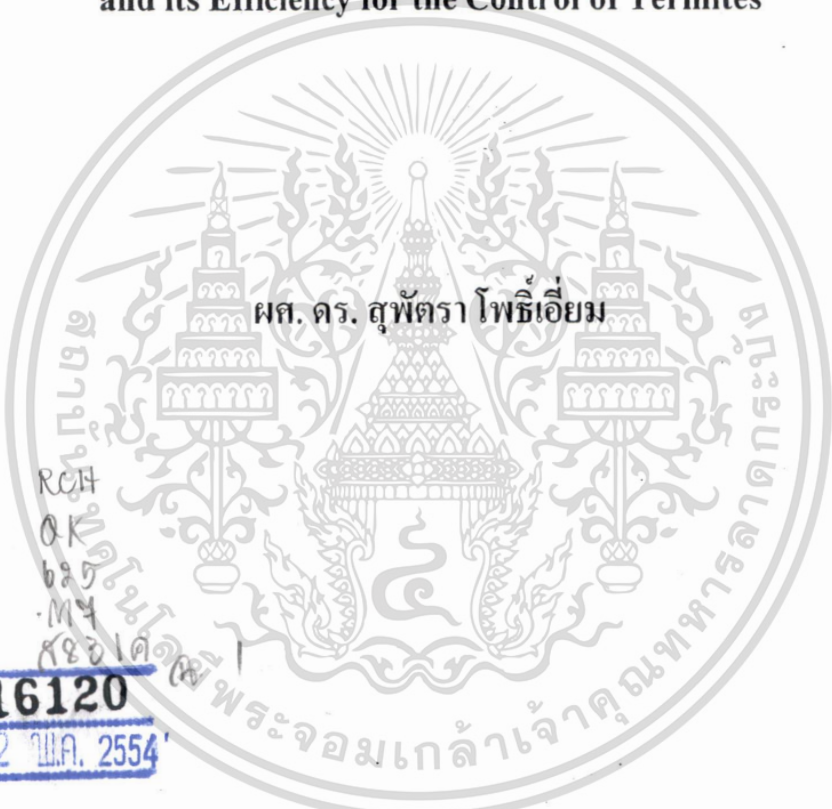


ความหลากหลายทางพันธุกรรม การคัดเลือก และการจำแนกสายพันธุ์ของ
เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลง *Metarhizium* sp.
จากพื้นที่การเกษตรในประเทศไทย
และการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีต่อการกำจัดปลวก

Genetics Variation, Selection and Identification of Entomopathogenic Fungi,
Metarhizium sp. from Agricultural Fields in Thailand
and its Efficiency for the Control of Termites



ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม

RCIT
OK
๖๘๑
-M4
๙๘๖๑๕๑

ลงทะเบียน...
เลขทะเบียน... **116120**
วัน,เดือน,ปี... - 2 พ.ค. 2554

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน
ประจำปีงบประมาณ 2551
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b. 12314018

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัย (ไทย) ความหลากหลายทางพันธุกรรม การคัดเลือก และการจำแนกสายพันธุ์ของ
เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลง *Metarhizium* sp. จากพื้นที่การเกษตรใน
ประเทศไทยและการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อที่มีต่อการกำจัดปลวก

(อังกฤษ) Genetics Variation, Selection and Identification of Entomopathogenic Fungi,
Metarhizium sp. from Agricultural Fields in Thailand and its Efficiency for
the Control of Termites

แหล่งเงิน เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2551 จำนวนเงิน 200,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2550 - 30 กันยายน 2551

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการ ผศ. ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

สาขาวิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

E-mail: poeaim@hotmail.com

คำสำคัญ : *Metarhizium*, เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง, ITS1-5.8S-ITS2

บทคัดย่อ

จุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อคัดแยก และบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์ด้วยลักษณะทาง
สัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล รวมทั้งศึกษาความหลากหลาย และหาความสัมพันธ์ทาง
พันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ที่คัดแยกได้จากแมลง และดินจากแหล่งต่างๆ ในประเทศ
ไทยจำนวนทั้งหมด 32 ตัวอย่าง และหนึ่งตัวอย่างที่คัดแยกได้จากดินในประเทศฟิลิปปินส์ โดย
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจัดแบ่งรูปแบบลักษณะของโคโลนีได้ 5 กลุ่ม และเมื่อหา
อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด โคนิเดียสามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอัตราส่วน
ความยาวต่อความกว้างน้อย (≤ 2.18) ปานกลาง (2.33-2.87) และมาก (≥ 2.91) และการศึกษาความ
หลากหลายทางพันธุกรรมในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1
และ ITS 4 พบว่าทุกตัวอย่างมีขนาด PCR product ประมาณ 550 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์
ของตัวอย่างทั้งหมด 28 ตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม ClustalX กับลำดับนิวคลีโอ
ไทด์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในสปีชีส์อื่นจำนวน 19 ตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank และ
Beauveria bassiana จำนวน 2 ตัวอย่างที่ใช้เป็น outgroup เพื่อหา phylogenetic tree โดยวิธี
Neighbor-joining ในโปรแกรม Phylip ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M.*
anisopliae, *M. album*, *M. anisopliae* var. *acridum* และ *M. flavoviride* แตกต่างกันอย่างชัดเจน และ
สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่ม (กลุ่ม B, C, E และ F) แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถแสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ระหว่าง *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ได้อย่างชัดเจน ซึ่งตัวอย่างส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และแสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *M. anisopliae* อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ได้จากประเทศไทยส่วนใหญ่แตกต่างจากประเทศอื่น และจากเทคนิค PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Vsp* I สามารถแยกเชื้อราในกลุ่ม B และ C จากกลุ่ม E และ F ได้ และมีเพียง *M. anisopliae* บางไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมปลวกโดยตัวปลวกจะปกคลุมด้วย *M. anisopliae* ภายหลังการได้รับเชื้อประมาณ 1 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของโคนิเดีย 10^8 conidia/ml. โดยปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุม คือ ความชื้น

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate and identify species and varieties of *Metarhizium* mainly based on its morphological and molecular characteristics, genetic diversity and phylogenetic relationships within this fungus has been investigated. We investigated 32 *Metarhizium* isolates which were collected from different insect hosts and soil from different sites in Thailand and one isolate collected from the Philippines. These isolates have been partially characterized using colony features and they can be classified into five groups. The length/width ratio of the conidia was calculated and generated into three groups: low ratio group (≤ 2.18), medium ratio group (2.33-2.87) and high ratio group (≥ 2.91). ITS1-5.8S-ITS2 region sequence analysis was employed to identify genotypes. This region was amplified using the ITS 1 and ITS 4 primers to obtain a unique fragment of approximately 550 bp. Twenty-eight sequences were aligned using the ClustalX program and compared with 19 isolates of *Metarhizium* available in the GenBank database and 2 isolates of *Beauveria bassiana* as outgroup. Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-joining algorithm in the Phylip package. Our study showed that *M. anisopliae*, *M. album*, *M. anisopliae* var. *acridum* and *M. flavoviride* can be clearly differentiated and generated the 28 isolates into four main groups (clade B, C, E and F). However, there was no clear relationship between *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *majus* and most of them are related to *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Most isolates are highly divergent, nevertheless, most of *M. anisopliae* isolates from Thailand distantly related to *M. anisopliae* from other countries. Based on the *Vsp* I PCR-RFLP patterns, the isolates were divided into two distinct groups that were in clade B and C were successfully distinguished from clade E and F. Some of *M. anisopliae* were pathogenic to termites and showed sporulation in 1 week after inoculation with 10^8 conidia/ml. Major factor influencing efficacy of termites control is moisture.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของเงินงบประมาณประจำปี 2551 และสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือต่างๆ ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง ที่ให้ความรู้ และคำปรึกษาแนะนำในการศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ ตลอดจนหน่วยงานศูนย์ชีวินทรีย์แห่งชาติ และกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างบางส่วนในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบพระคุณทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

สุพัตรา โปธิ์เอี่ยม



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญรูป.....	VIII
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	6
2.1 วัสดุ อุปกรณ์.....	6
2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....	6
2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	6
2.1.3 วัสดุ และสารเคมี.....	7
2.2 วิธีการทดลอง.....	8
2.2.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	8
2.2.1.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	8
2.2.1.2 ตัวอย่างดิน.....	8
2.2.1.3 ตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่ขอความอนุเคราะห์.....	9
2.2.2 การศึกษาชนิดของอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	9
2.2.3 การคัดแยกเชื้อ และทำให้เชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> บริสุทธิ์.....	9
2.2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	10
2.2.4.1 ศึกษาลักษณะ และอัตราการเจริญของ โด โดนี.....	10
2.2.4.2 ศึกษาลักษณะรูปร่างของ conidia.....	10

2.2.5 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	10
2.2.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	10
2.2.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	11
2.2.5.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	11
2.2.5.4 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ.....	12
2.2.5.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP.....	12
2.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการกำจัดปลวก.....	14
บทที่ 3 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....	15
3.1 แหล่งที่มา และการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	15
3.2 ผลการศึกษาของชนิดอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	20
3.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	22
3.3.1 ลักษณะของโคโคนี และอัตรการเจริญ.....	22
3.3.2 ลักษณะรูปร่าง และขนาดของ conidia.....	30
3.4 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	36
3.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR.....	36
3.4.2 ผลการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ.....	39
3.4.3 ผลการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP.....	42
3.4.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	44
3.5 ประสิทธิภาพของเชื้อราในการกำจัดปลวก.....	47
บทที่ 4 สรุป และเสนอแนะ.....	51
บรรณานุกรม.....	53
ภาคผนวก.....	61

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	รายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในเปรียบเทียบ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....13
2.2	แสดงชื่อเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจดจำ และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา.....14
3.1	แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน และจำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่คัดแยกได้..17
3.2	รหัสเชื้อ แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่ใช้ในการศึกษา.....19
3.3	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>M. anisopliae</i> จำนวน และรหัสตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม....25
3.4	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ที่เจริญบนอาหาร ชนิด PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน.....29
3.5	ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตาม อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia.....32
3.6	ชนิด และขนาดของซันดิเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0).....40

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

3.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อ <i>Metarhizium</i> ; A: MA 018; B: MA 019 และ C: MA 029.....	15
3.2 แสดงพื้นที่การลุ่มเก็บตัวอย่างดินจาก 24 จังหวัดในประเทศไทย และรหัสของไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน 13 ไอโซเลต.....	16
3.3 การเจริญของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่จำลอง การเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเจือจางของสารละลายดิน ที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า; A-C: SDA ที่เติมกลอแรมเฟนิคอล; D-F: SDA ที่เติมกลอแรมเฟนิคอลที่เพิ่มยาปฏิชีวนะสเตربتโตไมซิน ซัลเฟต ร้อยละ 0.1; G-I: DG18; J-L: PDA และ M-O: PDA ที่เพิ่มยาปฏิชีวนะ กลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05.....	21
3.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ A: MA007; B: MA 012; C: MA014; D: MA 019 และ E: SWA 19.....	26
3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ A: MA 011; B: MA 015; C: MA 018 และ D: MA022.....	26
3.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ไอโซเลต คือ A: MA 001; B: MA 025; C: MA 026; D: MA 029; E: TISTR 3158; F: TISTR 3607; G: SCB 04; H: SEC 04; I: SEC 07; J: SED 07; K: SNB 02; L: SNEB 17; M: SNEB 18 และ N: SWC 03.....	27
3.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ในกลุ่มที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ A: MA 004; B: MA 017; C: MA 021 และ D: MA 024.....	28
3.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ในกลุ่มที่ 5 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ A: MA 002; B: MA 003; C: SNA 01; D: SNB 03; E: SNB 07 และ F: SNB 08.....	28
3.9 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง ของ conidia มีค่าต่ำ; A: MA 001; B: TISTR 3607 และ C: SEC 07.....	33

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

- 3.10 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าปานกลาง; A: MA 007; B: MA 014; C: MA 015; D: MA 017; E: MA 018; F: MA 019; G: MA 022; H: TISTR 3158; I: SCB 04; J: SEC 04; K: SED 07; L: SNB 02; M: SNB 03; N: SNEB 17 และ O: SWA 19.....34
- 3.11 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง; A: MA 002; B: MA 003; C: MA 004; D: MA 011; E: MA 012; F: MA 021; G: MA 024; H: MA 025; I: MA 026; J: MA 029; K: SNA 01; L: SNB 07; M: SNB 08; N: SNEB 18 และ O: SWC 03.....35
- 3.12 แสดงขนาดของ PCR product ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS 1/ITS 4, A: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และ Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ).....38
- 3.13 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nsp I* ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 A: Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03; โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส, Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ใช่เอนไซม์).....44

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

- 3.14 phylogenetic tree ของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 28 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ ไอโซเลตจากฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000; ■ แสดงกลุ่มจากการแบ่งตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia โดย □ มีค่าอัตราส่วนน้อย, ▣ มีค่าอัตราส่วนปานกลาง และ ■ มีค่าอัตราส่วนมาก; ● แสดงกลุ่มการแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย ● 1, ● 2, ● 3, ● 4 และ ● 5 และ + แสดง ไอโซเลตที่เอนไซม์ *Vsp I* ตัดได้.....49
- 3.15 แสดงลักษณะการเกิดการเข้าทำลายของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 019 ต่อปลวก หลังการได้รับเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโคนิเดีย 10^8 conidia/ml. A: เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และ B 2 สัปดาห์.....50

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมเนื่องจากมีภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก ซึ่งมีเพียงไม่กี่ประเทศทั่วโลกที่สามารถทำเกษตรกรรมได้ตลอดทั้งปี อย่างไรก็ตามความอุดมสมบูรณ์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็ส่งผลให้ประเทศไทยมีโรคพืชและแมลงศัตรูพืชอยู่เป็นจำนวนมากเช่นกัน ซึ่งอาจเริ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มการเพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เศรษฐกิจของประเทศเสียหายเป็นจำนวนมาก การควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชมีหลายวิธี แต่วิธีที่ง่ายและได้ผลเร็วก็คือการใช้สารเคมี ดังนั้นเพื่อที่จะรักษาผลผลิตทางการเกษตรไม่ให้เกิดผลเสียหายเกษตรกรจึงใช้สารเคมีในการควบคุมโรคพืชและแมลงศัตรูพืชเป็นหลัก เนื่องจากมีข้อดี คือออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพแน่นอนและเห็นผลชัดเจน สะดวกในการจัดซื้อ การใช้ และการเก็บรักษา อย่างไรก็ตามข้อเสียตามมาของการใช้สารเคมี คือต้องใช้เป็นประจำและต่อเนื่องทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และเมื่อใช้ไประยะหนึ่งจะเกิดการดื้อต่อสารเคมี ทำให้ต้องเพิ่มอัตราการใช้สารเคมีหรือเปลี่ยนชนิดของสารเคมีให้ใช้ในปริมาณที่มากขึ้นและต่อเนื่อง รวมทั้งใช้สารเคมีในหลายๆกลุ่ม ดังจะเห็นได้จากข้อมูลการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี ดังเช่นในปี 2529 มีการนำเข้าเป็นปริมาณ 17,837 ตัน มีมูลค่าการนำเข้า 1,779 ล้านบาท แต่สำหรับในปี 2543 มีการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้นถึง 3 เท่า คือปริมาณ 52,739 ตัน มีมูลค่าการนำเข้าถึง 7,294 ล้านบาท และเมื่อพิจารณาเฉพาะข้อมูลในปี พ.ศ. 2543 เป็นสารกำจัดแมลงถึง 60 ชนิด มีปริมาณ 12,533 ตัน และมีมูลค่าการนำเข้าถึง 2,001 ล้านบาท โดยมีทั้งปริมาณและมูลค่ารองจากการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช (<http://www.consumertkai.org/data/chemicals/.htm>) ซึ่งมีผลทำให้เสียเงินตราออกนอกประเทศแล้ว ยังทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของการเกิดสารปนเปื้อนและตกค้างของสารเคมีในผลิตภัณฑ์เกษตรและในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนทำให้สมดุลของจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตในดินตามธรรมชาติเสียไป ปริมาณจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ลดลง นอกจากนั้นยังมีผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรผู้ใช้และผู้บริโภคด้วย ดังเช่นการศึกษาการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในพืชผัก ในโครงการเฝ้าระวังความปลอดภัยของผักสดปลอดสารเคมี ระหว่าง พ.ศ. 2537-2542 รวมระยะเวลา 6 ปี ซึ่งทำการศึกษาในผักทั่วไปที่ไม่ถูกระบุว่าเป็นผักปลอดสารเคมี พบว่าผักทั่วไปมีสารเคมีตกค้างมากกว่าผักปลอดสารเคมีทั้งในระดับที่ไม่สูงเกินมาตรฐาน และสูงเกินมาตรฐาน จากการสำรวจสารเคมีตกค้างในผักทั่วไปทั้งหมด 156 ตัวอย่าง พบสารเคมีตกค้างร้อยละ 60.26 โดยมีตัวอย่างที่พบสารเคมีสูงเกินมาตรฐานกำหนดร้อยละ 13.46

ส่วนผักปลอดสารเคมีทั้งหมด 188 ตัวอย่าง พบสารเคมีตกค้างร้อยละ 37.77 โดยมีตัวอย่างที่พบ

เอกสารฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น-อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีสูงเกินมาตรฐานร้อยละ 5.85 (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2542) นอกจากนี้ ปัญหาการตกค้างของสารเคมีแล้ว ปัญหาอีกประการหนึ่งคือสินค้าทางการเกษตรที่ส่งออกมีการปนเปื้อนสารเคมีเกินระดับมาตรฐานอีกด้วย

ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าหาวิธีการกำจัดและควบคุมศัตรูพืช เพื่อลดปัญหาอันตรายจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่เพิ่มขึ้น โดยให้เกษตรกรหันมาใช้ในการควบคุมโดยชีววิธี (biocontrol) คือการนำเอาสิ่งมีชีวิตมาควบคุมสิ่งมีชีวิตด้วยกันเอง เพื่อควบคุมปริมาณของแมลงศัตรูพืชให้อยู่ในระดับที่ยอมรับได้ ไม่แสดงผลกระทบต่อพืชผลของเกษตรกรในเชิงเศรษฐกิจ ข้อดีของการใช้เชื้อจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมศัตรูพืช ก็มีความจำเพาะในการกำจัดแมลงศัตรูพืชเท่านั้น ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ แมลงที่มีประโยชน์ และสัตว์ รวมถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในดิน เช่น จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ อีกทั้งยังไม่มีสารพิษตกค้างในสภาพแวดล้อมทำให้ปลอดภัยทั้งต่อผู้ใช้และผู้บริโภคอีกด้วย โดยได้มีการศึกษาถึงกลไกการควบคุมโรค ประสิทธิภาพการควบคุม และระบบการควบคุมโรคโดยวิธีต่างๆ โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist) ที่เป็นเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา แต่งานส่วนใหญ่มักจะเน้นการศึกษาการควบคุมโรคพืชจากเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ทำลายส่วนต่างๆของพืช ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเชื้อรามาใช้ในการควบคุมเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคพืชในระดับการค้า ได้แก่เชื้อรา *Trichoderma* sp., *Gliocladium* sp. และ *Chaetomium* sp. แต่สำหรับเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) มีการศึกษาไม่มากนัก โดยมีรายงานการนำเชื้อรามากำจัดแมลงได้ เช่น การใช้เชื้อรา *Aschersonia aleyrodis*, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Hirsutella thompsonii*, *Beauveria* sp. และ *Metarhizium* sp. เป็นต้น

เชื้อราสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungi) เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproductive stage) หรือระยะ anamorph ที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive stage) หรือระยะ teleomorph คือเชื้อราในสกุล *Cordyceps* spp. จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota อันดับ Hypocreales (Bidochka และคณะ, 2005 และ Bugeme และคณะ, 2009) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบกระจายอยู่ทั้งในดิน แมลงหรือหนอนต่างๆ ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อราสกุลนี้เป็นกลุ่มของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (Bridge และคณะ, 1997; Milner และคณะ, 1998 และ Iskandarov และคณะ, 2006)

เชื้อราสกุล *Metarhizium* มีคุณสมบัติในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด และตลอดทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลง รวมทั้งกลไกในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชนั้นเป็นแบบมีความจำเพาะเจาะจง (species-specificity) และมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ (species) (Bridge และคณะ, 1997; Hughes และคณะ, 2004 และ Iskandarov และคณะ, 2006) *M. anisopliae* มีความสามารถเข้าอาศัยแมลงได้หลายอันดับ เช่น Coleoptera, Dermaptera, Orthoptera, Homoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera และ Hymenoptera เป็นต้น (Goettel และ

คณะ, 1990; Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005) โดยมีความสามารถในการเข้าทำลายอันดับ Coleoptera ได้เป็นส่วนใหญ่ แต่ในสปีชีส์และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* อื่นๆ นั้นมีความจำเพาะต่อแมลงที่เข้าอาศัยจำเพาะเจาะจงกว่า *M. anisopliae* โดยพบว่า *M. anisopliae* var. *majus* และ *M. flavoviride* var. *flavovirid* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Coleoptera ส่วน *M. flavoviride* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Orthoptera ในขณะที่ *M. flavoviride* var. *minus* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Homoptera และ *M. album* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Hemiptera (Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005) จากการรายงานการทดสอบความสามารถในการใช้เชื้อราดังกล่าวควบคุมแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในห้องทดลอง และในพื้นที่การเกษตร เช่น ในประเทศไทยนิยมใช้ *M. anisopliae* ควบคุมด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย (*Dorysthenes bugueti* Guerin) (<http://www.newswit.com/news/2005-05-31>) ด้วงแรดมะพร้าว (rhinoceros beetle) (มลิวัลย์ และคณะ, 2544) ซึ่งในต่างประเทศนิยมใช้ *M. flavoviride* (Lomer และคณะ, 1997 และ Shah และคณะ, 1998) และ *M. anisopliae* var. *acridum* (Peng และคณะ, 2008) ควบคุมการระบาดของตั๊กแตน (grasshopper และ locust) และนำมาทำลายปลวก (termite) (Milner และคณะ, 1998; Luz และคณะ, 1998; Dong และคณะ, 2007 และ Maketon และคณะ, 2007) รวมทั้งยุง (mosquitoes: *Anopheles gambiae* และ *A. arabiensis*) (Mnyone และคณะ, 2009) ซึ่งในปัจจุบันหลายประเทศได้มีการผลิตเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในรูปแบบการค้า เช่น Bio-Path และ Bio-Blast ในประเทศสหรัฐอเมริกา Biogreen, Green Guard และ Bio-Cane ในประเทศออสเตรเลีย หรือ Cobican ในประเทศเวเนซุเอลา (Zimmermann, 2007) และเมธาไรเซียมในประเทศไทย (<http://www.thai-greenagro.com>) เป็นต้น

