเข้าทำลายแมลงได้เช่นกัน ทั้งนี้ อาจจะมีเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เชื้อใช้ในการย่อยผนังลำตัวของแมลง เช่น dipeptidyl peptidase, carboxypeptidase, chitinase, lipase, esterase และ aminopeptidase (Boucias and Penland, 1998) อีกทั้งค่าความเป็นกรดและด่าง (pH) ยังเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไคตินเนสนั้นค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5 ในส่วนของเอนไซม์อะมิโนเพปติเดสค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6 - 8 ส่วนที่ pH 8 จะเป็นค่าที่เหมาะสมของเอนไซม์ subtilisin-like และ trypsin-like (St. Leger et al., 1997) นอกจากนี้สารพิษ destruxin อาจจะเป็นตัวแปรที่สำคัญอีกประการหนึ่ง ที่จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการเข้าทำลายของเชื้อ *Metarhizium* spp. เช่นกัน ดังนั้นประสิทธิภาพของเชื้อ *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop 2/2 ต่อตัวเต็มวัยยุงลายบ้านนั้นอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยเหล่านี้ร่วมกัน นอกจากนั้นในการควบคุมยุงลายบ้านนั้นสามารถทำได้โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งสามารถกำจัดได้ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนจนถึงตัวเต็มวัย โดยมีการรายงานต่างๆ เช่น การทดสอบของ Mercer et al. (1995) ในการใช้เชื้อ *Bacillus thuringiensis*, B.

sphaericus, *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia* ซึ่งมีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนของยุง 3 ชนิดคือ *Ae. polynesiensis*, *Ae. aegypti*, และ *Culex quinquefasciatus* โดยเฉพาะอย่างยิ่งการทดสอบของ Scholte et al. (2007) ซึ่งนำเชื้อ *M. anisopliae* มาทดสอบกับตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านและยุงลายสวน (*Ae. albopictus*) โดยการทาเชื้อบริเวณที่ยุงตัวเต็มวัยเกาะพัก (resting site) เมื่อยุงติดเชื้อและตายไปจะไม่สามารถวางไข่ได้ ทำให้ลดประชากรของยุงลงได้มาก ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อ *M. anisopliae* สามารถเข้าทำลายยุงลายบ้านและยุงลายสวนได้เช่นกัน จากการรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการควบคุมตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านโดยชีววิธี ซึ่งอาจจะมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น โดยนำไปใช้ร่วมกับเชื้อชนิดอื่นๆ หรือวิธีอื่นโดยการผสมผสาน อีกทั้งโดยการพัฒนาให้สามารถควบคุมยุงได้หลายชนิดต่อไป

ส่วนการโคลนยีน *pr1* โดยใช้ชุดทดสอบ (kit) QIAGEN PCR Cloning kit ได้ผลิตพันธุ์ PCR ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน *pr1* คือประมาณ 1,500 คู่เบส นำผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อรา *Metarhizium* ไอโซเลต Lop2/2 ซึ่งเป็นไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดยุงลายบ้านไปโคลน แล้วสกัดดีเอ็นเอจากพลาสติกที่มียีนเป้าหมาย แล้วนำยีนเป้าหมายนั้นไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,439 คู่เบส นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความเหมือนกับ *pr1* elastase-like serine protease จากเชื้อรา *M. anisopliae* (AB073327) ถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ผลการโคลนยีนโปรติเอสในการวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้ สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในแง่ของการตัดต่อยีนโปรติเอสนี้ให้กับเชื้อ *Metarhizium* ในชนิดเดียวกันหรือชนิดอื่น แม้กระทั่งให้กับเชื้อจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงได้มากขึ้น หรือทำให้มีเปอร์เซ็นต์การตายได้มากยิ่งขึ้น

ซึ่งงานวิจัยประเภทนี้ในต่างประเทศได้มีการศึกษาดังเช่น St. Leger et al. (1996) ซึ่งได้โคลนยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ cuticle-degrading protease ใส่เพิ่มเข้าไปในจีโนม (genome) เชื้อ *M. anisopliae* แล้วนำมาทดสอบกับหนอนใยสุบ (*Manduca sexta*) วัย 5 มีผลทำให้ค่า median survival time (ST₅₀) มีค่าอยู่ที่ 93 ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม (wild-type) ที่ไม่มีการตัดต่อยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเท่ากับ 120 ชั่วโมง ผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าควรที่จะต้องมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ Pr1 รวมทั้งปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อเพื่อการนำไปพัฒนาให้เชื้อราเขียวมีศักยภาพมากยิ่งขึ้น โดยอาศัยเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านการควบคุมแมลงศัตรูโดยชีววิธีโดยตรง หรือใช้ผสมผสานร่วมกับวิธีอื่นได้อย่างดียิ่งอีกทางหนึ่งต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE), ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน และกลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัยและการใช้เครื่องมือทางวิทยาศาสตร์, สำนักงานป้องกันควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น, สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จังหวัดปทุมธานี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพงศ์ ลิ้มปวีโรจน์ ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำในการศึกษาวิจัย

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

Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**. 18: 265-267.

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.

Harrington, L.C., Edman, J.D. and Scott, T.W. 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood. **J. Med. Entomol.** 38: 411-422.

Liu, S.H., Meng, Z.H., Yang, J.K., Fu, Y.X. and Zhang, K.Q. 2007. Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling. **BMC Structural Biology** 7(3) doi: 10.1186/1472-6807-7-33.

MacKenzie, J.S., Gubler, D.J. and Petersen, L.R. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile, and dengue viruses. **Nature Med.** 10(12): 98-107.

Mercer, D.R., Nicolas, L. and Thiery, I. 1995. Evaluation of entomopathogenic bacteria against *Aedes polynesiensis*, the vector of lymphatic filariasis in French Polynesia. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.** 11(4): 485-8.

Platt, K.B., Linthicum, K.J., Myint, K.S., Innis, B.L., Lerdthusnee, K. and Vaughan, D.W. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 57: 119-125.

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. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s. s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vector with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria Journal** 2(29): doi: 10.1186/1475-2875-2-29.

Sirimungkararat, S., Piriyaniti, I., Natongkham, A., Urairong, H., Saksirirat, W. and Kaewrat, B. 2009. **Protease gene cloning and the efficiency of local isolates of *Metarhizium anisopliae***. Agricultural Biotechnology International Conference. 22-25 September 2009. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok, Thailand.

St. Leger, R.J., Joshi, L. and Roberts, D. 1997. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied Environmental Microbiology** 64(2): 709-713.

- _____, R.J., Joshi, L., Bidochka, M.J. and Roberts, D.W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93: 6349-6354.
- Wang, C., Typas, M.A. and Butt, T.M. 2002. Detection and characterization of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters** 213: 251-255.
- Yang, S.S. and Wang, Y. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 40: 259-265.
- Zimmermann, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. **Pflanzenschutz Nachrichten Bayer** 45(63): 113-128.