

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญตาราง	ฎ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสาร	3
2.1 หนอนใยผัก	3
2.2 ผนังลำตัวของแมลง	5
2.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลง	7
2.3.1 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i>	8
2.3.2 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i>	8
2.3.3 เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	9
2.3.4 ความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	10
2.3.5 การพัฒนาของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายในแมลงอาศัย	11
2.3.6 ลักษณะอาการของแมลงอาศัยที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อรา	12
2.3.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโรคของแมลงโดยเชื้อรา	13
2.4 เอนไซม์ไคตินเอส	14
2.4.1 กระบวนการย่อยไคติน	15
2.5 เอนไซม์โปรติเอส	18
2.6 การควบคุมหนอนใยผัก และการศึกษาความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงกับกิจกรรมของเอนไซม์	19
2.7 เทคนิคเอสเอสซีพี (SSCP)	22

ลิขสิทธิ์ในเอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ของใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	24
3.1 การเลี้ยง และการเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	24
3.2 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	27
3.2.1 การเลี้ยง และเพิ่มปริมาณหนอนใยผัก	27
3.2.2 การทดสอบความรุนแรงของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงกับหนอนใยผัก	28
3.3 ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	32
3.4 การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	34
3.4.1 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส	34
3.4.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	35
3.5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์	35
3.6 การศึกษายีนไคตินเนส	36
3.6.1 การสกัดดีเอ็นเอ	36
3.6.2 การตรวจสอบคุณภาพ และวัดปริมาณของดีเอ็นเอ	37
3.6.3 การออกแบบไพรเมอร์	38
3.6.4 ปฏิกริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์	39
3.6.5 การตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน	39
บทที่ 4 ผลการทดลอง	41
บทที่ 5 วิเคราะห์ผลการทดลอง	66
บทที่ 6 สรุป	73
เอกสารอ้างอิง	75
ภาคผนวก	88
ภาคผนวก ก วิธีการเตรียมอาหาร และสารละลาย	89
ภาคผนวก ข วิธีการคำนวณที่ใช้ในการทดลอง และการข้อมมูล	94
ภาคผนวก ค วิธีการเตรียมซบัสเตรท การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนส และวิธีการทำเส้นมาตรฐาน	97

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ง วิธีการเตรียมซบสเตรท การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และวิธีการทำเส้นมาตรฐาน	102
ภาคผนวก จ การคำนวณหาค่า LT_{50} และ LC_{50}	107
ภาคผนวก ฉ ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	134
ภาคผนวก ช สารเคมี และอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์	137
ประวัติผู้เขียน	140

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright© by Chiang Mai University
 All rights reserved

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	9
2	ตัวอย่างการทดลองด้านความปลอดภัยในการใช้เชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> กับสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ	10
3	การหาค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ใช้ควบคุมหนอนใยผักวัย 2 ด้วยความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดีย/มิลลิลิตร	20
4	เชื้อราสาเหตุโรคแมลงรหัสด่าง ๆ ในประเทศไทย	24
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	38
6	การเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อราสาเหตุโรคแมลงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในสภาพห้องปฏิบัติการ	41
7	ค่า LT_{50} ในการทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2	45
8	ค่าการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) บนลำตัวหนอนใยผักวัย 2	46
9	อัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone และขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง colloidal chitin ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์	49
10	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเอส และเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	53
11	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ไคตินเอส และ เอนไซม์โปรติเอสในอาหารเหลว	54
12	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงทั้ง 10 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และอัตราส่วนระหว่างขนาดของ clear zone กับขนาดของโคโลนี	55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า	
13	ค่าความสัมพันธ์ (r) ระหว่างค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงหึ่ง 8 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผักวัย 2 และกิจกรรมของเอนไซม์โคติเนส และเอนไซม์ โปรติเอสในอาหารเหลว	56
14	ค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> spp. จำนวน 11 ไอโซเลท ที่ทดสอบกับหนอนใยผัก (<i>Plutella xylostella</i>) วัย 2	57
15	การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของดีเอ็นเอ	58
16	อุณหภูมิที่เหมาะสมของคูโพรเมอร์ในการเข้าจับกับดีเอ็นเอ (annealing) ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i>	60

สารบัญภาพ

รูป		หน้า
1	การพัฒนาระยะต่าง ๆ ของหนอนไยฝัก	5
2	ภาพตัดขวางของผนังลำตัวของแมลง	6
3	แท่งไคติน (chitin chain)	7
4	การจัดเรียงของแท่งไคติน (chitin chain) ในชั้น cuticle ของแมลง	7
5	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการย่อยสลายไคติน	15
6	หลักการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอสเอสซีพี (SSCP)	23
7	การเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนไยฝัก	28
8	การทดสอบกับหนอนไยฝักวัย 2 ในสภาพห้องปฏิบัติการ	32
9	การทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	34
10	การเตรียม crude enzyme จากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงจำนวน 8 รหัส	35
11	ปัญหาที่พบในการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณหนอนไยฝักในสภาพห้องปฏิบัติการ	43
12	ลักษณะของหนอนไยฝักที่เกิดจากเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i> เข้าทำลาย	44
13	ลักษณะของหนอนไยฝักที่เกิดจากเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> เข้าทำลาย	44
14	ลักษณะของ clear zone ที่เกิดจากเชื้อราสาเหตุโรคแมลงที่ผลิตเอนไซม์ไคตินเนสบนอาหารแข็ง	48
15	กิจกรรมของเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i> และ <i>Metarhizium</i> ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	50
16	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Beauveria</i> และ <i>Metarhizium</i> ในอาหารเหลว EPM ทุก ๆ 2 วัน	51
17	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นเชื้อราสาเหตุโรคแมลง (%) และค่า LT_{50} ของเชื้อราสาเหตุโรคแมลง	52
18	ลักษณะของแถบดีเอ็นเอของเชื้อราสาเหตุโรคแมลงสกุล <i>Metarhizium</i> จำนวน 6 ไอโซเลท	59

สารบัญภาพ (ต่อ)

รูป		หน้า
19	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนไคตินเนส <i>chit42 (chit1)</i> ด้วยไพรมอร์ 7 คู่	61
20	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-1</i>	62
21	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-2</i>	62
22	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-3</i>	63
23	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-4</i>	63
24	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-5</i>	64
25	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-6</i>	64
26	ลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เพิ่มปริมาณด้วยคู่ไพรมอร์ <i>chit42-7</i>	65