เนื่องจากเชื้อราสกุล *Metarhizium* ประกอบด้วยหลายสปีชีส์ และหลายสายพันธุ์ (varieties) ดังรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดย Tulloch (1976) ยอมรับการจัดกลุ่มเพียง 2 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* และในกลุ่ม *M. anisopliae* ยังสามารถแบ่งได้อีก 2 สายพันธุ์ คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่มีขนาด conidia ตื้น และ *M. anisopliae* var. *major* ที่มีขนาด conidia ยาว ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อ var. *major* เป็น var. *majus* (Rombach และคณะ, 1986) หลังจากนั้นเริ่มมีการศึกษา และจัดกลุ่มทั้งในระดับสปีชีส์ และสายพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถแบ่งแยกกันได้อย่างชัดเจน (cryptic varieties) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งในเรื่องของขนาด และรูปร่างของ phialide, phialophore และ phialospore (หรือ conidia) ลักษณะหรือสีของโคโลนี เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่สามารถสังเกตเห็นได้ในแต่ละสปีชีส์หรือในสายพันธุ์เดียวกันนั้นของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่มีความคล้ายคลึงกัน และยังเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทำให้การระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ไม่ได้ชัดเจน และสับสน ซึ่งมีผลกระทบถึงการจัดจำแนก และบ่งชี้สปีชีส์หรือสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล

Metarhizium และเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ จึงมีการใช้และพัฒนาเทคนิคต่างๆ เอกสาร *Metarhizium* และเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ จึงมีการใช้และพัฒนาเทคนิคต่างๆ ไม่ว่การณใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รวมถึงเทคนิคทางโมเลกุล (molecular genetic) เพื่อช่วยในการจัดจำแนก และบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ได้แก่ เทคนิคการวิเคราะห์ isoenzyme (St. Leger และคณะ, 1992; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Bidochka และคณะ, 2001 และ Dong และคณะ, 2007) เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) รวมทั้งเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (Bridge และคณะ, 1993; Neuvéglise และคณะ, 1994; Pipe และคณะ, 1995; Mavridou และ Typas, 1998; Bidochka และคณะ, 2001; Small และคณะ, 2004 และ Enkerli และคณะ, 2009) เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Fegan และคณะ, 1993; Bidochka และคณะ, 1994, 2001; Leal และคณะ, 1994; Tigano-Milani และคณะ, 1995; Fungaro และคณะ, 1996; De Cavalho Freire และคณะ, 2001 และ Velásquez และคณะ, 2007) เทคนิค simple sequence repeat (SSR) หรือ microsatellites (Enkerli และคณะ, 2005 และ Velásquez และคณะ, 2007) เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Inglis และคณะ, 2008) รวมถึงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Curran และคณะ, 1994; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Driver และคณะ, 2000; Pantou และคณะ, 2003; Small และคณะ, 2004; Destéfano และคณะ, 2004 และ Bischoff และคณะ, 2009) โดยตำแหน่งที่ได้รับความนิยมใช้ในการศึกษา และจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา คือ ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 (Driver และคณะ, 2000; Liu และคณะ, 2002; Pantou และคณะ, 2003; Destéfano และคณะ, 2004; Inglis และคณะ, 2008 และ Velásquez และคณะ, 2007) ตำแหน่ง intergenic spacer (IGS) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ IGS1-5S rDNA-IGS2 (Pantou และคณะ, 2003 และ Hughes และคณะ, 2004) ที่ทั้งสองตำแหน่งอยู่ในบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งมีความหลากหลาย (variation) ทางพันธุกรรมสูง (Kennedy และ Clipson, 2003 และ Mitchell และ Zuccaro, 2006) จึงสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ และภายในสปีชีส์เดียวกันได้ โดยการจัดจำแนกอนุกรมวิธานที่มีความสำคัญ และเป็นที่ยอมรับนำมาใช้ในการเปรียบเทียบสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* คือ การศึกษาของ Driver และคณะ (2000) ได้จัดแบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมด 123 ไอโซเลตที่ได้มาจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก (มีตัวอย่างจากประเทศไทยเพียง 1 ไอโซเลต) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในบริเวณ ITS และ D3 ในตำแหน่ง 28S rDNA และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงเทคนิค RAPD สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ออกเป็น 10 กลุ่ม (Clade) คือ *M. album*, *M. flavoviride* Type E, *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *flavovirid*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 การรายงานการ จัดอนุกรมวิธานของ Bischoff และคณะที่จัดกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่มี

เอกสารอ้างอิง: เอกสารฉบับนี้ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบโดยผู้เชี่ยวชาญ ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน รวมถึงพิสูจน์ให้เห็นความสัมพันธ์ของ *M. taii*, *M. pingshaense* และ *M. guizhouense* รวมตัวอย่างทั้งหมด 57 ไอโซเลต โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง EF-1 α , RPB 1, RPB 2, Bt และตำแหน่ง IGS สามารถแบ่งกลุ่มใหม่ได้เป็น 9 สปีชีส์ คือ *M. acridum*, *M. majus*, *M. anisopliae*, *M. lepidiotae*, *M. pingshaense* และ *M. guizhouense* (สปีชีส์เดิม คือ *M. taii*) และรวม 2 สปีชีส์ใหม่เพิ่มขึ้นมา คือ *M. globosum* และ *M. robertsii* รวมทั้ง *M. brunneum* ที่นำชื่อเดิมกลับมาใช้ใหม่

จากรายงานการจัดอนุกรมวิธานที่กล่าวมาแล้วนั้น มีเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากประเทศไทยเพียง 1 ไอโซเลตในรายงานของ Driver และคณะ (2000) ซึ่งเห็นได้ว่ามีตัวอย่างจำนวนน้อยที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย แต่ในปัจจุบันประเทศไทยมีการรณรงค์ และใช้เชื้อราในสกุล *Metarhizium* โดยเฉพาะ *M. anisopliae* มากขึ้นในเกษตรกร จึงควรมีข้อมูลในการจัดจำแนกและบ่งชี้สายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษาค้นคว้าความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการนำไปใช้ และการติดตามเชื้อในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1.2.1 บ่งชี้และจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* ที่แยกได้จากแมลง และดินทั้งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล
- 1.2.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่พบในประเทศไทย
- 1.2.3 ค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจัดจำแนกและติดตามสายพันธุ์เชื้อราสกุล *Metarhizium*
- 1.2.4 รวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป
- 1.2.5 ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ต่อการกำจัดปลวก

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ อุปกรณ์

2.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

แยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากตัวอย่างแมลงที่ตาย และตัวอย่างดินในพื้นที่จังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย รวมทั้งขอความอนุเคราะห์เชื้อรา *Metarhizium* จากศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติ กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR)

2.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- 2.1.2.1 บีกเกอร์ (beaker)
- 2.1.2.2 กระบอกตวง (cylinder)
- 2.1.2.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)
- 2.1.2.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ
- 2.1.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 2.1.2.6 แท่งแกว่ง (spreader)
- 2.1.2.7 เข็มเย็บเย็บปลายแหลม (needle)
- 2.1.2.8 เข็มเย็บเย็บปลายแหลมงอ (hook)
- 2.1.2.9 ห่วงเย็บเย็บปลายกลม (loop)
- 2.1.2.10 คอกบอร์เรอร์ (cock borer)
- 2.1.2.11 ปากคีบ (forceps)
- 2.1.2.12 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5, 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 2.1.2.13 ลูกยาง (rubber bulb)
- 2.1.2.14 ช้อนตักสารเคมี (spatular)
- 2.1.2.15 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)
- 2.1.2.16 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)
- 2.1.2.17 บีเปตต์ (pipette)
- 2.1.2.18 ไมโครบีเปตต์ (micropipette)
- 2.1.2.19 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ
- 2.1.2.20 ตะเกียง (burner)
- 2.1.2.21 คิวเวท (cuvette)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 2.1.2.22 สไลด์แก้ว (glass slide)
- 2.1.2.23 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
- 2.1.2.24 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 2.1.2.25 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 2.1.2.26 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 2.1.2.27 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)
- 2.1.2.28 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 2.1.2.29 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 2.1.2.30 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
- 2.1.2.31 เครื่องชั่ง (balance)
- 2.1.2.32 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
- 2.1.2.33 เครื่องช่วยผสม (vortex)
- 2.1.2.34 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.1.2.35 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.1.2.36 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)
- 2.1.2.37 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 2.1.2.38 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)
- 2.1.2.39 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
- 2.1.2.40 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator)
- 2.1.2.41 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document)
- 2.1.3 วัสดุ และสารเคมี
 - 2.1.3.1 ยาปฏิชีวนะ สเตรปโตไมซิน ซัลเฟต (streptomycin sulphate) ไซโคลเฮกซอไมด์ (cycloheximide) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol)
 - 2.1.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), dichloran-glycerin-(DG18)-agar และ sabouraud dextrose agar (SDA) ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลสำเร็จรูป
 - 2.1.3.3 แอลกอฮอล์ (alcohol)
 - 2.1.3.4 พาราฟินเหลว (paraffin liquid)
 - 2.1.3.5 น้ำกลั่น (distilled water)
 - 2.1.3.6 สีย้อมแลคโตฟีโนลคอตตอลบลู (lactophenol cotton blue)
 - 2.1.3.7 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
 - 2.1.3.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด DNeasy plant mini kit ของบริษัท Qiagen

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.9 บัฟเฟอร์ (buffer) เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ tris borate EDTA (TBE) เป็นต้น

2.1.3.10 คีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

2.1.3.11 ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

2.1.3.12 ไพร์เมอร์ (primer) 2 ชนิด คือ ITS 1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGGC GG-3') และ ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ของบริษัท Invitrogen Corporation

2.1.3.13 เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) 15 ชนิด คือ *Acc I (Fbl I)*, *Alu I*, *BamH I*, *Bsn I (Hae III)*, *Dra I (Aha III)*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Eco 31 I (Bso 31 I)*, *Hind III*, *Hpa II*, *Hph I (Asu HP I)*, *Pvu II*, *Sfr 274 I (Xho I)*, *Taq I* และ *Vsp I* ของบริษัท Vivantis Technologies

2.1.3.14 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

2.1.3.15 เจลอะกาโรส (agarose gel)

2.1.3.16 เอธิเดียม บรอมไนด์ (ethidium bromind)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium*

2.2.1.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราสกุล *Metarhizium*

เก็บตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จากพื้นที่เกษตรกรรมที่ปลอดสารเคมีหรือยาฆ่าแมลง และพื้นที่ป่าอุดมสมบูรณ์ภายในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2550-2552 โดยเก็บแมลงที่ตายที่มีลักษณะแข็งเหมือนมัมมี่ หรือที่มีลักษณะเป็น โรคมัสคาร์-ดินสีเขียว คือแมลงมีเส้นใยสีขาวแทงทะลุออกนอกลำตัว และมี conidia สีเขียวอยู่บนตัวแมลง เก็บตัวอย่างแมลงใส่กล่องพลาสติกหรือภาชนะมีฝาปิด นำมาทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) พร้อมทั้งเก็บรักษาตัวอย่างแมลงในภาชนะมีฝาปิดที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

2.2.1.2 ตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่เกษตรกรรมปลอดสารเคมีหรือยาฆ่าแมลง และพื้นที่ป่าที่อุดมสมบูรณ์ในประเทศไทยระหว่างปี พ.ศ. 2550-2552 โดยตักผิวหน้าดินลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตรทิ้งก่อนเก็บตัวอย่าง หลังจากนั้นจึงขุดเก็บตัวอย่างดินแบบสุ่มประมาณ 50 กรัมในหลุมความลึกไม่เกิน 20 เซนติเมตรจากผิวหน้าดิน ใส่ในถุงพลาสติก นำมาทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์ พร้อมทั้งเก็บรักษาดินที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.1.3 ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่ขอความอนุเคราะห์

ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติ จากกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร และจากสถาบันวิจัย

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เมื่อได้รับแล้วนำมาทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อราบริสุทรีอีกครั้ง

2.2.2 การศึกษาชนิดของอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ทำการจำลองเลียนแบบธรรมชาติ โดยนำ conidia ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ระดับความเข้มข้น 10^6 conidia/มิลลิลิตรใส่ลงในดินที่เก็บจากธรรมชาติ 100 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นชั่งตัวอย่างดินดังกล่าวปริมาณ 10 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำ 40 มิลลิลิตรที่ผสม tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าขวดรูปชมพู่ผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 30 นาที เจือจางสารละลายตัวอย่างดินให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^1 , 10^2 และ 10^3 เท่าตามลำดับ และดูการละลายที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตรเพื่อนำไปเกลี่ยเชื้อ (spread plate) บนอาหาร 5 ชนิด ได้แก่ อาหาร dichloran-glycerin-(DG18)-agar, อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล, อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1, อาหาร PDA และอาหาร PDA ที่เพิ่มยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05 โดยทำการทดลองความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างดินอย่างละ 2 ซ้ำ บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตการเจริญของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทุกวันภายในระยะเวลา 7 วัน และเลือกชนิดอาหารที่สามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่ดีที่สุดเพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป

2.2.3 การคัดแยกเชื้อ และทำให้เชื้อราสกุล *Metarhizium* บริสุทรี

ในกรณีที่เป็นตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราสกุล *Metarhizium* ให้นำตัวอย่าง มาคัดแยกโดยใช้ปลายเข็มเขี่ย conidia และนำมาขีดด้วยเทคนิค cross streak ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05 และในกรณีการแยกเชื้อจากตัวอย่างดิน ทำการชั่งตัวอย่างดินมาปริมาณ 10 กรัมใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีน้ำ 40 มิลลิลิตรผสม tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เขย่าขวดรูปชมพู่ผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 30 นาที เจือจางตัวอย่างดินให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 10^1 , 10^2 และ 10^3 เท่าตามลำดับ และดูการละลายที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมา 1 มิลลิลิตรเพื่อนำไปเกลี่ยเชื้อบนอาหารอาหาร PDA โดยทำการทดลองความเข้มข้นอย่างละ 2 ซ้ำ ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05 เช่นเดียวกับตัวอย่างจากแมลง

นำจานเพาะเลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของโคโลนีทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ถ้าพบว่าลักษณะโคโลนีมีเส้นใยสีขาว ขาวปนเหลือง หรือเหลือง และ conidia หรือสปอร์อยู่ในเจดสีเขียวให้เขี่ยย้ายเฉพาะเชื้อราสกุล *Metarhizium* ลงบนอาหาร PDA จนกว่าจะได้เชื้อราบริสุทรี เมื่อได้เชื้อราบริสุทรีแล้วทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเขี่ยเส้นใย และ conidia ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อม conidia ด้วยสีย้อมแลคโคฟีนอล-คอตตอลบลู ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และทำการเก็บเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่บริสุทรีในหลอดทดลองอย่างน้อยตัวอย่าง

เอกสาร 4 เอกสาร หลอด โดยเก็บรักษาไว้ 3 การศึกษา หลอด โดยแบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 องศาเซลเซียส 1 หลอด และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 หลอดที่มี 1 หลอดใช้พาราฟินเหลวทาบผิวหน้าเชื้อราบนอาหาร และที่เหลือ 1 หลอดนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล ต่อไป

2.2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

2.2.4.1 ศึกษาลักษณะ และอัตราการเจริญของโคโลนี

เพาะเลี้ยงเชื้อราสกุล *Metarhizium* แต่ละตัวอย่างที่ตัดแยก ตัวอย่างละ 6 งานเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นทำการเจาะด้วย cock borer เมอร์ 1 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร) และนำชิ้นวุ้นที่มีเชื้อราสกุล *Metarhizium* วางเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 28 วัน เก็บบันทึกผลการทดลองทุก 4 วัน โดยบันทึกเกี่ยวกับลักษณะต่างๆ ที่สังเกตเห็นได้ เช่น สีของโคโลนีทั้งด้านบนผิวหน้าอาหาร และด้านหลังของงานเพาะเลี้ยง และการกระจายตัวของ conidia เป็นต้น บันทึกอัตราการเจริญของโคโลนีที่วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแบ่งเป็นแกน X และแกน Y ในหน่วยมิลลิเมตรโดยใช้คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ นำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางที่ได้ในแต่ละครั้งมาหาค่าเฉลี่ย

2.2.4.2 ศึกษาลักษณะรูปร่างของ conidia

เตรียมสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยเส้นใยที่สร้าง conidia วางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสีย้อมแลคโตฟีนอล-คอตตอลบลู และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปศึกษาลักษณะรูปร่าง และวัดขนาดความกว้าง และความยาวของ conidia ในแต่ละตัวอย่างจำนวน 40 ซ้ำด้วยโปรแกรมถ่ายภาพ ACT 2U บันทึกผล และถ่ายภาพ นำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละด้านพร้อมด้วยหาค่าอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของ conidia

2.2.5 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

2.2.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

เพาะเลี้ยง conidia เดี่ยว (single spores isolation) แต่ละตัวอย่างในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร PDB เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลาประมาณ 5-7 วัน จนเกิดลักษณะเป็นเพลเลต (pellet) แยกเพลเลตโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000-9,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 20 นาที และล้างเพลเลตด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ EDTA ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลจำนวน 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 1-2 รอบ นำเพลเลตมาบดด้วยไนโตรเจนเหลว พร้อมทั้งตัดผงที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy plant mini kit โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้

เอกสเทคนิคอะกาโรสเจลอิลีคโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลาย ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ขนาด 10,000 คู่เบส หรือ λ Hind III หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมา ช้อมด้วยเอซีเดียมโบรไมด์ และดูแผ่นเจลภายใต้แสงยูวีจากเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ สำหรับการ วิเคราะห์ทางด้านปริมาณทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความ ยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ ดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

2.2.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทุกตัวอย่างถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ บริเวณ ITS ในตำแหน่ง rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 (White และคณะ, 1990) ปริมาตร สารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล คือออกซินิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอร์สความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และนำ ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ขั้น denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้น อะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ เครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2.5.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Tech Dragon Limited เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน นำผลข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม วิเคราะห์หา phylogenetic tree ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ภายในสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ และความสัมพันธ์กับ outgroup คือ เชื้อราสกุล *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 2.1) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความ ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งในการศึกษานี้ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining เมื่อได้ phylogenetic tree จึงกำหนดรูปแบบแผนภูมิด้วยโปรแกรม Tree view version 1.6.6

2.2.5.4 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านแก้ไขตรวจสอบมาจำลองหาการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/>) เพื่อศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ หลังจากนั้นนำผลมาวิเคราะห์ และคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ระหว่างสายพันธุ์ได้เพื่อนำไปทดลองขั้นต่อไป

2.2.5.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP

นำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาทำศึกษาความหลากหลายของการกลาย โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกมาจากวิธีชีวสารสนเทศทั้งหมด 15 ชนิด คือ *Acc I* (*Fbl I*), *Alu I*, *BamH I*, *Bsn I* (*Hae III*), *Dra I* (*Aha III*), *EcoR I*, *EcoR V*, *Eco 31 I* (*Bso 31 I*), *Hind III*, *Hpa II*, *Hph I* (*Asu HP I*), *Pvu II*, *Sfr 274 I* (*Xho I*), *Taq I* และ *Vsp I* โดยมีตำแหน่งจดจำอุณหภูมิที่ใช้ในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ และหยุดการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังตารางที่ 2.2 โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP ทั้งหมดปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR product 2 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ บัฟเฟอร์ตามคู่มือการใช้งานของเอนไซม์แต่ละชนิด และวิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิคอะกาโรส-เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรสเจลร้อยละ 2 ในบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 50 คู่เบส

ตารางที่ 2.1 รายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Locus	สปีชีส์	อ้างอิง
AB027382	<i>B. bassiana</i>	Nikoh และ Fukatsu, 2000
DQ287238	<i>B. bassiana</i>	Vega และคณะ, 2008
AB027383	<i>M. anisopliae</i>	Nikoh และ Fukatsu, 2000
AY646373	<i>M. anisopliae</i>	Kwong และคณะ, 2005 (Unpublished)
AB099510	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Yokoyama และคณะ, 2006
AF516302	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Pantou และคณะ, 2003
AY635456	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Small และ Bidochka, 2004
AY646397	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Kwong และคณะ, 2005 (Unpublished)
DQ177431	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Huang และคณะ, 2006 (Unpublished)
DQ679899	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Flor และคณะ, 2006 (Unpublished)
EU307887	<i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i>	Inglis และคณะ, 2008
AF137063	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Driver และคณะ, 2000
EU307907	<i>M. anisopliae</i> var. <i>acridum</i>	Inglis และคณะ, 2008
AY387580	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Bidochka และ Small, 2007 (Unpublished)
AY781690	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Fagundes และคณะ, 2007 (Unpublished)
EF051725	<i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	Lubeck และคณะ, 2008
EF051714	<i>M. majus</i>	Lubeck และคณะ, 2008
AF137067	<i>M. album</i>	Driver และคณะ, 2000
AY375446	<i>M. album</i>	Destéfano และคณะ, 2004
AF138267	<i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i>	Driver และคณะ, 2000
AF138271	<i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i>	Driver และคณะ, 2000

ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ตารางที่ 2.2 แสดงชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจดจำ และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งจดจำ	อุณหภูมิบ่มปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิหยุดปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)
<i>Acc</i> I (<i>Fbl</i> I)	GT/MKAC*	55	-
<i>Alu</i> I	AG/CT	37	65
<i>Bam</i> H I	G/GATCC	37	65
<i>Bsn</i> I (<i>Hae</i> III)	GG/CC	37	65
<i>Dra</i> I (<i>Aha</i> III)	TTT/AAA	37	65
<i>Eco</i> R I	G/AATTC	37	65
<i>Eco</i> R V	GAT/ATC	37	-
<i>Eco</i> 31 I (<i>Bso</i> 31 I)	GGTCTC	55	-
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	37	65
<i>Hpa</i> II	C/CGG	37	-
<i>Hph</i> I (<i>Asu</i> HP I)	GGTGA	37	65
<i>Pvu</i> II	CAG/CTG	37	-
<i>Sfr</i> 274 I (<i>Xho</i> I)	C/TCGAG	50	65
<i>Taq</i> I	T/CGA	65	-
<i>Vsp</i> I	AT/TAAT	37	65

*M: A/C; K: G/T (บริษัท Vivantis); - หมายถึง ไม่ระบุอุณหภูมิ

2.2.6 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการกำจัดปลวก

เพาะเลี้ยงปลวกที่ได้จากแปลงเกษตร จังหวัดสมุทรสงคราม ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท เจาะรูขนาดเล็กเพื่อให้อากาศสามารถผ่านเข้าออกได้ และมีขนาดของพื้นภาชนะประมาณเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง พร้อมกับเตรียมสารแขวนลอยของตัวอย่างเชื้อจากสปอร์ในน้ำที่มี 1% Tween 20 ให้ได้ความเข้มข้น 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 conidia/ml. นำตัวอย่างเชื้อมาหยดลงบนกระดาษปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยกระจายให้ทั่วกระดาษ และปล่อยกระดาษให้หมาดๆ นับปลวกโดยใช้ฟุ้งกันสะอาดใส่ลงในกล่องภาชนะจำนวน 20 ตัวต่อภาชนะ 1 ใบ โดยในแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีชุดควบคุม 1 ชุด นำไปเลี้ยงในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ระวังไม่ให้ปลวกหนีออกไปจากที่เลี้ยง สังเกตลักษณะบนตัวปลวกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และอัตราการตายของปลวกเป็นระยะเวลาประมาณ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

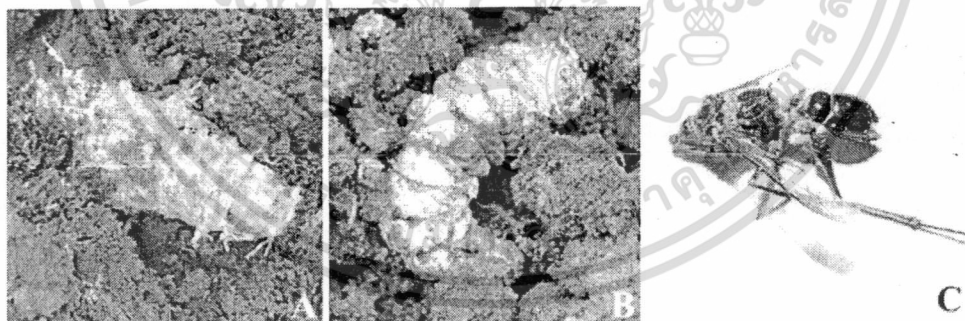
บทที่ 3

ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 แหล่งที่มา และการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด 33 ไอโซเลตโดยแยกได้จากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต และได้จากดินจำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งเป็นคัดแยกใหม่จำนวน 16 ไอโซเลต และขอความอนุเคราะห์จำนวน 17 ไอโซเลตโดยมีรายละเอียด คือ

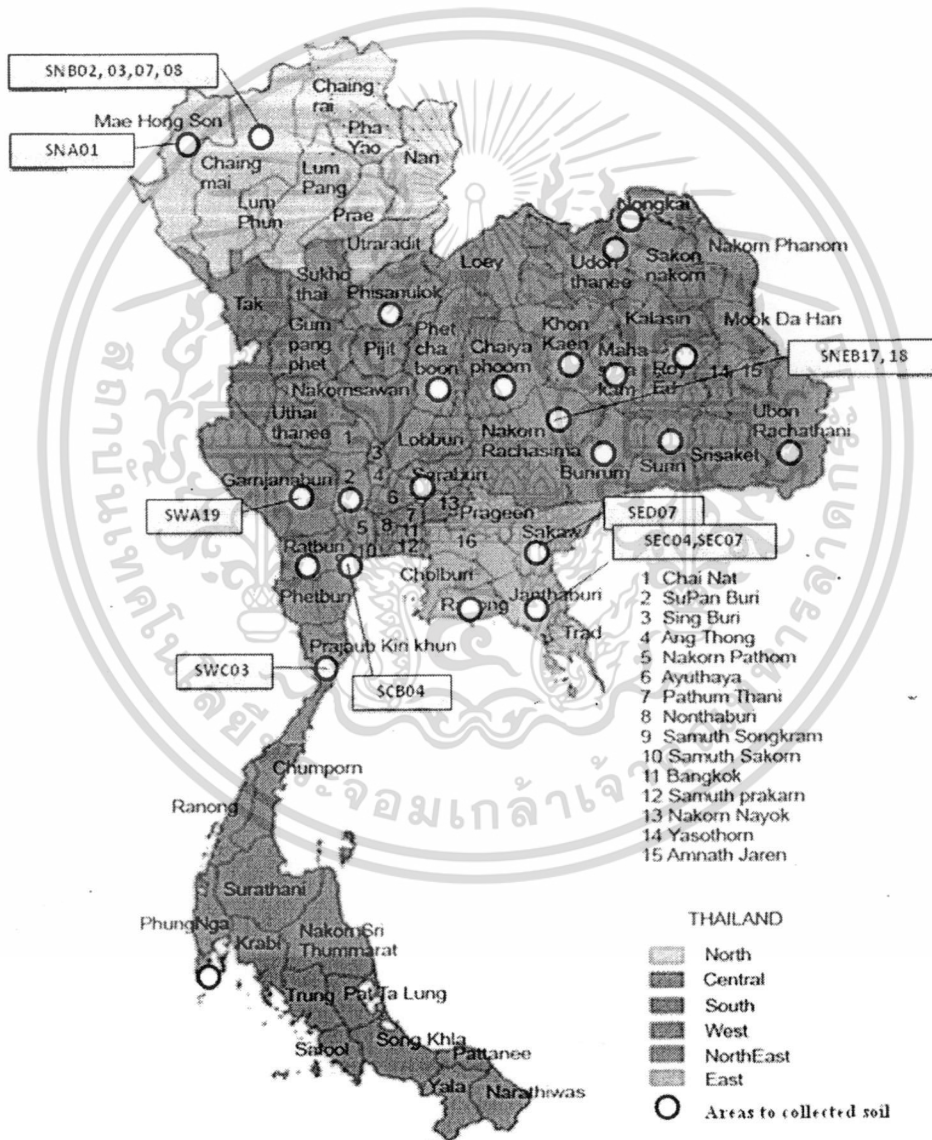
สำหรับการคัดแยกใหม่แบ่งเป็นคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จำนวน 3 ไอโซเลตจากตัวอย่างแมลงตายได้แก่ MA 018 และ MA 019 ที่คัดแยกได้จากแมลงในระยะดักแด้ และหนอนด้วงในอันดับ Coleoptera ตามลำดับ ที่เก็บจากแปลงไร่อ้อยจังหวัดกาญจนบุรี (รูปที่ 3.1 A-B) และไอโซเลต MA029 จากแมลงอันดับ Diptera ในพื้นที่ป่า จังหวัดนครราชสีมา (รูปที่ 3.1 C) และจากการสุ่มคัดแยกเชื้อราในดินจากพื้นที่เกษตรกรรมปลอดสารเคมีหรือยาฆ่าแมลง และพื้นที่ป่าจาก 24 จังหวัดในประเทศไทยทั้งหมด 150 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.2) พบเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมดจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03



รูปที่ 3.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อ *Metarhizium*; A: MA 018; B: MA 019 และ C: MA 029

นอกจากนั้นแล้วยังได้ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่นำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรกรรม และที่ศึกษาทดลองในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการจากหน่วยงานรัฐบาล และที่เก็บรักษาเชื้อจาก 3 หน่วยงาน คือ ตัวอย่างที่ความอนุเคราะห์จากศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งทุกไอโซเลตคัดแยกเชื้อราได้จากแมลง โดยแบ่งออกเป็นอันดับ Isoptera เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวน 1 ไอโซเลต (MA 011) อันดับ Coleoptera จำนวน 3 ไอโซเลต (MA 012, MA 014 และ MA015) และอันดับ Dermaptera จำนวน 1 ไอโซเลต (MA 017) และตัวอย่างที่ความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ทั้งหมดจำนวน 10 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, MA 002, MA 003, MA 004, MA 007, MA 021, MA 022, MA 024, MA 025 และ MA 026 ซึ่งทุกไอโซเลตคัดแยกได้จากแมลงอันดับ Coleoptera รวมทั้งไอโซเลตที่ความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) จำนวน 2 ไอโซเลต คือ TISTR 3158 และ TISTR 3607 ที่แยกได้จากดินในประเทศฟิลิปปินส์ และไทยตามลำดับ



รูปที่ 3.2 แสดงพื้นที่การสุ่มเก็บตัวอย่างดินจาก 24 จังหวัดในประเทศไทย และรหัสของไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน 13 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่คัดแยกได้

ลำดับที่	รหัส	จังหวัด	จำนวนตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>
1	SNA	แม่ฮ่องสอน	6	1
2	SNB	เชียงใหม่	13	4
3	SCA	สระบุรี	11	ไม่พบ
4	SCB	สมุทรสงคราม	5	1
5	SCC	เพชรบูรณ์	1	ไม่พบ
6	SCD	พิษณุโลก	3	ไม่พบ
7	SCF	สุพรรณบุรี	3	ไม่พบ
8	SNEA	หนองคาย	7	ไม่พบ
9	SNEB	นครราชสีมา	23	2
10	SNEC	ขอนแก่น	5	ไม่พบ
11	SNED	สุรินทร์	1	ไม่พบ
12	SNEE	มหาสารคาม	1	ไม่พบ
13	SNEF	ร้อยเอ็ด	2	ไม่พบ
14	SNEG	บุรีรัมย์	1	ไม่พบ
15	SNEH	ชัยภูมิ	4	ไม่พบ
16	SNEI	อุบลราชธานี	2	ไม่พบ
17	SNEJ	อุดรธานี	1	ไม่พบ
18	SEC	จันทบุรี	20	2
19	SED	สระแก้ว	8	1
20	SEE	ระยอง	3	ไม่พบ
21	SWA	กาญจนบุรี	19	1
22	SWB	ราชบุรี	3	ไม่พบ
23	SWC	ประจวบคีรีขันธ์	6	1
24	SSA	ภูเก็ต	2	ไม่พบ
สรุปทั้งหมด 24 จังหวัด			150 ตัวอย่าง	13 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแต่ง **116120** ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวนทั้งหมด 33 ไอโซเลตแบ่งได้เป็นส่วนที่คัดแยกจากดิน จำนวน 15 ไอโซเลต และจากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต ดังสรุปรหัส แหล่งที่มา และจังหวัดในตารางที่ 3.2 โดยการแยกเชื้อจากดินจำนวน 150 ตัวอย่างจาก 24 จังหวัดในประเทศไทยคิดเป็นร้อยละของการคัดแยกได้ 8.67 ของจำนวนตัวอย่างดินทั้งหมด ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* ร้อยละ 100 โดยส่วนใหญ่พบเชื้อรา *M. anisopliae* ในความลึกไม่เกิน 20 เซนติเมตรจากผิวน้ำดิน (Zimmermann, 2007) ซึ่งชั้นดินนี้อยู่ในชั้น A (A-horizone) ที่เป็นชั้นที่อินทรีย์วัตถุที่สลายตัวแล้ว และมีกิจกรรมของจุลินทรีย์มากที่สุด โดยพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถกระจายอยู่ในดินต่างๆ ทั่วโลก (Iskandarov และคณะ, 2006) และคัดแยกได้จากที่อยู่อาศัย (habitat) หรือแหล่งที่อยู่ (geographical origin) ที่มีความแตกต่างกัน (St. Leger และคณะ, 1992; Zimmermann, 2007) การแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากดินนี้สอดคล้องกับการรายงานการพบเชื้อรา *M. anisopliae* ได้จำนวนแตกต่างกันจากดินในแหล่งที่อยู่ที่มีความแตกต่างในแต่ละประเทศ เช่น Hughes และคณะ (2004) ใช้เทคนิค plating และเทคนิค baiting โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรังมดกัดใบไม้ (leaf cutting ant) ในป่าแอมบาที่พื้นที่ป่ามีความแตกต่าง คือ ป่าปลูก (secondary forest) ที่มีดินชั้น (ไกล์บ่อน้ำ) ป่าปลูกที่มีดินแห้ง และป่าปลูกที่ปลูกขึ้นใหม่ที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้าและสนามหญ้า ในประเทศปานามา ผลการทดลองพบเฉพาะ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ทั้งหมดจำนวน 58 ไอโซเลตโดยไม่มีการพบสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Metarhizium* โดยมีความหนาแน่นของเชื้อ *Metarhizium* อยู่ในช่วง 1×10^3 ถึง 5×10^4 CFU ต่อกรัมของดินโดยเทคนิค plating และในตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่างนั้นพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดในแมลงสปีชีส์อื่น คือ เชื้อรา *B. bassiana* โดยมีความหนาแน่นประมาณ 7.5×10^3 CFU ต่อกรัมของดิน สำหรับการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* ที่ใช้เทคนิค baiting นั้นชี้ให้เห็นว่าแมลงปีกแข็งชนิด *Tenebrio molitor* ในอันดับ Coleoptera มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ดีกว่าหนอนผีเสื้อไหม้ (Galleria mellonella) ในอันดับ Lepidoptera และในการทดลองของ Sun และ Liu (2008) ที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 425 ตัวอย่างจากพื้นที่ป่าบริเวณต่างๆ 10 มณฑลในประเทศจีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 ถึง 2005 พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงทั้งหมดจำนวน 236 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 55.5 ซึ่งพบเชื้อ *Paecilomyces farinosus* มากที่สุด รองลงมาคือ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* คิดเป็นร้อยละ 19.6, 14.1 และ 10.6 ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2008 Inglis และคณะ เก็บตัวอย่างดินจำนวน 100 ตัวอย่างจากทั้งหมด 83 แหล่งที่มีลักษณะของพื้นที่แตกต่างในบริติชโคลัมเบียตะวันตกเฉียงใต้ โดยเทคนิค baiting พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* สามารถกระจายได้อย่างกว้างขวาง โดยพบเชื้อราจาก 46 แหล่งจากพื้นที่ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 55.4 และสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 63 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่สามารถใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 รหัสเชื้อ แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่ใช้ในการศึกษา

ไอโซเลต	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา	ไอโซเลต	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา
MA 001	Coleoptera	นครราชสีมา	MA 029	Diptera	นครราชสีมา
MA 002	Coleoptera	กรุงเทพฯ	TISTR 3158	ดิน	ฟิลิปปินส์
MA 003	Coleoptera	สมุทรปราการ	TISTR 3607	ดิน	ไทย
MA 004	Coleoptera	ปทุมธานี	SCB 04	ดิน	สมุทรสงคราม
MA 007	Coleoptera	นครสวรรค์	SEC 04	ดิน	จันทบุรี
MA 011	Isoptera	สุพรรณบุรี	SEC 07	ดิน	จันทบุรี
MA 012	Coleoptera	ขอนแก่น	SED 07	ดิน	สระแก้ว
MA 014	Coleoptera	กาญจนบุรี	SNA 01	ดิน	แม่ฮ่องสอน
MA 015	Coleoptera	/	SNB 02	ดิน	เชียงใหม่
MA 017	Dermaptera	นครราชสีมา	SNB 03	ดิน	เชียงใหม่
MA 018	Coleoptera	กาญจนบุรี	SNB 07	ดิน	เชียงใหม่
MA 019	Coleoptera	กาญจนบุรี	SNB 08	ดิน	เชียงใหม่
MA 021	Coleoptera	/	SNEB 17	ดิน	นครราชสีมา
MA 022	Coleoptera	นครปฐม	SNEB 18	ดิน	นครราชสีมา
MA 024	Coleoptera	ราชบุรี	SWA 19	ดิน	กาญจนบุรี
MA 025	Coleoptera	ประจวบคีรีขันธ์	SWC 03	ดิน	ประจวบคีรีขันธ์
MA 026	Coleoptera	ประจวบคีรีขันธ์	/ ไม่ทราบแหล่งที่มา		

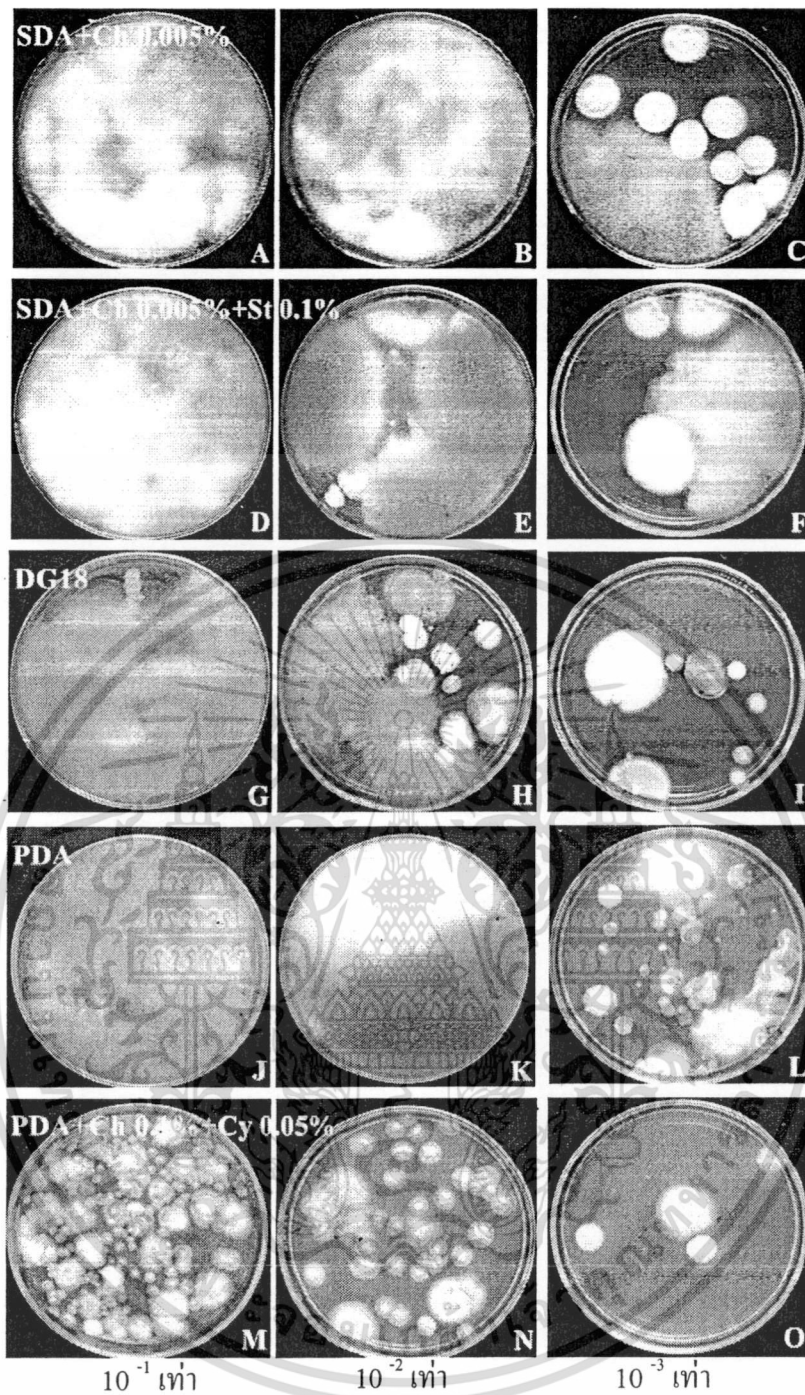
ตัวอย่างจากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถคัดแยกได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera ได้มากที่สุด คือจำนวน 15 ไอโซเลต นอกจากนั้น คือ แมลงในอันดับ Isoptera, Dermaptera และ Diptera อย่างละ 1 ไอโซเลต ดังรายงานที่กล่าวไว้เช่นเดียวกันว่า *M. anisopliae* นั้นมีความสามารถเข้าอาศัยแมลงได้อย่างกว้างขวางในแมลงหลายอันดับ หลายชนิด (Goettel และคณะ, 1990; Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005) เช่น Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Homoptera, Orthoptera, Hemiptera, Dermaptera, Lepidoptera, Symphyla และ Siphonaptera เป็นต้น โดยในรายงานของ Zimmermann (2007) ที่รายงานการศึกษาของ Veen (1968) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* เข้าทำลายแมลงได้มากถึง 7 อันดับ หรือ 204 สปีชีส์ โดยมีความสามารถในการเข้าทำลายมาก 3 ลำดับแรก คือ Coleoptera, Lepidoptera

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Hemiptera ตามลำดับ โดยพบว่าเข้าทำลายอันดับ Coleoptera มากถึง 134 สปีชีส์ แต่ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* ชนิดอื่นๆ นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงที่เข้าอาศัยสูงกว่า *M. anisopliae* โดยพบว่า *M. anisopliae* var. *majus* และ *M. flavoviride* var. *flavovirid* มีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Coleoptera เป็นส่วนใหญ่ *M. flavoviride* มีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Orthoptera ในขณะที่ *M. flavoviride* var. *minus* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Homoptera และ *M. album* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Hemiptera (Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005)

3.2 ผลการศึกษาของชนิดอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ผลจากการสังเกตงานเพาะเลี้ยงภายใน 7 วันของการจำลองคัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่ความเจือจางสารละลายตัวอย่างดินต่างๆ (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า) พบว่าอาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล (รูปที่ 3.3 A-C) และ SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1 (รูปที่ 3.3 D-F) พบว่ามีการเจริญของเชื้อราหลากหลายชนิด และเชื้อราเหล่านั้นสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาก แต่ยังพบ โคลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่นเดียวกันกับอาหาร DG18 (รูปที่ 3.3 G-I) และอาหาร PDA (รูปที่ 3.3 J-L) ที่มีการเจริญเชื้อราหลากหลายชนิด และเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งเจริญได้ช้ากว่า โดยที่อาหาร PDA เป็นอาหารชนิดเดียวที่พบการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ (แบคทีเรีย และยีสต์) ดังนั้นอาหารทั้ง 4 ชนิด คือ อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล, อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1, อาหาร DG18 และอาหาร PDA ไม่เหมาะสมต่อการคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ยกเว้นอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05 (รูปที่ 3.3 M-O) ซึ่งพบว่ามี การเจริญของเชื้อราชนิดอื่นๆ น้อยชนิด และเจริญเติบโตได้ช้า ซึ่งเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญได้ จึงเหมาะต่อการนำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ต่อไป



รูปที่ 3.3 การเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae* ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่จำลองการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเจือจางของสารละลายดินที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า; A-C: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล; D-F: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลที่เพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1; G-I: DG18; J-L: PDA และ M-O: PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

3.3.1 ลักษณะของโคโลนี และอัตราการเจริญ

จากการเลี้ยงเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 33 ไอโซเลตบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ระยะแรกลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว และเมื่อมีการสร้าง conidia เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเขียว ทำให้เห็นลักษณะโคโลนีเป็นสีเขียว ซึ่งเกิดโดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อสีเขียวขี้ม้า โดยพบว่ารูปแบบของโคโลนีหรือรูปแบบของการเจริญของเส้นใยสามารถจัดเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม มีรายละเอียดดังนี้

กลุ่มที่ 1 ลักษณะของโคโลนีแบนราบ และเจริญเป็นวงซ้อนกัน (zonation) มีเพียงบางไอโซเลตที่บางซำมีเส้นใยฟูเล็กน้อยแทรกอยู่ conidia มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียวขี้ม้า โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังจานเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นสีจากเส้นใยที่เจริญแทรกในอาหารมีสีขาว ยกเว้นไอโซเลต MA 007 ที่อาหารด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆ เฉพาะบริเวณส่วนกลางรอบชั้นขี้ม้าที่เจาะ cock borer แต่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปใกล้เคียงกับไอโซเลตอื่นๆ มากกว่า ซึ่งเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA007 (รูปที่ 3.4 A), MA 012 (รูปที่ 3.4 B), MA 014 (รูปที่ 3.4 C), MA 019 (รูปที่ 3.4 D) และ SWA 19 (รูปที่ 3.4 E)

กลุ่มที่ 2 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ต่างกันเพียงสีของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ในอาหารซึ่งเมื่อมองด้านหลังจานเพาะเลี้ยงจะมีสีขาว และสีเหลือง โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 011 (รูปที่ 3.5 A), MA 015 (รูปที่ 3.5 B), MA 018 (รูปที่ 3.5 C) และ MA 022 (รูปที่ 3.5 D)

กลุ่มที่ 3 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างคล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 1 และ 2 คือ โคโลนีมีลักษณะแบนราบ ต่างกันเพียงสีของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ในอาหารซึ่งส่วนใหญ่มีสีขาว สีเหลือง และสีส้ม ยกเว้นไอโซเลต TISTR 3158 และไอโซเลต SED 07 ที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำแทรก โดย TISTR 3158 เริ่มมีสีดำแทรกจากบริเวณตรงกลางจานเพาะเลี้ยง ต่างจากไอโซเลต SED 07 ที่มีลักษณะสีดำแทรกกระจายเป็นวงกว้าง แต่ต่างจากกลุ่ม 1 และ 2 คือกลุ่มนี้มีการสร้าง conidia ลักษณะค่อนข้างเกาะอัดแน่น แต่ไม่เป็นแผ่นเดียวกันจึงสามารถสังเกตเห็นได้เป็นวงซ้อนกันได้บ้าง โดย conidia ส่วนใหญ่ของกลุ่มนี้มีสีเขียวขี้ม้า แต่มีเพียงบางไอโซเลตเท่านั้นที่มีสีแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือ มีสีเขียวขี้ม้าเข้มมาก ได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3607, SCB 04, SED 07, SNB 02 และ ไอโซเลต SNEB 18 ซึ่งเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวนมากที่สุด คือ 14 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001 (รูปที่ 3.6 A), MA 025 (รูปที่ 3.6 B), MA 026 (รูปที่ 3.6 C) และ MA029 (รูปที่ 3.6 D) TISTR 3158 (รูปที่ 3.6 E), TISTR 3607 (รูปที่ 3.6 F), SCB 04 (รูปที่ 3.6 G), SEC 04 (รูปที่ 3.6 H), SEC 07 (รูปที่ 3.6 I), SED 07 (รูปที่ 3.6 J), SNB 02 (รูปที่ 3.6 K) และ SNEB 17 (รูปที่ 3.6 L) SNEB 18 (รูปที่ 3.6 M) และ SWC 03 (รูปที่ 3.6 N)

กลุ่มที่ 4 โคลิโคนีมีลักษณะแบนราบ และลักษณะของ conidia แตกต่างจากกลุ่ม 1-3 คือ มีการสร้าง conidia จำนวนมาก เกาะแน่นเป็นแผ่นเดียวกัน ไม่พบการเจริญเป็นวงซ้อนกัน conidia มีสีเขียวซีมัว ยกเว้น ไอโซเลต-MA 017 ที่ conidia มีสีเขียวปนเหลือง โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว สีเหลือง ถึงสีส้ม โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004 (รูปที่ 3.7 A), MA 017 (รูปที่ 3.7 B), MA 021 (รูปที่ 3.7 C) และ MA 024 (รูปที่ 3.7 D)

กลุ่มที่ 5 เชื้อราในกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ คือ เส้นใยเจริญฟูขึ้นบนผิวหน้าอาหารทำให้เห็นลักษณะของโคลิโคนีมีเส้นใยฟู ระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน เช่นเดียวกับกับกลุ่มอื่นๆ แต่มีการสร้าง conidia ในปริมาณน้อย สีด้านหลังงานเพาะเลี้ยงจะมีสีขาว เหลืองถึงส้ม ยกเว้น ไอโซเลต SNB 03 ที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำแทรกโดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มมีจำนวน 6 ไอโซเลต คือ MA 002 (รูปที่ 3.8 A), MA 003 (รูปที่ 3.8 B), SNA 01 (รูปที่ 3.8 C) และ SNB 03 (รูปที่ 3.8 D) SNB 07 (รูปที่ 3.8 E), SNB 08 (รูปที่ 3.8 F)

โดยแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 5 กลุ่มสรุปโดยรวมในตารางที่ 3.3 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* เนื่องจากมีสีของโคลิโคนีในลักษณะสีเขียวค่อนข้างเข้มหรือเขียวซีมัว

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อราสกุล *Metarhizium* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง มีรายละเอียดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของ โคลิโคนีในแต่ละไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญลดลงหรือ ไม่มีความแตกต่างในระหว่างวันที่ 24 และ 28 อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของอาหาร และพื้นที่ในการเจริญที่มีการเจริญเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ดังนั้นในการเปรียบเทียบอัตราการเจริญจึงนำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในวันที่ 20 มาเปรียบเทียบ พบว่าทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดคือ ไอโซเลต MA 025 ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 40.84 ± 0.39 มิลลิเมตร และไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญเร็วที่สุดคือ ไอโซเลต SNEB 17 ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 82.95 ± 0.39 มิลลิเมตร และจากข้อมูลสามารถแบ่งกลุ่มอัตราการเจริญได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอัตราการเจริญช้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 60 มิลลิเมตร ซึ่งมีเพียง 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004, MA 024, MA 025 และ SNB 02 ไอโซเลตที่นอกเหนือจากนั้นจัดเป็นกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 มิลลิเมตรจำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 021, MA 022, MA 026, MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED 07, SNA 01, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว สอดคล้องกับการทดลองของ Luangsa-ard และคณะ (2007) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

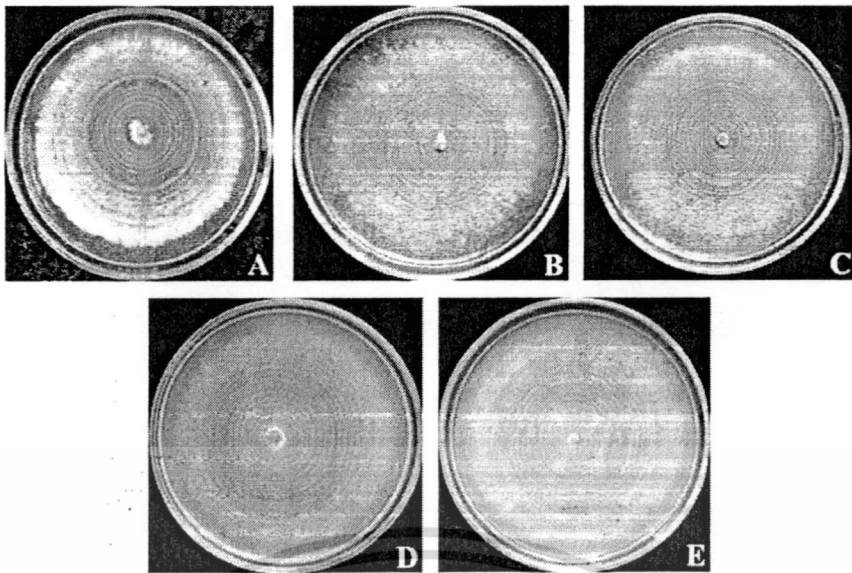
องศาเซลเซียส พบว่าเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาก คือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีระหว่าง 50-60 มิลลิเมตรภายในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์มากกว่าเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตช้า และไอโซเลต TISTR 3607 เคยได้รับการศึกษาการเจริญมาก่อนหน้านี้โดย Maketon และคณะ (2007) ที่คัดแยกเชื้อได้จากดินในประเทศไทย และนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมปลวก โดยพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* CKM-048 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และได้ส่งไอโซเลตนี้ไปเก็บรักษาที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และได้รหัสใหม่เป็น TISTR 3607 โดยผลจากการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *M. anisopliae* CKM-048 บนอาหาร SDAY ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ คือ 10, 20, 27, 30 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่สุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการศึกษา โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในวันที่ 14 เท่ากับ 68.8 มิลลิเมตร แต่สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ ไอโซเลตนี้อยู่ในกลุ่มที่มีอัตราการเจริญดีเนื่องจากมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 มิลลิเมตร อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับการทดลองของ Maketon และคณะ (2007) พบว่ามีอัตราการเจริญเปลี่ยนแปลงไป คือมีอัตราการเจริญเติบโตช้าลง โดยในวันที่ 16 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพียง 54.43 ± 1.9 มิลลิเมตร ซึ่งอัตราการเจริญขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ (Yip และคณะ, 1992 และ Welling และคณะ, 1994) อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งชนิดของตัวอย่างด้วย (Kamp และ Bidochka, 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

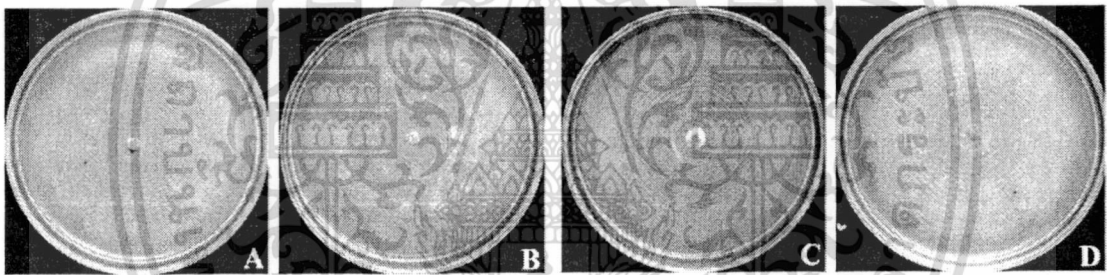
ตารางที่ 3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *M. anisopliae* จำนวน และรหัสตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่/รูปที่	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป	จำนวน/รหัสไอโซเลต
กลุ่มที่ 1 รูปที่ 3.4	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะการกระจายของ conidia เป็นลักษณะ zonation และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาว 	จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA007, MA 012, MA 014, MA 019 และ SWA 19
กลุ่มที่ 2 รูปที่ 3.5	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะการกระจายของ conidia เป็นลักษณะ zonation และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลือง 	จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 011, MA 015, MA 018 และ MA 022
กลุ่มที่ 3 รูปที่ 3.6	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะ conidia ค่อนข้างเกาะแน่น แต่ยังเห็นลักษณะ zonation ได้ และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงเหลืองเข้มหรือเหลืองอมส้มถึงส้ม 	จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, MA 025, MA 026, MA029, TISTR 3158, TISTR 3607, SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED.07, SNB 02, SNEB 17, SNEB 18 และ SWC 03
กลุ่มที่ 4 รูปที่ 3.7	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● มีการสร้าง conidia จำนวนมากทำให้มีลักษณะ conidia เกาะแน่นเป็นแผ่น และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า (ยกเว้น MA 017 สีเขียวปนเหลือง) ● ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงส้ม 	จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004, MA 017, MA 021 และ MA 024
กลุ่มที่ 5 รูปที่ 3.8	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีมีเส้นใยฟูถึงฟูมาก ● ส่วนใหญ่มีการสร้าง conidia จำนวนน้อย ถ้ามีอาจเห็นกระจายเป็นวง หรืออัดกันแน่น ● ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงส้ม 	จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ MA 002, MA 003, SNA 01, SNB 03, SNB 07 และ SNB 08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

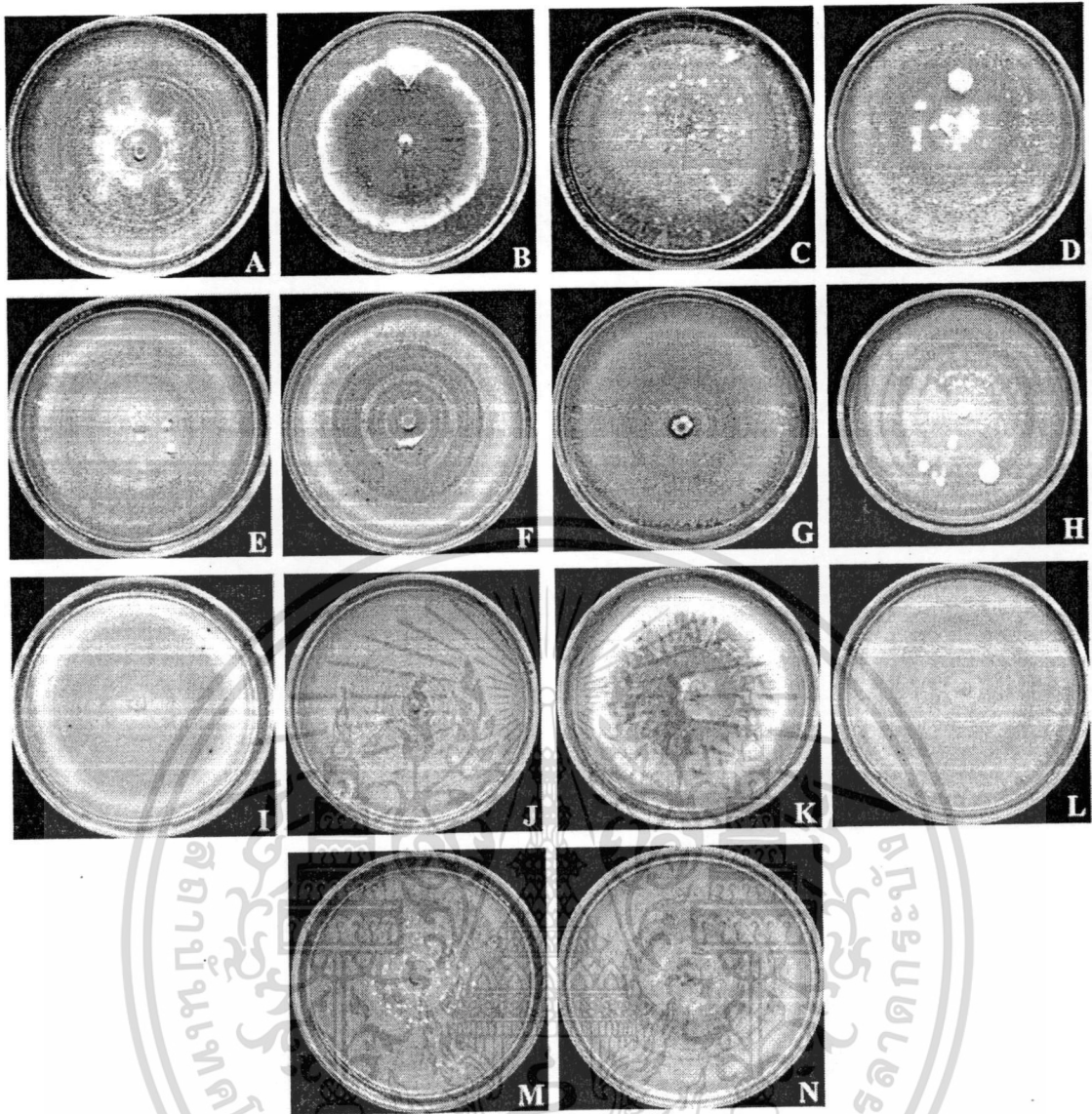


รูปที่ 3.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ
A: MA007; B: MA 012; C: MA014; D: MA 019 และ E: SWA 19



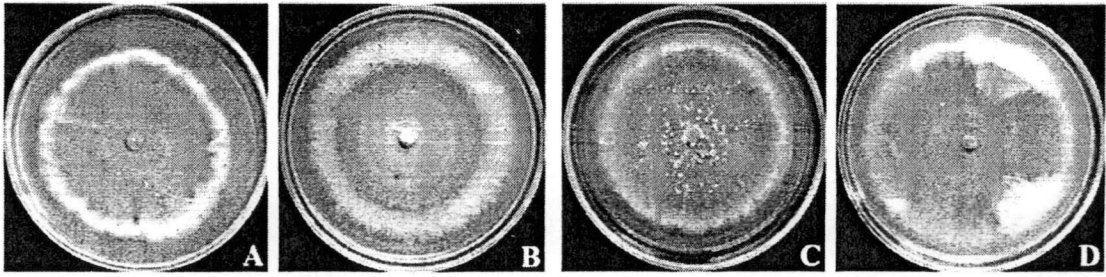
รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ
A: MA 011; B: MA 015; C: MA 018 และ D: MA022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

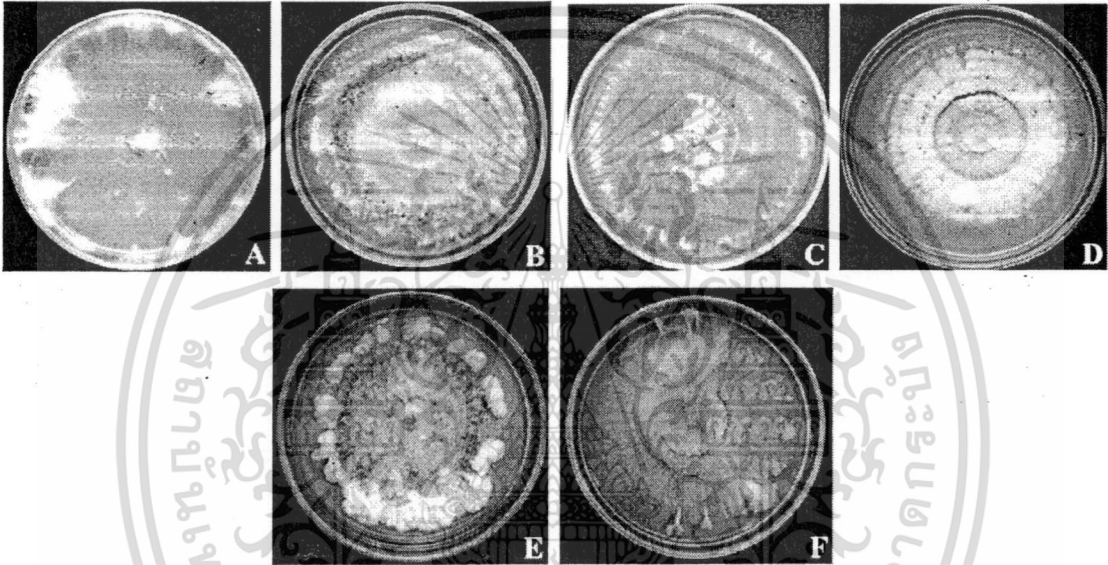


รูปที่ 3.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ไอโซเลต คือ
 A: MA 001; B: MA 025; C: MA 026; D: MA 029; E: TISTR 3158; F: TISTR 3607;
 G: SCB 04; H: SEC 04; I: SEC 07; J: SED 07; K: SNB 02; L: SNEB 17;
 M: SNEB 18 และ N: SWC 03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ
A: MA 004; B: MA 017; C: MA 021 และ D: MA 024



รูปที่ 3.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 5 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ
A: MA 002; B: MA 003; C: SNA 01; D: SNB 03; E: SNB 07 และ F: SNB 08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.4 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เจริญบนอาหารชนิด PDA
เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน

ไอโซเลต	ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) \pm S.E.						
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28
MA 001	13.12 \pm 0.37	28.36 \pm 0.39	45.66 \pm 0.72	57.14 \pm 0.39	69.99 \pm 0.40	78.65 \pm 0.33	83.87 \pm 0.33
MA 002	15.83 \pm 0.25	33.26 \pm 0.34	52.52 \pm 0.40	67.82 \pm 0.63	79.72 \pm 0.61	85.33 \pm 0.46	87.63 \pm 0.40
MA 003	13.51 \pm 0.2	21.07 \pm 0.38	43.89 \pm 0.56	68.07 \pm 1.22	75.75 \pm 0.54	83.08 \pm 0.57	86.10 \pm 0.69
MA 004	5.51 \pm 0.21	18.94 \pm 0.61	27.53 \pm 0.67	44.78 \pm 0.92	55.69 \pm 1.01	66.59 \pm 1.10	74.63 \pm 1.06
MA 007	15.96 \pm 0.30	31.94 \pm 0.60	46.06 \pm 1.22	59.8 \pm 1.77	75.96 \pm 1.08	81.40 \pm 1.28	84.52 \pm 0.96
MA 011	14.48 \pm 0.21	29.27 \pm 0.22	45.85 \pm 0.48	61.04 \pm 0.71	71.85 \pm 0.66	80.09 \pm 0.52	84.05 \pm 0.27
MA 012	15.78 \pm 0.35	33.01 \pm 0.48	49.79 \pm 0.72	65.37 \pm 0.96	75.45 \pm 0.63	82.18 \pm 0.32	84.97 \pm 0.53
MA 014	14.53 \pm 0.14	29.16 \pm 0.16	44.62 \pm 0.33	59.18 \pm 0.64	69.37 \pm 0.72	79.02 \pm 0.59	83.95 \pm 0.37
MA 015	14.80 \pm 0.31	30.38 \pm 0.40	47.32 \pm 0.60	62.69 \pm 0.77	73.30 \pm 0.78	80.05 \pm 0.46	86.82 \pm 0.50
MA 017	10.77 \pm 0.32	24.57 \pm 0.45	40.13 \pm 0.29	55.44 \pm 0.40	65.88 \pm 0.63	73.19 \pm 0.50	78.93 \pm 0.45
MA 018	15.27 \pm 0.20	29.95 \pm 0.24	45.56 \pm 0.25	60.40 \pm 0.29	71.46 \pm 0.40	80.08 \pm 0.35	84.61 \pm 0.36
MA 019	16.75 \pm 0.11	34.64 \pm 0.20	53.15 \pm 0.36	69.32 \pm 0.58	78.60 \pm 0.42	83.97 \pm 0.40	85.94 \pm 0.46
MA 021	9.49 \pm 0.62	22.63 \pm 0.66	34.73 \pm 0.42	48.33 \pm 0.63	60.8 \pm 0.54	73.30 \pm 0.55	81.27 \pm 0.46
MA 022	15.51 \pm 0.23	30.73 \pm 0.20	45.27 \pm 0.34	62.12 \pm 0.43	74.20 \pm 0.36	81.28 \pm 0.25	81.92 \pm 0.27
MA 024	11.26 \pm 0.23	22.24 \pm 0.56	33.33 \pm 0.66	44.96 \pm 0.74	55.15 \pm 0.78	64.83 \pm 0.57	72.90 \pm 0.33
MA 025	9.02 \pm 0.27	13.90 \pm 0.27	24.89 \pm 0.40	33.90 \pm 0.40	40.84 \pm 0.39	49.09 \pm 0.46	56.11 \pm 0.70
MA 026	15.36 \pm 0.12	24.37 \pm 0.36	45.28 \pm 1.96	58.81 \pm 1.73	71.06 \pm 1.63	81.33 \pm 1.01	85.05 \pm 0.76
MA 029	16.21 \pm 0.28	36.27 \pm 0.29	48.33 \pm 0.29	64.76 \pm 0.31	77.95 \pm 0.37	84.49 \pm 0.31	86.91 \pm 0.48
TISTR 3158	18.25 \pm 0.25	40.04 \pm 0.17	54.53 \pm 0.32	72.35 \pm 0.42	79.59 \pm 0.54	83.68 \pm 0.66	84.46 \pm 0.64
TISTR 3607	13.44 \pm 0.25	29.89 \pm 0.36	39.41 \pm 1.02	54.43 \pm 1.90	69.52 \pm 1.95	77.13 \pm 1.88	81.88 \pm 1.29
SCB04	10.77 \pm 0.18	17.19 \pm 0.24	35.44 \pm 0.58	52.02 \pm 0.52	65.56 \pm 0.62	78.08 \pm 0.38	82.61 \pm 0.34
SEC04	17.83 \pm 0.27	42.04 \pm 0.24	56.73 \pm 0.21	72.08 \pm 0.16	80.55 \pm 0.69	84.58 \pm 0.25	85.42 \pm 0.24
SEC07	9.26 \pm 0.35	25.67 \pm 1.02	37.21 \pm 1.08	67.70 \pm 1.50	67.7 \pm 1.54	78.89 \pm 1.05	83.03 \pm 0.61
SED07	14.92 \pm 0.14	30.97 \pm 0.20	48.15 \pm 0.19	79.57 \pm 0.43	79.57 \pm 0.33	83.81 \pm 0.24	84.69 \pm 0.32

ตารางที่ 3.4 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เจริญบนอาหารชนิด PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) \pm S.E.						
	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 12	วันที่ 16	วันที่ 20	วันที่ 24	วันที่ 28
SNA01	14.55 \pm 0.22	32.31 \pm 0.28	44.53 \pm 0.24	59.73 \pm 0.28	74.00 \pm 0.35	81.79 \pm 0.48	84.56 \pm 0.52
SNB02	9.82 \pm 0.38	22.88 \pm 0.83	31.85 \pm 1.02	43.25 \pm 1.12	58.02 \pm 1.27	68.37 \pm 1.25	79.09 \pm 1.70
SNB03	16.30 \pm 0.57	34.54 \pm 0.51	45.50 \pm 0.62	59.01 \pm 0.61	70.54 \pm 0.64	76.31 \pm 0.48	78.37 \pm 0.29
SNB07	14.07 \pm 0.16	27.85 \pm 0.29	40.03 \pm 0.17	53.16 \pm 0.40	63.58 \pm 0.33	73.37 \pm 0.55	80.15 \pm 0.53
SNB08	15.75 \pm 0.26	31.45 \pm 0.53	41.14 \pm 0.42	52.69 \pm 0.51	64.53 \pm 0.82	70.93 \pm 0.92	77.70 \pm 0.67
SNEB17	21.35 \pm 0.27	42.14 \pm 0.35	62.33 \pm 0.18	74.34 \pm 0.63	82.95 \pm 0.39	84.51 \pm 0.21	86.20 \pm 0.18
SNEB18	19.30 \pm 0.21	40.66 \pm 0.64	58.75 \pm 0.25	74.25 \pm 0.47	82.73 \pm 0.32	85.45 \pm 0.27	85.90 \pm 0.32
SWA19	14.66 \pm 0.43	35.66 \pm 0.41	48.87 \pm 0.56	65.03 \pm 0.56	78.36 \pm 0.35	83.27 \pm 0.37	84.48 \pm 0.23
SWC03	13.36 \pm 0.21	30.23 \pm 0.27	46.00 \pm 0.19	62.85 \pm 0.58	74.66 \pm 0.44	83.05 \pm 0.42	84.78 \pm 0.40

3.3.2 ลักษณะรูปร่าง และขนาดของ conidia

เมื่อดูลักษณะรูปร่าง และวัดขนาดของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มีลักษณะเป็นทรงไข่ขนาดเล็ก 1 ไอโซเลต (SEC 07) ทรงกระบอกยาวแคบ มีการคอดหรือแคบตรงกลางมากจำนวน 3 ไอโซเลต (MA 004, MA 021 และ MA024) และส่วนใหญ่ที่เหลือทั้ง 29 ไอโซเลตเป็นรูปทรงกระบอกตรง และบาง conidia หรือบางไอโซเลตมีการคอดหรือแคบตรงกลางเล็กน้อยสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวไว้ว่าถ้า conidia เป็นรูปทรงกระบอก ที่อาจมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกที่แคบตรงกลางหรือวงรีแคบจัดกลุ่มเป็น *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* แต่ถ้า conidia เป็นรูปวงรีหรือทรงไข่นั้นจัดเป็น *M. album* และ *M. flavoviride* (Tulloch, 1976; Rombach และคณะ, 1987 และ Yip และคณะ, 1992) และจากการศึกษาพบว่าขนาดของ conidia ที่พบได้ในแต่ละไอโซเลตมีขนาดแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 3.4 และรูปที่ 3.9-3.11 โดยพบว่าไอโซเลตที่ความกว้างมีค่าน้อยที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 1.90 ไมโครเมตร และมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 4.52 ไมโครเมตร ได้แก่ MA 029 และ MA 021 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตที่มีค่าความยาวของ conidia น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 4.88 ไมโครเมตร และมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 16.87 ไมโครเมตร ได้แก่ SEC 07 และ MA 024 ตามลำดับ

ดังนั้นจากขนาดความยาว conidia สามารถจัดกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* จากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้อย่างชัดเจน คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* อย่างไรก็ตามการระบุชื่ออย่างถูกต้องจำเป็นต้องอาศัยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

var. *majus* โดยส่วนใหญ่เป็น var. *anisopliae* มีทั้งหมด 30 ไอโซเลต เนื่องจากมี conidia ขนาดสั้น คือ มีความยาวอยู่ระหว่าง 4.88-10.26 ไมโครเมตร และ var. *majus* จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004, MA 021 และ MA 024 เนื่องจากมี conidia ขนาดยาว โดยมีความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 15.89, 16.70 และ 16.87 ไมโครเมตรตามลำดับ ดังรายงานของ Tulloch (1976) ที่แยก *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาด conidia คือ var. *anisopliae* มี conidia ขนาดสั้น โดยมีความยาวระหว่าง 3.5-9.0 ไมโครเมตร แต่ที่พบได้บ่อยมีความยาว 5.0-8.0 ไมโครเมตร ส่วน var. *major* มี conidia ขนาดยาวประมาณ 9.0-18.0 ไมโครเมตร โดยที่พบได้บ่อย คือ ความยาวขนาด 10.0-14.0 ไมโครเมตร แต่ Rombach และคณะ (1987) แบ่งกลุ่มให้ conidia ที่มีขนาดความยาวน้อยกว่าเท่ากับ 7 ไมโครเมตร หรือมีขนาดระหว่าง 7-9 ไมโครเมตรจัดจำแนกเป็น *M. anisopliae* var. *anisopliae* แต่ถ้า conidia มีขนาดความยาวมาก คือ มีขนาดมากกว่าเท่ากับ 11 ไมโครเมตรจัดจำแนกเป็น *M. anisopliae* var. รวมทั้ง 3 ไอโซเลตนี้แยกได้จากด้วงแรดมะพร้าวที่เป็นแมลงไนอันดับ Coleoptera สอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่า *M. anisopliae* var. *majus* มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงอันดับ Coleoptera โดยเฉพาะด้วงแรดมะพร้าวมากกว่าสปีชีส์อื่นๆ (Radha และคณะ, 1956; Latch, 1976; Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005)

จากการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia น้อย (≤ 2.18) (รูปที่ 3.9 A-C) กลุ่มปานกลางที่มีอัตราส่วนมีค่าอยู่ระหว่าง 2.33-2.87 (รูปที่ 3.10 A-O) และอัตราส่วนมาก (≥ 2.91) (รูปที่ 3.11 A-O) โดยกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia น้อยมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, TISTR 3607 และ SEC 07 ซึ่งไอโซเลต SEC 07 นั้นมีขนาดความยาวของ conidia เฉลี่ยสั้นที่สุด ทำให้มีลักษณะคล้ายรูปไข่ขนาดเล็ก (รูปที่ 3.9 C) สำหรับกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมีค่าปานกลาง และมากมีอย่างละ 15 ไอโซเลต โดยกลุ่มที่มีอัตราส่วนปานกลาง ได้แก่ MA 007, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, TISTR 3158, SCB 04, SEC 04, SED 07, SNB 02, SNB 03, SNEB 17 และ SWA 19 นอกนั้นจัดเป็นกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมีค่ามากทั้งหมดดังตารางที่ 3.5

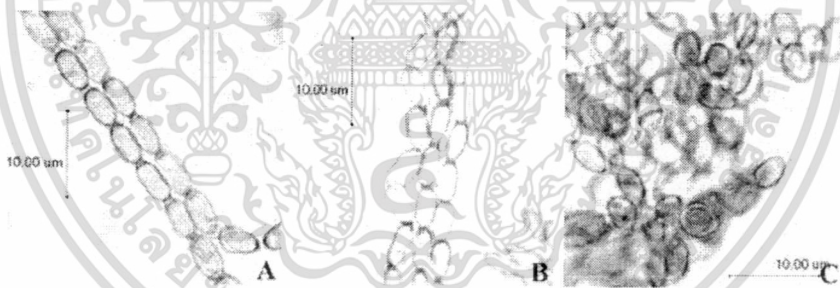
ตารางที่ 3.5 ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตาม อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia.

ไอโซเลต	ความกว้างของ conidia (ไมโครเมตร)				ความยาวของ conidia (ไมโครเมตร)				อัตราส่วน ยาว/กว้าง	กลุ่มตาม อัตราส่วน
	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด		
MA 001	3.340	0.072	2.670	4.280	7.289	0.108	5.940	8.880	2.18	น้อย
TISTR 3607	2.354	0.042	1.980	3.080	5.125	0.070	4.100	6.160	2.18	น้อย
SEC 07	2.741	0.055	2.280	3.880	4.877	0.067	3.660	5.770	1.78	น้อย
MA 007	3.729	0.080	2.670	4.750	10.264	0.150	7.820	12.180	2.75	ปานกลาง
MA 014	3.329	0.055	2.750	4.150	9.105	0.083	7.970	9.980	2.73	ปานกลาง
MA 015	3.561	0.064	2.950	4.550	9.501	0.105	7.930	10.950	2.67	ปานกลาง
MA 017	3.500	0.067	2.460	4.300	9.225	0.183	5.990	12.030	2.64	ปานกลาง
MA 018	3.183	0.070	2.290	4.170	9.149	0.100	7.710	10.950	2.87	ปานกลาง
MA 019	3.387	0.062	2.700	4.270	9.720	0.161	6.800	12.590	2.87	ปานกลาง
MA 022	3.369	0.068	2.420	4.140	9.260	0.115	7.070	10.680	2.75	ปานกลาง
TISTR 3158	2.277	0.043	1.400	2.930	6.209	0.083	5.020	7.530	2.73	ปานกลาง
SCB 04	2.322	0.036	1.900	3.020	6.278	0.081	5.480	7.320	2.70	ปานกลาง
SEC 04	2.259	0.043	1.830	2.930	6.367	0.080	5.480	7.760	2.82	ปานกลาง
SED 07	2.288	0.043	1.800	2.910	5.325	0.069	4.420	6.420	2.33	ปานกลาง
SNB 02	3.850	0.061	3.040	4.620	10.774	0.132	8.890	12.540	2.80	ปานกลาง
SNB 03	2.419	0.056	1.760	3.160	5.848	0.095	4.240	7.600	2.42	ปานกลาง
SNEB 17	2.388	0.062	1.360	3.080	6.304	0.080	5.320	7.890	2.64	ปานกลาง
SWA 19	2.565	0.046	2.040	3.210	6.841	0.106	5.700	8.170	2.67	ปานกลาง
MA 002	2.959	0.067	2.060	3.640	8.618	0.140	7.070	10.330	2.91	มาก
MA 003	2.604	0.051	1.940	3.170	9.100	0.154	7.670	11.460	3.49	มาก
MA 004	4.124	0.077	3.120	5.010	15.894	0.145	14.230	17.860	3.85	มาก
MA 011	3.216	0.066	2.490	4.590	9.360	0.108	7.990	10.450	2.91	มาก
MA 012	3.096	0.065	2.190	4.140	9.755	0.106	8.380	11.290	3.15	มาก
MA 021	4.516	0.087	3.110	5.930	16.698	0.224	13.650	21.220	3.70	มาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

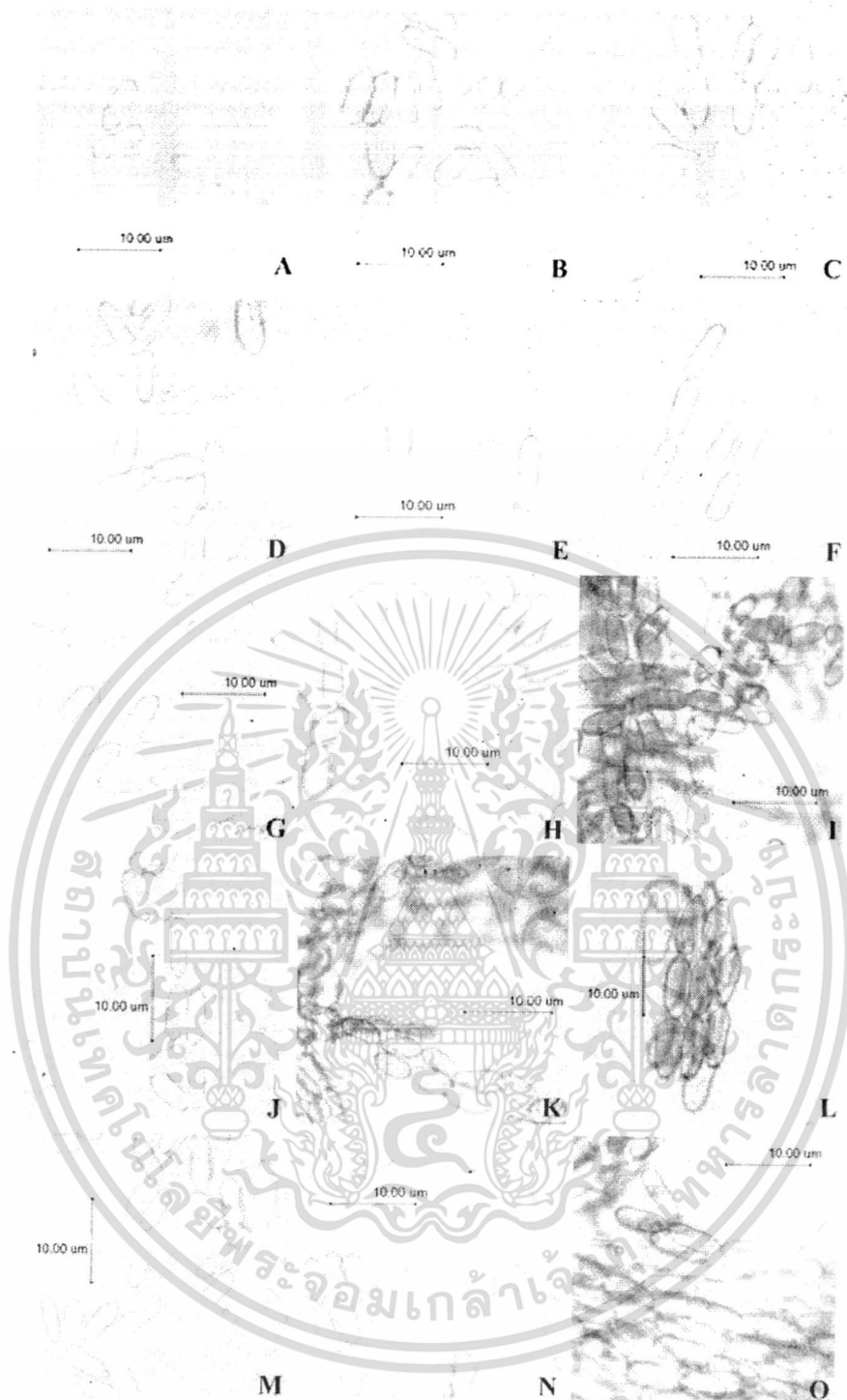
ตารางที่ 3.5 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia

ไอโซเลต	ความกว้างของ conidia (ไมโครเมตร)				ความยาวของ conidia (ไมโครเมตร)				อัตราส่วนยาว/กว้าง	กลุ่มอัตราส่วน
	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด		
MA 024	3.952	0.072	2.500	4.860	16.873	0.242	14.250	20.280	4.27	มาก
MA 025	2.918	0.074	2.000	4.380	9.423	0.120	8.070	11.490	3.23	มาก
MA 026	2.896	0.055	2.240	3.710	9.171	0.180	7.290	11.720	3.17	มาก
MA 029	1.903	0.030	1.500	2.310	6.126	0.085	5.020	7.240	3.22	มาก
SNA 01	2.252	0.051	1.710	2.930	6.748	0.091	5.850	8.190	3.00	มาก
SNB 07	3.044	0.067	2.240	3.980	9.012	0.082	7.960	9.990	2.96	มาก
SNB 08	3.501	0.055	2.830	4.240	10.235	0.137	8.120	12.030	2.92	มาก
SNEB 18	2.062	0.044	1.700	2.660	6.406	0.100	4.950	7.710	3.11	มาก
SWC 03	2.995	0.049	2.430	3.610	8.804	0.144	6.220	10.510	2.94	มาก



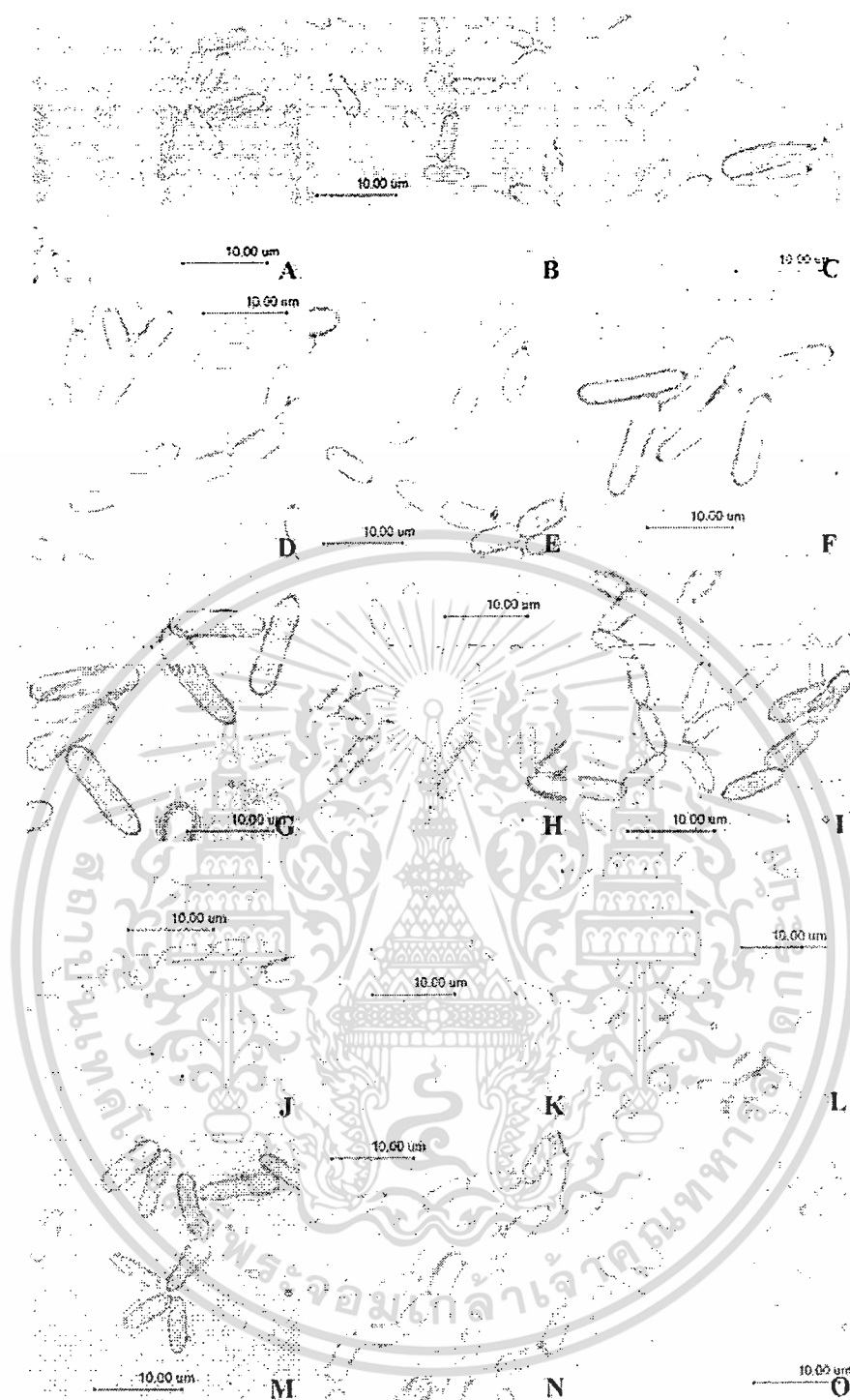
รูปที่ 3.9 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าต่ำ; A: MA 001; B: TISTR 3607 และ C: SEC 07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.10 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าปานกลาง; A: MA 007; B: MA 014; C: MA 015; D: MA 017; E: MA 018; F: MA 019; G: MA 022; H: TISTR 3158; I: SCB 04; J: SEC 04; K: SED 07; L: SNB 02; M: SNB 03; N: SNEB 17 และ O: SWA 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.11 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง; A: MA 002; B: MA 003; C: MA 004; D: MA 011; E: MA 012; F: MA 021; G: MA 024; H: MA 025; I: MA 026; J: MA 029; K: SNA 01; L: SNB 07; M: SNB 08; N: SNEB 18 และ O: SWC 03

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

3.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 28 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1/ITS 4 (Internal Transcribed Spacers 1 and 4) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้ เมื่อนำมาตรวจสอบขนาดโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรสเจลร้อยละ 1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบสทุกไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 3.12 A และ 3.12 B ซึ่งขนาดของ PCR product ที่เท่ากันในทุกไอโซเลตนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ รวมทั้งไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ได้เนื่องจากมีขนาดของ PCR product ไม่มีความแตกต่างกัน โดยขนาดของ PCR product ในงานวิจัยนี้มีขนาดใกล้เคียงกับรายงานของ Destéfano และคณะ (2004) ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันตรวจสอบ และบ่งชี้สปีชีส์และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้เนื่องจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยพบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศบราซิล (สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C) มีขนาดที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่มาจากประเทศออสเตรเลีย (สายพันธุ์ 14) คือ มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 540 และ 600 คู่เบสตามลำดับ และยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ของ *M. flavoviride* และ *M. album* ได้โดยมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 600 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่ชัดเจนว่ามีการใช้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์เนื่องจากขนาดของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ 14 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ *M. flavoviride* จึงต้องหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นร่วมด้วยทั้งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิค RFLP

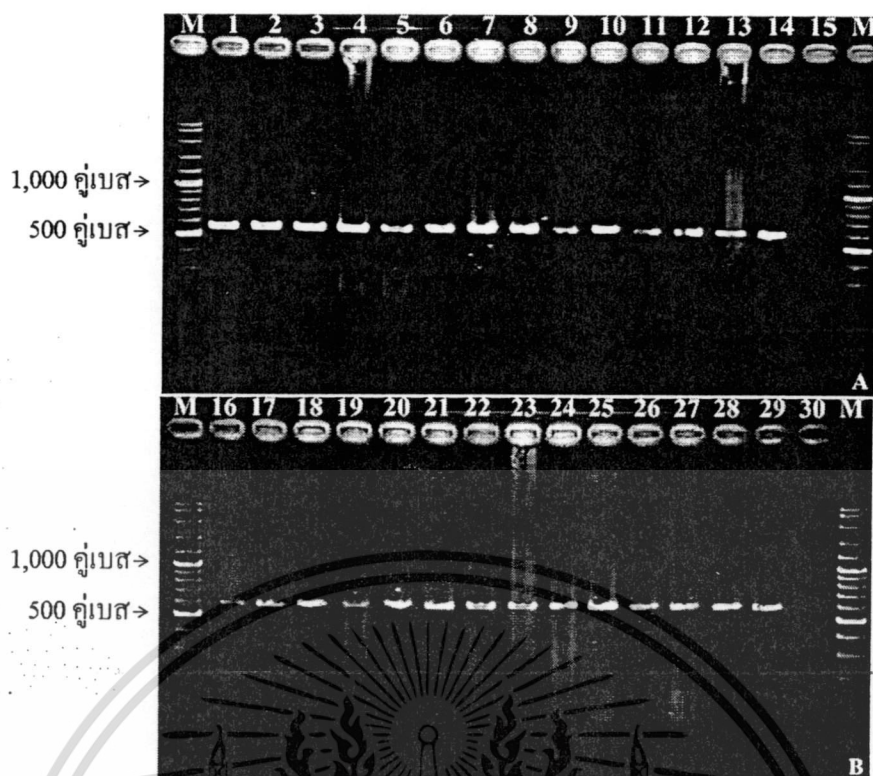
ปัจจุบันตำแหน่ง ITS เป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชื้อรา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความแปรผันหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากกว่าตำแหน่งอื่นใน rDNA ทำให้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (Curran และคณะ, 1994; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Mavridou และคณะ, 2000; Pantou และคณะ, 2003; Hughes และคณะ, 2004; Destéfano และคณะ, 2004 และ Bidochka และคณะ, 2005) โดยบริเวณ ITS นี้มีไพรเมอร์หลากหลายชนิดที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ และให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังสามารถใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ small subunit coding (SSU) และ large subunit coding (LSU) ที่ให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวมากขึ้นจากที่สามารถเพิ่มขนาดในส่วนของ 16S rDNA และ 28S rDNA ด้วย โดยไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการศึกษา คือ ไพรเมอร์ชนิด ITS 1 และ ITS 4 (Destéfano และคณะ, 2004 และ Bidochka และคณะ, 2005), ไพรเมอร์ชนิด TW 81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') และ AB 28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Curran และคณะ, 1994; Driver และคณะ, 2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ Entz และคณะ, 2005) และไพรเมอร์ชนิด NS 3 (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') และ NS 6 (5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3') (ศิริลัย และคณะ, 2551) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในบริเวณ SSU

โดย Curran และคณะ (1994) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* จำนวน 31 ไอโซเลต จาก 3 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae*, *M. flavoviride* และ *M. album* โดยใช้ไพรเมอร์ชนิด TW 81 และ AB 28 ที่เพิ่มในส่วนของบริเวณ 16S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส สามารถบ่งชี้สปีชีส์ได้อย่างชัดเจน และยังแบ่งเชื้อรา *M. anisopliae* ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และอีกกลุ่มหนึ่งที่แตกต่างไป ซึ่งให้ข้อมูลที่ใหม่ที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม จากนั้น Driver และคณะ (2000) ใช้ไพรเมอร์ชนิดนี้ในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ *Metarhizium* สปีชีส์ต่างๆ ทั้งหมด 123 ไอโซเลต โดยสามารถแยกสปีชีส์ออกได้เป็น 10 กลุ่ม คือ *M. album* (กลุ่ม 1), *M. flavoviride* (กลุ่ม 2-6) และ *M. anisopliae* (กลุ่ม 7-10) และ ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยกลุ่ม *M. album* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 570 คู่เบส กลุ่ม *M. flavoviride* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 530-550 คู่เบส และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* FI-1029 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส ต่อมา Entz และคณะ (2005) ได้พัฒนาไพรเมอร์จากบริเวณดังกล่าวได้เป็นชนิด Mac-ITS-spF (5'-CTGTCAGTGTGCTTCGGCGGTAC-3') และ Mac-ITS-spR (5'-CCCGT TGCAGTGAGTTACTACTGC-3') โดยสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับ *M. anisopliae* var. *acridum* และ *M. anisopliae* var. *minus* โดยที่จากการศึกษาของ Driver และคณะ (2000) จัดกลุ่มให้ *M. anisopliae* var. *minus* อยู่ในกลุ่ม *M. anisopliae* var. *acridum* แต่ไม่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ใน *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. flavoviride* รวมทั้ง *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa*, *Verticillium alboatrum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Emericella nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, *Penicillium bilaii*, *Hydropisphaera peziza* และ *Rhizopus* sp. จึงเหมาะแก่การนำมาคัดแยกเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* นอกจากนั้นแล้วบริเวณ ITS ยังสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ระยะของเชื้อราได้ โดยเชื้อราสกุล *Metarhizium* เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะ anamorph หรือระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจะอาศัย conidia เพื่อการขยายพันธุ์ แต่ถ้าเชื้อราสกุลนี้อยู่ในระยะ teleomorph หรือระยะที่มีลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะถูกจัดอยู่ในสกุล *Cordyceps* ดังเช่น Liu และคณะ (2001, 2002) ใช้ไพรเมอร์ชนิด ITS 4 และ ITS 5 ในการบ่งชี้ว่า *M. anisopliae* var. *majus* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 636 คู่เบส และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับ *C. brittlebankisoides* ที่คัดแยกมาจากเชื้อราในระยะ teleomorph เช่นเดียวกับ Yang และคณะ (2009) ที่บ่งชี้ว่า *M. taii* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับ *C. chongqingensis* ในตำแหน่ง ITS และ 26S rDNA บริเวณ D 1-D 2 โดยมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 553 และ 601 คู่เบสตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.12 แสดงขนาดของ PCR product ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1/ITS 4, A: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และ Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ได้ดีเอ็นเอต้นแบบ)

รวมทั้งบริเวณ IGS ใน rDNA ที่สามารถนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ ดังเช่น Hughes และคณะ (2004) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่ก่อโรคในแมลงในรังมดกัดใบไม้ บริเวณป่าในเขตร้อนของประเทศปานามา โดยศึกษาเชื้อรา *Metarhizium* ทั้งหมด 58 ไอโซเลตด้วยเทคนิค PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ Ma-IGSspF และ Ma-IGSspR ซึ่งเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอในบางส่วนของตำแหน่ง IGS เฉพาะเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* รวมทั้ง Pantou และคณะ (2003) ได้ศึกษาบริเวณ IGS พบขนาดขึ้นดีเอ็นเอของเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* มีขนาด 380 คู่เบส เช่นกัน

นอกจากนั้นยังมีตำแหน่งอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการตรวจสอบ บ่งชี้ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น Rakotonirainy และคณะ (1994) ทำการศึกษาด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S rRNA ที่สามารถแยก *M. flavoviride* และ *M. anisopliae* ออกจากกันได้เช่นกัน และสามารถแยก *M. anisopliae* var. *majus* ออกจากสายพันธุ์อื่นได้ หรือ Bidochka และคณะ (2005)

ที่ใช้บางส่วนของยีนในบริเวณ ITS, calmodulin (*CAL*), chitin synthase I (*CHS*), subtilisin-like protease (*SP*) และอื่นๆ อย่างไรก็ตามมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

protease (*PR1*), neutral trehalase (*NTL*) และ actin (*ACT*) ในการจัดจำแนกกลุ่มของ *M. anisopliae* ที่คัดแยกได้จากประเทศแคนาดา ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (heat-active) และที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (cold-active) และ Bischoff และคณะ (2006) ศึกษาในตำแหน่งของ intron และ exon ของ EF-1a intron region และ EF-1a exon, RPB1 และสองบริเวณของ RPB 2a และ RPB 2b โดยมีพีชบริเวณ EF-1a intron ที่สามารถเพิ่มได้ในทุกไอโซเลต

3.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ

จากการนำผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 28 ไอโซเลตด้วยการจำลองบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยการใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 โดยขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้หลังจากการเปรียบเทียบ และแก้ไขเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากัน พบว่าเหลือลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนเข้าโปรแกรมเท่ากับ 460 คู่เบส โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวนมากที่ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น *BamH I*, *BstSN I*, *EcoRV*, *FauND I*, *Fok I*, *Hind III*, *Hpa I*, *Mlu I*, *Nhe I*, *NruI*, *Pst I*, *Pvu I*, *Sfr274 I*, *Sac I*, *Sal I*, *Sma I*, *Ssp I*, *Xba I* และ *Xho I* เป็นต้น ในส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดแล้วผลไม่สามารถแยกความแตกต่างในระหว่างไอโซเลตได้แก่ *Acc 16 I*, *Ban III*, *Bbv I*, *BsrD I*, *BsuR I*, *Dde I*, *Hae III*, *Eco31 I*, *Hga I*, *SfaN I*, *Sph I* และ *Hae III* เป็นต้น พร้อมทั้งยังมีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอแล้วได้ชิ้นส่วนขนาดเล็กซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปใช้จริงได้แก่ *AspLE I*, *MnII*, *Taq I* และ *Tru9 I* เป็นต้น และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดบริเวณจดจำในแต่ละไอโซเลตแล้วพบความแตกต่าง ได้แก่ *Ase I*, *EcoR I*, *Sfr303 I* และ *Vsp I* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมแก่การคัดเลือกมาใช้ในการวิเคราะห์ PCR-RFLP ต่อไป โดยยกตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะ และรายละเอียดขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดจากโปรแกรมได้ดังแสดงตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ชนิด และขนาดของซิมดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0)

โคลONY	ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ														
	Hae III	Dra I	EcoR I	Eco 31 I	Hpa II	Taq I	Ysp I	Sfr 303 I	Cla I	Acc 16 I	Ban III	Dpn I	Acc I	Alu I	BamH I
MA 001	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 360	25, 60, 50 130, 195	0	130, 330	110, 350	130, 330	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
MA 002	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 361	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0
MA 003	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 362	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0
MA 007	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 364	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 173	0	0	0
MA 011	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 365	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 174	0	0	0
MA 012	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 366	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
MA 014	110, 350	20, 440	0	120, 340	30, 70, 367	50, 130,	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0
MA 015	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 368	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0
MA 017	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 369	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 173	0	0	0
MA 018	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 370	50, 60, 130	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 174	0	0	0
MA 019	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 371	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
MA 022	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 373	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0
MA 025	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 375	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0
MA 026	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 376	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 173	0	0	0
TISTR 3158	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 377	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 174	0	0	0
TISTR 3607	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 378	25, 60, 50 130, 195	0	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
MA 029	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 379	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0

ตารางที่ 3.6 (ต่อ) ชนิด และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0)

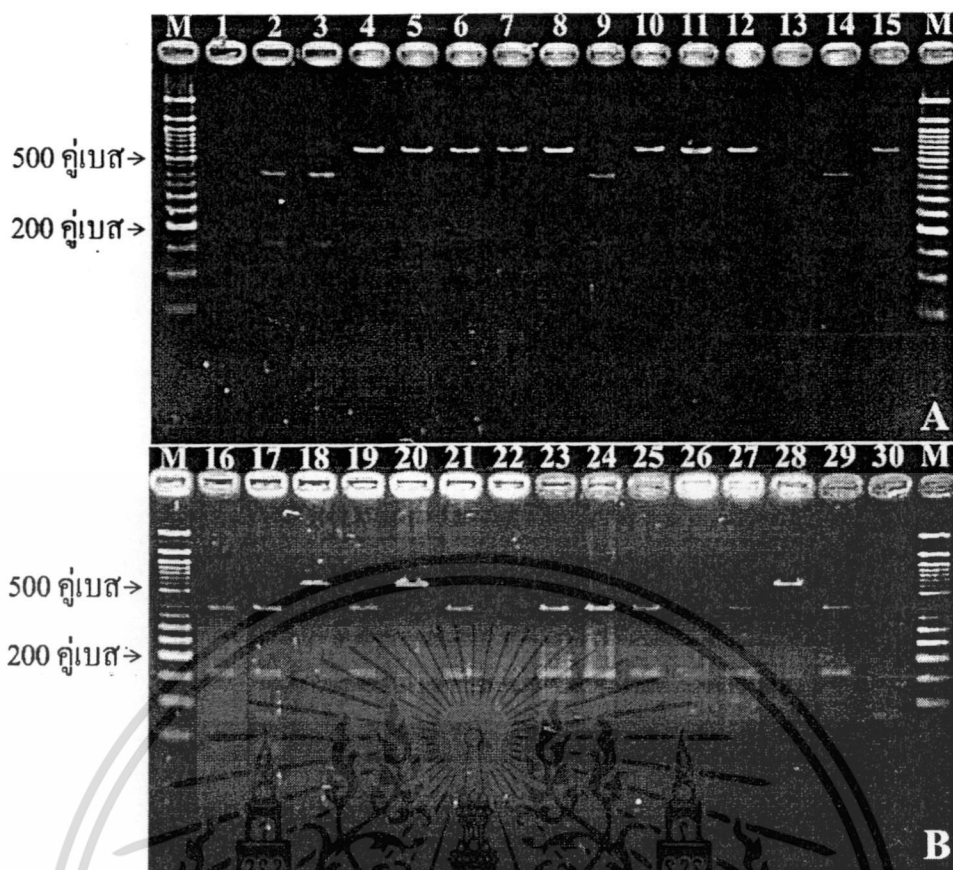
ชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ไอโซเลต	Hae III	Dra I	EcoR I	Eco 31 I	Hpa II	Taq I	Vsp I	Sfr 303 I	Cla I	Acc 16 I	Ban III	Dpn I	Acc I	Alu I	BamHI
SEC 04	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 381	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0
SED 07	110, 350	80, 380	170, 290	120, 340	30, 70, 383	25, 60, 50 130, 195	0	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 173	0	0	0
SNA 01	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 384	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 174	0	0	0
SNB 02	110, 350	80, 380	170, 290	120, 340	30, 70, 385	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
SNB 03	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 386	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0
SNB 07	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 387	130, 330	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0
SNB 08	110, 350	0	0	120, 340	30, 70, 388	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 173	0	0	0
SNEB 17	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 389	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 174	0	0	0
SNEB 18	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 390	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 170	0	0	0
SWA 19	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 391	25, 60, 50 130, 195	0	110, 350	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 171	0	0	0
SWC 03	110, 350	0	170, 290	120, 340	30, 70, 392	25, 60, 50 130, 195	130, 330	0	130, 330	110, 350	130, 330	110, 180, 172	0	0	0



Hpa II ที่ใช้เทคนิค RFLP ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ตรวจสอบและบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu* I, *Hae* III และ *Hpa* II ตัดแล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 100-650, 100-450 และ 100-370 คู่เบส ตามลำดับ ยกเว้นเอนไซม์ *Alu* I ที่ไม่สามารถตัด *M. anisopliae* สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C ที่มาจากประเทศบราซิลได้ ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศออสเตรเลีย (สายพันธุ์ 14), *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศบราซิล (E9, B/Vi, C), *M. flavoviride* และ *M. album* ได้ และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ *Alu* I ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในทุกไอโซเลต เช่นเดียวกับ *M. anisopliae* สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C ที่มาจากประเทศบราซิล จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง *M. anisopliae* มีการกลายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ที่มาจากประเทศบราซิลมากกว่าที่มาจากประเทศออสเตรเลีย

เอนไซม์ที่สามารถตัด PCR product และให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 1 ชนิด คือ *Vsp* I โดยผลจากการตัดด้วยเอนไซม์พบว่ามียังกลุ่มที่เอนไซม์ไม่สามารถตัดได้ ได้แก่ ไอโซเลต MA 002, MA 003, MA 017, MA 025, MA 026, MA 029, TISTR 3158, SNA 01, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และกลุ่มที่เอนไซม์ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 และ 400 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต MA 001, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 022, TISTR 3607 SED 07 และ SNB 02 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 3.13 A และ 3.13 B



รูปที่ 3.13 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Vsp* I ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 A: Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03; โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส, Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ใส่เอนไซม์)

3.4.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 28 ไอโซเลตที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้เนื่องจากตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ MA 004, MA 021, MA 024, SCB 04 และ SEC 07 ที่มีความยาวของ conidia เป็น 15.89, 16.70, 16.87, 6.28 และ 4.88 ตามลำดับ ไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากการวิเคราะห์ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากการติด N เป็นจำนวนมาก และเมื่อมีการตรวจสอบข้อมูลแล้วจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทุกไอโซเลตเหลือประมาณ 500 คู่เบส และนำไป BLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกตัวอย่างเป็นเชื้อราสกุล *Metarhizium* สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตแบบ multiple alignment และ

เอกสารอื่นที่เกี่ยวข้องหรือการค้นคว้าเพิ่มเติม เมื่อผู้ให้เนื้อหาใช้ประโยชน์จากการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมด จำนวน 21 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อราภายในสกุล *Metarhizium* จำนวน 19 ตัวอย่าง และ outgroup คือ *B. bassiana* จำนวน 2 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตารางที่ 2.1 และ phylogenetic tree ดังรูปที่ 3.14 สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม A-F โดยกลุ่ม A ประกอบด้วย *B. bassiana* ซึ่งใช้เป็น outgroup และเชื้อราสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ คือ *M. flavoviride* และ *M. album* รวมทั้ง *M. anisopliae* var. *acridum* ที่แยกกลุ่มออกจาก *M. anisopliae* อย่างชัดเจน โดยจากการศึกษาของ Driver และคณะ (2000) และ Brischoff และคณะ (2009) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. flavoviride* ที่มี conidia สีเขียวอมเหลือง ลักษณะเป็นรูปทรงรีหรือทรงไข่ขนาดเล็กแตกต่างจาก *M. anisopliae* ที่ conidia มีสีเขียวเข้มหรือเขียวจืดมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก และเชื้อราสายพันธุ์ *M. anisopliae* var. *acridum* นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก *M. anisopliae* มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งความแตกต่างในเรื่องของความจำเพาะต่อการเข้าทำลายแมลงซึ่ง *M. anisopliae* เข้าทำลายแมลงได้หลายอันดับอย่างกว้างขวางดังที่กล่าวมา แต่ *M. anisopliae* var. *acridum* นั้นมีความจำเพาะในการเข้าทำลายแมลงในอันดับ Orthoptera (Bridge และคณะ, 1997 และ Alston และคณะ, 2005) ซึ่งในปัจจุบัน Brischoff และคณะ (2009) ได้จัดแยก *M. anisopliae* var. *acridum* เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *M. acridum* stat. nov. ซึ่งในการทดลองนี้สนับสนุนให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ตำแหน่ง rDNA สามารถแยกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้ ดังนั้นจาก phylogenetic tree นี้ให้เห็นชัดเจนว่าตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 28 ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ *M. anisopliae* ซึ่งกระจายอยู่ในกลุ่ม B, C, E และ F และพบว่าในกลุ่ม B, C และ F ที่แยกออกมานั้นมีเฉพาะไอโซเลตจากประเทศไทย ในขณะที่กลุ่ม D และ E ประกอบไปด้วยไอโซเลตที่มาจากที่ต่างๆ ทั่วโลก และในกลุ่ม E ที่ประกอบด้วยไอโซเลต SWC 03, MA 029, SNEB 18, TISTR 3158 และ MA 017 แสดงความใกล้ชิดกับไอโซเลตที่มาจากที่อื่นมากกว่าในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามค่า Bootstrap ที่ประเมินจากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้งนั้นมีผลแสดงใน phylogenetic tree ของกลุ่ม E นั้นมีค่าน้อยกว่า 50 ซึ่งในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fegan และคณะ (1993) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae*

การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดย Tulloch (1976) และ Rombach และคณะ (1986) แบ่งออกเป็น 3 สปีชีส์ คือ *M. flavoviride*, *M. album* และ *M. anisopliae* ที่ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ var. *anisopliae* และ var. *majus* ซึ่งการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับผลการศึกษาทั้งทางด้านชีวเคมี (biochemical) และเทคนิคทางโมเลกุล (Fegan และคณะ, 1993; Mavridou และ Typas, 1998 และ Diver และคณะ, 2000) การศึกษาของ Diver และคณะ (2000) ที่จัดอนุกรมวิธานโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และ 28S rDNA D3 และเทคนิค RAPD ได้แบ่ง *Metarhizium*

ออกเป็น 10 กลุ่ม ซึ่งสปีชีส์ *M. anisopliae* นั้นกระจายอยู่ทั้งหมด 4 กลุ่ม (Clade 7-10) คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *acridum* และ var. *lepidiotum*

การแบ่งกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษา พบว่า กลุ่ม B ที่แยกออกไปนั้นมีลักษณะโดดเด่นแตกต่างจากกลุ่มอื่น เนื่องจากเป็นกลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา คือ อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด conidia มีขนาดปานกลาง ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีอยู่ในกลุ่ม 1 และ กลุ่ม 2 และตัวอย่างส่วนใหญ่คัดแยกได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera ยกเว้น ไอโซเลต MA 011 ที่คัดแยกได้จากแมลงในอันดับ Isoptera และ ไอโซเลต SWA 19 ที่คัดแยกเชื้อราได้จากดินนั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน ไอโซเลต MA 019 โดยมีความคล้ายคลึง identity เท่ากับ 100 เนื่องจากเป็นตัวอย่างดินที่เก็บมาจากบริเวณเดียวกับแมลง

ในกลุ่ม C นั้นประกอบไปด้วยตัวอย่างจำนวน 4 ไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มโคโลนีกลุ่มเดียวกัน คือ อยู่ในกลุ่มที่ 3 และ ไอโซเลต MA 001 ที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ ไอโซเลต TISTR 3607 มากกว่า ไอโซเลต SED 07 และ SNB 02 นั้นพบว่าทั้งสอง ไอโซเลตนั้นมีขนาดอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด conidia น้อย โดยในการศึกษาทางด้านเทคนิคทางโมเลกุลมีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด conidia น้อย และจาก phylogenetic tree ของกลุ่ม D และ E นั้นไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจนระหว่าง *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ซึ่ง var. *majus* ที่มีตัวอย่างจำนวนน้อยกว่านั้นจะแทรกอยู่ในกลุ่มของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ซึ่งให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของทั้งสองสปีชีส์อย่างชัดเจน ซึ่งในการแยกทั้งสองสายพันธุ์นั้นนิยมใช้ความยาวของ conidia ที่พบว่า var. *anisopliae* มีความยาวของ conidia สั้นกว่า var. *majus* ซึ่ง var. *majus* มีความยาว conidia มากกว่า 10 ไมโครเมตรหรือโดยทั่วไปพบความยาว conidia ที่ 12-13 ไมโครเมตร (Rombach และคณะ, 1986 และ Brischoff และคณะ, 2009) แต่ในปัจจุบันจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลในการคัดแยกระหว่าง var. *anisopliae* และ var. *majus* (Yoon และคณะ, 1998 และ Diver และคณะ, 2000) จึงอาจกล่าวได้ว่าการคัดแยกสายพันธุ์ของทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกจากกันนั้นอาศัยเพียงความยาวของ conidia นั้นไม่เพียงพอ ต้องอาศัยข้อมูลทางด้านโมเลกุลเข้าสนับสนุนจึงสามารถระบุสายพันธุ์อย่างชัดเจน โดย ไอโซเลต MA 017 ที่มีความยาว conidia ระหว่าง 5.99-12.03 ไมโครเมตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า MA 017 มีความยาว conidia หลากหลาย และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของ ไอโซเลต MA 017 จัดให้อยู่ในกลุ่ม E นั้น ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *M. anisopliae* var. *majus* (AY781690) มากกว่า *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่อยู่ภายในกลุ่ม E ซึ่งเป็นปัญหาที่น่าศึกษาใน ยีนหรือตำแหน่งอื่นต่อไปในอนาคต สำหรับ ไอโซเลต TISTR 3158 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศฟิลิปปินส์นั้นไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่างที่มาจากประเทศไทย หรือจากตัวอย่างที่คัดแยกได้จาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่มี ความชัดเจนในเรื่องของการแยกความสัมพันธ์ระหว่าง พันธุ์กรรม และแหล่งที่อยู่

ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่ม F เป็นตัวอย่างที่คัดแยกเชื้อได้จากดินเป็นส่วนใหญ่ และเป็น กลุ่มที่มีขนาดอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง และเป็นตัวอย่างที่มีลักษณะ ของโคโลนีอยู่ในกลุ่มที่ 5 คือที่มีเส้นใยฟูทุกตัวอย่าง ซึ่งในกลุ่ม F นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ในกลุ่ม E มากกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งในอนาคตควรที่จะศึกษาในบริเวณ IGS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ Ma-IGSpF และ Ma-IGSpR (Pantou และคณะ, 2003) ที่เพิ่มปริมาณ ขึ้นดีเอ็นเอเฉพาะ *M. anisopliae* var. *anisopliae* แต่ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสปีชีส์อื่นๆ ของเชื้อรา สกุล *Metarhizium* (Hughes และคณะ, 2004) เพื่อระบุสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น จาก ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบให้ได้มาซึ่ง phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งให้เห็นได้ว่าเชื้อ *M. anisopliae* น่าจะประกอบไปด้วยอย่างน้อย 5 สายพันธุ์ (กลุ่ม B-F) และไอโซ เลตจากประเทศไทย (กลุ่ม B, C, และ F) มีความแตกต่างจากไอโซเลตประเทศอื่นๆ แต่อย่างไรก็ ตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS นั้นไม่เพียงพอต่อการระบุความสัมพันธ์ในแต่ละไอ โซเลต หรือในระดับสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

นักวิจัยสนใจศึกษาการจลนกรรมวิธานของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอย่างมาก เนื่องจากมีความสำคัญในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งในปัจจุบันนี้การควบคุมโดยชีววิธีที่ ใช้เชื้อรา *M. anisopliae* มีความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความต้องการในการระบุสปีชีส์หรือสาย พันธุ์จึงต้องมีความถูกต้องแม่นยำสูงขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการควบคุมแมลง ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น จากข้อมูลในการครั้งนี้ทั้งการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา *M. anisopliae* ในประเทศไทยพิสูจน์ให้ เห็นว่าเชื้อรา *M. anisopliae* นั้นกระจายอยู่ได้โดยทั่วไป และส่วนใหญ่มีความแตกต่างจากไอโซเลต จากประเทศอื่นๆ

3.5 ประสิทธิภาพของเชื้อราในการกำจัดปลวก

เมื่อเพาะเลี้ยงปลวกในกล่องพลาสติกที่มีขนาดของพื้นภาชนะประมาณเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร รองด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และมีรูขนาดเล็กเพื่อให้อากาศ สามารถผ่านเข้าออกได้ที่ฝาครอบ ที่อุณหภูมิห้อง และในที่มืด แม้ว่ายังไม่ได้รับสารละลายของเชื้อ ปลวกจะตายภายใน 24 ชั่วโมง อาจเนื่องจากอากาศแห้งเกินไป และเมื่อหยดน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วลงบนกระดาษปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำปลวกใส่ลงไปในกล่องทันที ปลวกจะตายภายใน 24 ชั่วโมง เช่นกัน แต่เมื่อหยดน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ทั่วกระดาษ และปล่อย กระดาษให้หมาดๆ จึงปล่อยปลวกลงไป และต้องควบคุมให้มีความชื้นประมาณ 60-70% โดยการ

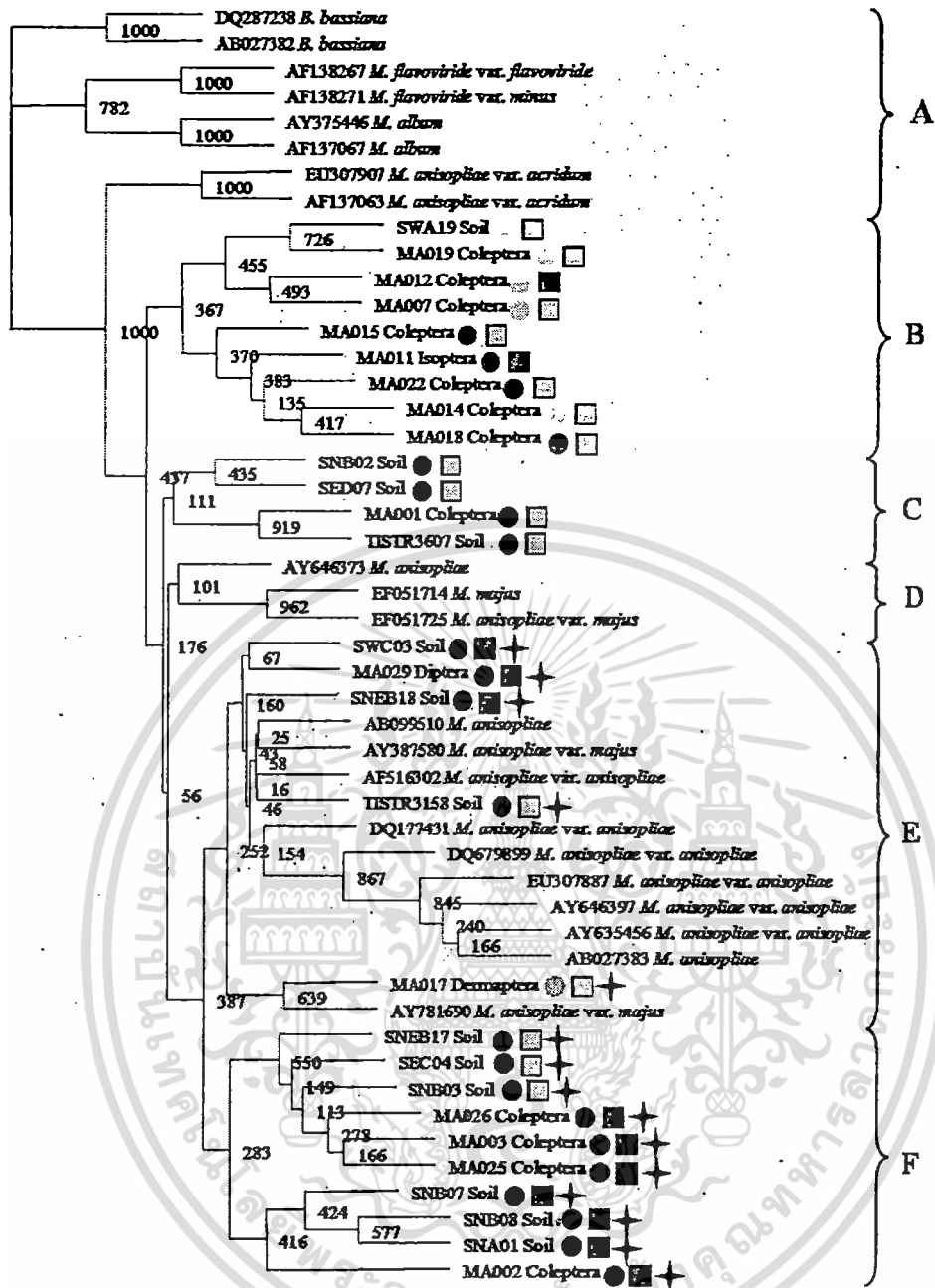
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรรมใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หยดน้ำลงบนกระดาษ หรือมีผ้าชุบน้ำภายในกล่องกระดาษที่บรรจุกล่องพลาสติกที่ใช้เพาะเลี้ยง
ปลวกสามารถอยู่ได้ประมาณ 5-7 วัน

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดปลวกของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต
คือ MA 002, MA 017, MA 018, MA 019 และ SEC 07 ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8
conidia/ml. พบว่าทุกไอโซเลตทำให้ปลวกตายภายใน 5-7 วัน แต่เฉพาะไอโซเลต MA 019 เท่านั้น ที่
เมื่อสังเกตลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบเส้นใย และการเกิดสปอร์สีเขียว
บนตัวปลวก หลังการได้รับเชื้อประมาณ 1 สัปดาห์ ที่ระดับความเข้มข้นของโคนินเดีย 10^8
conidia/ml. (รูปที่ 3.15 A และ B)

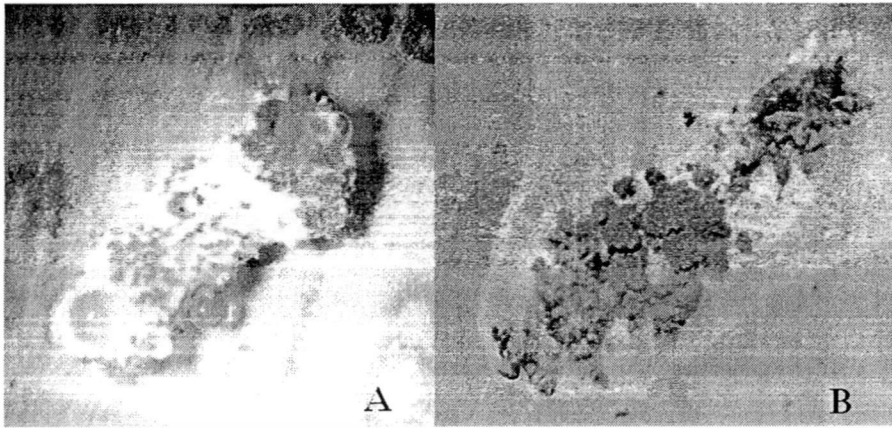


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.14 phylogenetic tree ของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 28 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ ไอโซเลตจากฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining method โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000; ■ แสดงกลุ่มจากการแบ่งตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia โดย □ มีค่าอัตราส่วนน้อย, □ มีค่าอัตราส่วนปานกลาง และ ■ มีค่าอัตราส่วนมาก; ● แสดงกลุ่มการแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย ①, ②, ③, ④ และ ⑤ และ + แสดง ไอโซเลตที่เอนไซม์ *Vsp I* ตัดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.15 แสดงลักษณะการเกิดการเข้าทำลายของเชื้อรา *M. anisopliae* ไอโซเลต MA 019 ต่อปลวกหลังการได้รับเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโคนิเดีย 10^8 conidia/ml. A: เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และ B 2 สัปดาห์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

สรุป และเสนอแนะ

จุดประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อคัดแยก และบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล รวมทั้งการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ต่อการกำจัดปลวก โดยศึกษาตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 33 ไอโซเลต ซึ่งคัดแยกได้จากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต และจากดินจำนวน 15 ไอโซเลต โดยเก็บตัวอย่างดินจาก 24 จังหวัดจำนวน 150 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากดินคิดเป็นร้อยละ 8.67 ของจำนวนตัวอย่างดินทั้งหมด และเชื้อราที่แยกได้เป็น *M. anisopliae* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่เลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม และเมื่อศึกษาความยาวของ conidia มีความยาวระหว่าง 4.88 ถึง 16.87 ไมโครเมตร นำมาหาอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของ conidia สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ อัตราส่วนมีค่าน้อย (≤ 2.18), ปานกลาง (2.33-2.87) และอัตราส่วนมาก (≥ 2.91)

เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคทาง โมเลกุลในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 พบว่าทุกไอโซเลตมี PCR product ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่าง และไม่สามารถบ่งชี้ระดับสปีชีส์หรือสายพันธุ์ของเชื้อราแต่ละ ไอโซเลตด้วยขนาดของชิ้น PCR product ได้ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้เพียงจำนวน 28 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 33 ไอโซเลต เนื่องจาก 5 ไอโซเลตไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์ และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไป BLAST เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกไอโซเลตเป็นเชื้อราสกุล *Metarhizium* ตามลักษณะจากสัณฐานวิทยา และนำมาหาความสัมพันธ์ในรูปแบบ phylogenetic tree กับเชื้อรา *Metarhizium* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 19 ตัวอย่าง และเชื้อราในสกุล *Beauveria* จำนวน 2 ตัวอย่างที่ใช้เป็น outgroup ซึ่งมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining โดยจาก phylogenetic tree สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม A-F ซึ่งกลุ่ม A ประกอบด้วย *B. bassiana* และเชื้อราสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ ที่แยกกลุ่มออกจาก *M. anisopliae* อย่างชัดเจน และพบว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้จะเป็น *M. anisopliae* ทั้งหมด ซึ่งแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพบกระจายอยู่ทั้งในกลุ่ม B, C, E และ F และไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ var. *majus* และ var. *anisopliae* ได้ อย่างชัดเจน จึงอาจกล่าวได้ว่าบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในตำแหน่งของ rDNA สามารถแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในระดับสปีชีส์ได้ แต่ไม่สามารถนำมาใช้แยกระดับสายพันธุ์ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในในยีนหรือตำแหน่งอื่น เพื่อระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ ได้อย่างชัดเจน

เพื่อการนำไปใช้กับแมลงได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น โดยไอโซเลตที่มาจากประเทศไทยมีเอกสารเป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างจากไอโซเลตประเทศอื่นๆ และในเทคนิค PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 15 ชนิด พบว่ามีเพียงเอนไซม์ *Vsp I* สามารถแยกกลุ่ม E และ F ออกจากกลุ่ม B และ C ได้

เมื่อทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดปลวกของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 5 ไอโซเลต คือ MA 002, MA 017, MA 018, MA 019 และ SEC 07 ที่ระดับความเข้มข้น 10^5 , 10^6 , 10^7 และ 10^8 conidia/ml. พบว่าทุกไอโซลทำให้ปลวกตายภายใน 5-7 วัน และมีเพียงไอโซเลต MA 019 ที่ระดับความเข้มข้นของโคนิเดีย 10^8 conidia/ml. ที่แสดงการเกิดเส้นใย และสปอร์สีเขียวบนตัวปลวก หลังการได้รับเชื้อประมาณ 1 สัปดาห์

นอกจากการศึกษาทางด้านสัตววิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลแล้วควรศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *M. anisopliae* ทางด้านอื่นเพิ่มเติมไม่ว่าจะเป็นการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงหรือกำจัดแมลงอื่นๆ การเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่าง สารทุติยภูมิ รวมทั้งการหาเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อใช้ในการคัดแยก และระบุสายพันธุ์ในแต่ละไอโซเลตให้ได้ชัดเจน แม้ว่าจะเลี้ยวมาจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าเทคนิคทางโมเลกุลมีความสำคัญมากในปัจจุบัน แต่ในการเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์นั้นควรอาศัยพื้นฐานจากลักษณะทางสัตววิทยาควนคู่ไปกับเทคนิคทางโมเลกุล เนื่องจากลักษณะทางสัตววิทยาที่สังเกตเห็น ได้นั้นเป็นการแสดงออกโดยรวมของยีนทั้งจีโนม

บรรณานุกรม

- มลิวัดย์ ปิ่นยารชุน, สุรพล ตระยานนท์, คนอง คลอดเพ็ง, อานูภาพ ชีรกุล และอำนวยการ อิศรางกูร ณ อยุธยา. 2544. ศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราเขียวต่อดั้วแรดมะพร้าว กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ. กองกัญและสัตววิทยา. 1-11.
- ตำรวล ดอกไม้หอม และณรงค์ศักดิ์ โพธิ์ไพฑูรณ์. 2526. การใช้เชื้อราเขียวกำจัดด้วงแรดมะพร้าว. ราชบุรี: ฝ่ายป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันตก.
- ศิริลย์ สิริมังการรัตน์, เบ็ญจมาศ ทรงพระ, หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริ. 2551. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลลำดับเบสของ 18s rDNA ของเชื้อราเขียว *Metarhizium anisopliae* ที่ทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลและด้วงแรด. 676-685.
- Alston, D.G., Range, D.E.N., Lacey, L.A., Golez, H.G., Kim J.J. and Roberts D.W. 2005. Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera:Curculionidae) larvae. *Biological Control*. 35: 163-171.
- Altschul, S.F., Warren, G., Webb, M., Eugene, W.M. and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215: 403-410.
- Bidochka, M.J. and Small, C.L. 2005. Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: Vega, F.E. and Blackwell, M. editors. *Insect-fungal associations ecology and evolution*. Oxford. University Press. pp. 28-50.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., St. Leger, R.J. and Roberts, D.W. 1994. Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*. 25: 107-113.
- Bidochka, M.J., Kamp, A.M., Lavender, T.M., Dekoning, J. and De Croos, J.N.A. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1335-1342.
- Bidochka, M.J., Small, C.L.N. and Spironello, M. 2005. Recombination within sympatric cryptic species of the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Environmental Microbiology*. 7: 1361-1368.

- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. 2006. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*. 98: 737-745.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101: 512-530.
- Bridge, P.D., Williams, M.A.J., Prior, C. and Paterson, R.R.M. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology*. 139: 1163-1169.
- Bridge, P.D., Prior, C., Sogbohan, J., Lomer, C.M., Carey, M., and Buddie, A. 1997. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation*. 6: 177-189.
- Bugeme, D.M., Knapp, M., Boga, H.I., Wanjoya, A.K. and Maniania, N.K. 2009. Influence of temperature on virulence of fungal isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Mycopathologia*. 167: 221-227.
- Curran, J., Driver, F., Ballard, J.W.O. and Milner, R.J. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*. 98: 547-558.
- De Carvalho Freire, L.L., Da Costa, A.B.L., Góes, L.B. and de Oliveria, N.T. 2001. DNA polymorphism and total protein in mutants of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (METSCH) sorkin strain E₉. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32: 93-97.
- Destéfano, R.H.R., Destéfano, S.A.L. and Messias, C.L. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology*. 27: 245-252.
- Dong, C., Zhang, J., Chen, W., Huang, H. and Hu, Y. 2007. Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. *Microbiological*. 162: 53-61.
- Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104: 134-150.
- Enkerli, J., Kölliker, R. and Widmer, F. 2005. Isolation and characterization of microsatellite markers from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Molecular Ecology Notes*. 5: 384-386.

- Enkerli, J., Ghormade, V., Oulevey, C. and Widmer, F. 2009. PCR-RFLP analysis of chitinase genes enables efficient genotyping of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 102: 185-188.
- Entz, S.C., Johnson, D.L. and Kawchuk, L.M. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological Research*. 109: 1302-1312.
- Evans, H.C. and Samson, R.A. 1982. Entomogenous fungi from the Galápagos Islands. *Canadian Journal of Botany*. 60: 2325-2333.
- Fegan, M., Manners, J.M., MacLean, D.J., Irwin, J.A.G., Samuels, K.D.Z., Holdom, D.G. and Li, D.P. 1993. Random amplified polymorphic DNA markers reveal a high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of General Microbiology*. 139: 2075-2081.
- Fungaro, M.H.P., Vieira, M.L.C., Pizzarani-Kleiner, A.A. and de Azevedo, J.L. 1996. Diversity among soil and insect isolates of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* detected by RAPD. *Letters in Applied Microbiology*. 22: 389-392.
- Gams, W. and Rozsypal, J. 1973. *Merarrhizium flavoviride* n.sp. isolated from insects and from soil. *Acta Botanica Neerlandica*. 22: 518-521.
- Goettel, M.S., Poprawski, T.J., Vandenberg, J.D., Li, Z. and Roberts, D.W. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. In: Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W., editors. *Safety of microbial insecticides*. Boca Raton, CA: CRC Press. pp. 209-232.
- Hajek, A.E., and St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J. and Boomsma, J.J. 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 85: 46-53.
- Inglis, G.D., Duke, G.M., Goettel, M.S. and Kabaluk, J.T. 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 101-113.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Iskandarov, U.S., Guzalova, A.G. and Davranov, K.D. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 42: 72-76.
- Kamp, A.M. and Bidochka, M.J. 2002. Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters in Applied Microbiology*. 35: 74-77.
- Kennedy, N. and Clipson, N. 2003. Fingerprinting the fungal community. *Mycologist*. 17: 158-163.
- Khetan, S.K. 2000. *Microbial pest control*. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 300.
- Kim, H.S., Jung, M.H., Ahn, S., Lee, C.W., Kim, S.N. and Ok, J.H. 2002. Structure elucidation of a new cyclic hexadepsipeptide from *Beauveria felina*. *Journal of Antibiotics*. 55: 598-601.
- Latch, G.C.M. 1964. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture-inhabiting insects. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 8: 384-396.
- Latch, G.C.M. and Fallon, R.E., 1976. Studies on the use of *Metarhizium anisopliae* to control *Oryctes rhinoceros*. *Entomophaga*. 21: 39-48.
- Leal, S.C.M., Bertioli, D.J, Butt. T.M. and Peberdy, J.F. 1994. Characterization of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. *Mycological Research*. 98: 1077-1081.
- Liang, Z.Q., Liu, A.Y. and Liu, J.L. 1991. A new species of the genus *Cordyceps* and its *Metarhizium* anamorph. *Acta mycologica sinica*. 10: 257-262 (In Chinese).
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Whalley, A.J.S., Yao, Y.Y. and Liu, A.Y. 2001. *Cordyceps brittlebankisoides*, a new pathogen of grubs and its anamorph, *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 78: 178-182.
- Liu, Z.Y., Liang, Z.Q., Liu, A.Y., Yao, Y.J., Hyde, K.D and Yu, Z.N. 2002. Molecular evidence for teleomorph-anamorph connections in *Cordyceps* based on ITS-5.8S rDNA sequences *Mycological Research*. 106: 1100-1108.
- Liu, C.M., Huang, S.S. and Tzeng, Y.M. 2004. Analysis of destruxins produced from *Metarhizium anisopliae* by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*. 42: 140-144.
- Lomer, C.J., Prior, C. and Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*. 171: 265-286.

Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., and Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*. 46: 667-702.

Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T. and Aljanabi, S.M. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93: 839-846.

Luangsa-ard, J.J., Tasanathai, K., Mongkolsamrit, S. and Hywel-Jones, N.L. 2007. Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Thailand. 1: pp. 56-59.

Maketon, M., Sawangwan, P. and Sawatwarakul, W. 2007. Laboratory study on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) in controlling *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomol Gener*. 30: 203-218.

Mavridou, A. and Typas, M.A. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycological Research*. 102: 1233-1241.

Mavridou, A., Cannone, J. and Typas, M.A. 2000. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Fungal Genetic and Biology*. 31: 79-90.

Milner, R. J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* 42: 227-239.

Milner, R.J, Staples, J.A. and Lutton, G.G. 1998. The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological Control*. 11: 240-247.

Mitchell, J.I. and Zuccaro, A. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*. 20: 62-74.

Mnyone, L.L., Russell, T.L., Lyimo, I.N., Lwetoijera, D.W., Kirby, M.J. and Luz, C. 2009. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2: 1-4.

Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B. and Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research*. 98: 322-328.

Pantou, M.P., Mavridou, A. and Typas, M.A. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the

เอกสารนี้ complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genetics and Biology*. 38: 159-174.
- Peng, G., Wang, Z., Yin, Y., Zeng, D. and Xia, Y. 2008. Field trials of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Ascomycota: Hypocreales) against oriental migratory locusts, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen) in Northern China. *Crop Protection*. 27: 1244-1250.
- Petch, T. 1931. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 16: 55-75.
- Petch, T. 1935. Notes on entomogenous fungi. *Transactions of the British Mycological Society*. 19: 161-194.
- Pipe, N.D., Chandler, D., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*. 99: 485-491.
- Poprawski, T.J., Marchal, M. and Robert, P.H. 1985. Comparative susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* and *Sitona lineatus* (Coleoptera: Curculionidae) early stages to five entomopathogenic hyphomycetes. *Environmental Entomology*. 14: 247-253.
- Radha, K., Nirula, K.K. and Menon, K.P.V. 1956. The green muscadine disease of *Oryctes rhinoceros* L. II. The causal organism. *Indian Coconut Journal*. 9: 83-89.
- Rakotonirainy, M.S., Cariou, M.L., Brygoo, Y. and Riba, G. 1994. Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. *Mycological Research*. 98: 225-230.
- Roberts, D.W. 1981. Toxins of entomopathogenic fungi. In: Bruges, H.D, editor. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. London: Academic Press. pp. 441-464.
- Roberts, D.W. and St. Lager, R. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*. 54: 1-70.
- Rombach, M.C., Humber, R.A. and Roberts, D.W. 1986. *Metarhizium flavoviride* var. *minus*, var. nov., a pathogen of plant-and leafhoppers on rice in the Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon*. 27: 87-92.
- Rombach, M.C., Humber, R.A. and Evans, H.C. 1987. *Metarhizium album*, a fungal pathogen of leaf-and planthoppers. *Transactions of the British Mycological Society*. 88: 451-459.

- Shah, P.A., Gbongboui, C., Godonou, I., Hossou, A. and Lomer, C.J. 1998. Natural incidence of *Metarhizium flavoviride* infection in two grasshopper communities in northern Benin. *Biocontrol Science and Technology*. 8: 335-344.
- Small, C.N., Donaldson, N. and Bidochka, M.J. 2004. Nucleotide sequence variation does not relate to differences in kinetic properties of neutral trehalase from the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Current Microbiology*. 48: 428-434.
- Soares, G.G., Marchal, M. and Ferron, P. 1983. Susceptibility of *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) larvae to *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) at two different temperatures. *Environmental Entomology*. 12: 1886-1890.
- Sorokin, N. 1883. Plant parasites of man and animals of infectious diseases. *Journal of Military Medicine (First Supplement)*. 2: 268-293. (In Russian).
- St. Leger, R.J., May, B., Allee, L.L., Frank, D.C., Staples, R.C. and Roberts, D.W. 1992. Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 60: 89-101.
- Sun, B.D. and Liu, X.Z. 2008. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Applied Soil Ecology*. 39: 100-108.
- Tigano-Milani, M.S., Gomes, A.C.M.M., Sobral, B.W.S., 1995. Genetic variability among Brazilian isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 65: 206-210.
- Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 66: 407-411.
- Velásquez, V.B., Cárcamo, M.P., Meriño, C.R. and Iglesias, A.F. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology*. 30: 89-99.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White,

- T.J., editor. In PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press. New York. pp. 315-322.
- Welling, M., Nachtigall, G. and Zimmermann, G. 1994. *Metarhizium* spp. isolates from Madagascar: morphology and effect of high temperature on growth and infectivity to the migratory locust, *Locusta migratoria*. Entomophaga, 39: 351-361.
- Yang, Y., Cai, S., Zheng, Y., Lu, X., Xu, X. and Han, Y. 2009. *Metarhizium taii* var. *chongqingensis* nov., anamorph of *Cordyceps chongqingensis* sp. nov. isolated from a low altitude area in Chongqing, China. Current Microbiology, 58: 635-641.
- Yip, H., Rath, A. C. and Koen, T. B. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). Mycological Research, 96: 92-96.
- Yoon, C.S., Sung, G.H., Sung, J.M. and Lee, J.O. 1999. A molecular marker specific to *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 9: 334-339.
- Zimmermann, G. 2007. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology, 17: 879-920.
- [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Swainsonine.png>
- [Online]. Available: <http://ma.lundberg.gu.se/cutter2/>
- [Online]. Available: <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/charnley.html>
- [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [Online]. Available: <http://www.newswit.com/news/2005-05-31>
- [Online]. Available: <http://www.invasive.org/hwa/images/Figure16.jpg>
- [Online]. Available: http://www.fermentek.co.il/cytochalasin_D.htm
- [Online]. Available: <http://www.regional.org.au/au/gcirc/3/139.htm>
- [Online]. Available: <http://www.thaibiocontrol.org/main.php?filename=Metarhizium>
- [Online]. Available: <http://www.thaigreenagro.com>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

รหัสไอโซเลตที่ขอความอนุเคราะห์

ศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติ ได้แก่ MA 011, MA 012, MA 014, MA 015 และ MA 017

กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ได้แก่ MA 001, MA 002, MA 003, MA 004, MA 007, MA 021, MA 022, MA 024, MA 025 และ MA 026 โดยมีรายละเอียดดังตารางภาคผนวกที่ 1

ตารางภาคผนวกที่ 1 รายละเอียดรหัสเดิมของไอโซเลตที่ขอความอนุเคราะห์

ไอโซเลต	รหัสเดิม	ไอโซเลต	รหัสเดิม
MA 001	M0	MA 015	กรมส่งเสริม
MA 002	M1	MA 017	แมลงหางหนีบ
MA 003	M 4	MA 021	M 2
MA 004	M 5	MA 022	M 3
MA 007	M 6	MA 024	M 7
MA 011	ปลวกในแปลงอ้อย	MA 025	M 8
MA 012	ด้วงหนวดยาวอ้อย	MA 026	M 9
MA 014	กาบงนบุรี		

อาหารเลี้ยงเชื้อราสกุล *Metarhizium*

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร potato dextrose agar (PDA) สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

potato	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง PDA สำเร็จรูป 39 กรัม ใส่ลงในน้ำก่ด้น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

potato	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง PDB สำเร็จรูป 24 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Dichloran-Glycerol (DG18) Agar สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
potassium dihydrogen phosphate	1.0	กรัมต่อลิตร
magnesium sulfate	0.5	กรัมต่อลิตร
dichloran	0.002	กรัมต่อลิตร
chloramphenicol	0.1	กรัมต่อลิตร
agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง DG 18 สำเร็จรูป 31.6 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 825 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเตาอบไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร sabouraud dextrose agar + chloramphenicol สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

dextrose	4.0	กรัมต่อลิตร
peptone mixture	10	กรัมต่อลิตร
chloramphenicol	0.05	กรัมต่อลิตร
bacteriological agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลสำเร็จรูป 65 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

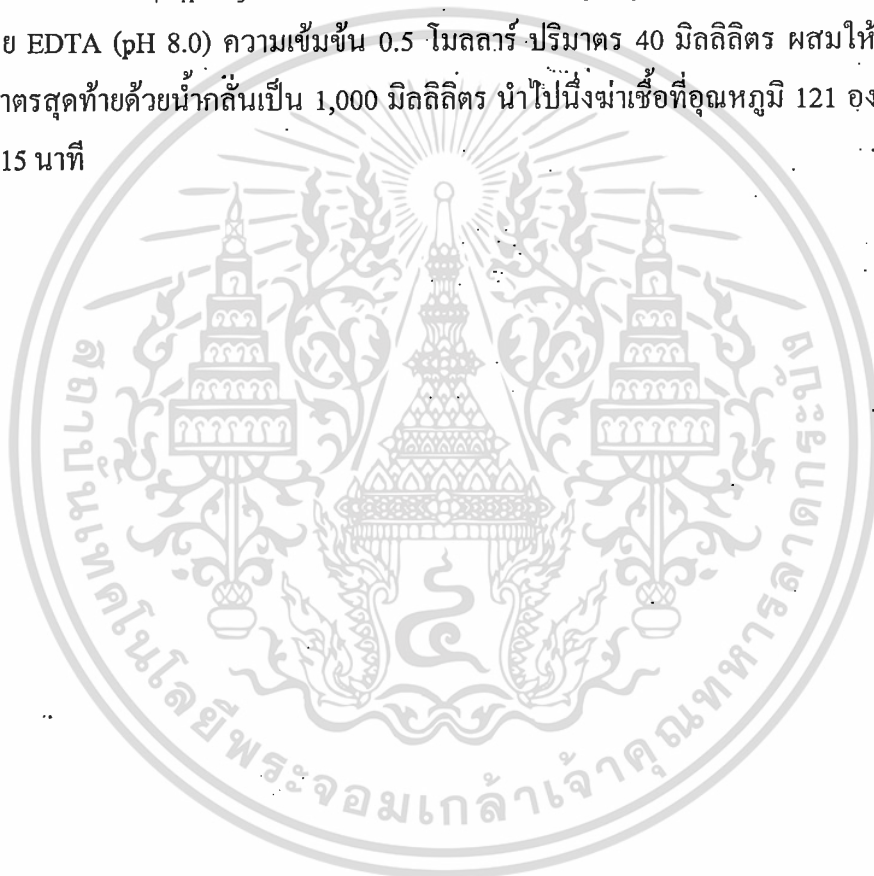
การเตรียมสารเคมี

สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)

ชั่ง EDTA 186.12 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่นประมาณ 600 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ magnetic bar จากนั้นปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.0 โดยใช้สารละลายกรด (HCL)-ด่าง (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10X TBE buffer

ชั่งผง Tris base ($C_4H_{11}NO_3$) 108 กรัม และ Boric acid (H_3BO_3) 55 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และเติมสารละลาย EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Morphological and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* from Thailand

Narumon Tangthirasunun^{1*}, Supattar Poeaim¹, Kasem Soyong², Pimpun Sommartya³ and Saowanit Popoonsak⁴

¹Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

³National Biological Control Research Center

⁴Biological Control Section, Entomology and Zoology Research Group, Department of Agriculture

Abstract: *Metarhizium anisopliae* is an important entomopathogenic fungus, distributed worldwide in the soil and exhibiting a wide range of insect host species. It is largely used for the biological control of agricultural pests. The objectives of this work were to isolate and identify variety of *Metarhizium anisopliae* mainly based on the morphological and molecular characteristics. We investigated 25 *Metarhizium anisopliae* isolates collected from different insect hosts and soil from forests or mountains of different sites in Thailand and one isolate collected from Philippines. These isolates have been partially characterized using morphological traits such as conidial size, colony or in conidial pigmentation and formation and color change media on Potato-dextrose-agar (PDA) at room temperature. Including, the ratio of width/height of the conidia for each isolate of measurements was calculated that were generated into three groups (low; 1: 2.1, medium; 1: 2.3-1: 2.9, height; > 1: 2.9). Molecular characterization, genomic DNA was extracted from fungal mycelium. Internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis was employed to identify genotypes. The ITS regions were amplified using the ITS1 and ITS4 primers that was a unique fragment of approximately 550 bp. The sequences were aligned using the ClustalW program and compared with those available in the GenBank/NCBI database for *M. anisopliae*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, other *Metarhizium* spp. and *Beauveria bassiana* sequences using the phylogeny software and phylogenetic trees constructed using the Neighbor-joining algorithm. Our study showed that *M. anisopliae*, *M. album* and *M. flavoviride* can be clearly differentiated and generated the 25 isolates into four main groups (Clades A, B, C and D). However, it is not clear difference between *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *majus* and most of them are related to *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Nevertheless, one group was phylogenetically and morphologically more distantly related when compared with *M. anisopliae*.

Acknowledgements: This work was supported by a grant of the National Research Council of Thailand and Faculty of Science, KMITL.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, genetic diversity, phylogenetic, internal transcribed spacers (ITS) regions

* Corresponding author: Narumon Tangthirasunun; e-mail: tonamsom@hotmail.com

Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand

Tangthirasunun, N.^{1*}, Poeaim, S.¹, Soyong, K.², Sommartya, P.³ and Popoonsak, S.⁴

¹Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

²Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL), Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.

³National Biological Control Research Center, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

⁴Biological Control Section, Entomology and Zoology Research Group, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand.

Tangthirasunun, N., Poeaim, S., Soyong, K., Sommartya, P. and Popoonsak, S. (2010). Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand. *Journal of Agricultural Technology* 6(2): xx-xx. Accepted for publication in April 2010.

Metarhizium anisopliae is an important entomopathogenic fungus that mainly used for the biological control. The objectives of this work were to isolate and identify varieties of *Metarhizium anisopliae* mainly based on the morphological and molecular characteristics. We investigated 24 *Metarhizium* isolates which collected from different insect hosts and soil from different sites in Thailand and one isolate was collected from the Philippines. These isolates have been partially characterized using morphological traits such as features of colony morphology, size and shape of conidia that were grown on Potato-dextrose-agar (PDA) at room temperature. Colony features could be separated into five groups. The length/width ratio of the conidia were calculated and generated into three groups: ≤ 2.18 is low ratio group, between 2.33 and 2.87 is medium ratio group and ≥ 2.91 is high ratio group. Internal transcribed spacer (ITS) and 5.8S DNA sequences analysis was employed to identify genotypes. The ITS regions were amplified using the ITS1 and ITS4 primers that was a unique fragment of approximately 550 bp. The sequences were aligned using the ClustalX program and compared with 19 isolates of *Metarhizium* available in the GenBank/NCBI database and 2 isolates *Beauveria bassiana* sequences as outgroup. Phylogenetic trees constructed using the Neighbor-joining algorithm in the Phylip package. Our study showed that *M. anisopliae*, *M. album*, *M. anisopliae* var. *acridum* and *M. flavoviride* can be clearly differentiated and generated the 25 isolates into four main groups (Clade B, C, E and F). However, it is not clearly difference between *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *majus* and most of them are related to *M. anisopliae* var. *anisopliae*. This study indicated that *M. anisopliae* are highly divergent. Nevertheless, most of *M. anisopliae* isolates from Thailand distantly related to *M. anisopliae* from other countries. It would be interesting to compare them using other molecular technique in the future.

Key words: *Metarhizium anisopliae*, Internal Transcribed Spacers (ITS) Regions

* Corresponding author: Tangthirasunun, N.; e-mail: tonamsom@hotmail.com

Introduction

An entomopathogenic fungus, *Metarhizium* is a genus of asexual stage (anamorph) which produces sexual stage (telomorph) namely *Cordyceps* sp. belongs to phylum Ascomycota. *Metarhizium anisopliae* is a well known as biological control agents of insect pests. *M. anisopliae* infects a wide range of insect orders and a broad geographical distribution (St. Leger *et al.*, 1992; Bidochka *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1997; Leal *et al.*, 1997; Driver *et al.*, 2000; Dong *et al.*, 2007). Traditionally, *Metarhizium* spp. has been classified based on its phenotypic characteristics as *M. anisopliae* and *M. flavoviride* (Tulloch, 1976). Including, *M. anisopliae* has been subdivided into two varieties (*M. anisopliae* var. *anisopliae* and var. *major*) based on the length of conidia. *M. anisopliae* var. *anisopliae* has smaller conidia (5.0 to 8.0 μm in length) than var. *major* (10.0 to 14.0 μm) (Tulloch, 1976), now referred to as *majus* (Rombach *et al.*, 1986).

Yip *et al.* (1992) used the ability to germinate at low temperatures (i.e. 5°C) of *M. anisopliae* var. *anisopliae* as *M. anisopliae* var. *frigidum*. Therefore, it is difficult to identify species or varieties based only on morphological characteristics that affected by environmental conditions. In recent years, molecular techniques have provided valuable insights into genetic relationships within and among species. So, morphological and molecular methods were used to identify and characterized *Metarhizium* species. For example, allozyme analysis (St. Leger *et al.*, 1992; Rakotonirainy *et al.*, 1994; Bridge *et al.*, 1993), Restriction Fragment Length Polymorphisms: RFLP (Bridge *et al.*, 1997; Pipe *et al.*, 1995; Mavridou and Typas, 1998), the nuclear ribosomal DNA (rDNA) sequence data comparisons (Rakotonirainy *et al.*, 1994; Curran *et al.*, 1994), Random Amplified Polymorphic DNA: RAPD (Cobb and Clarkson, 1993; Bidochka *et al.*, 1994; Leal *et al.*, 1994) and restriction analysis of the protease *Pr1* gene (Leal *et al.*, 1997). In the taxonomic revision of the *Metarhizium* spp., Driver *et al.* (2000) recognized ten distinct clades or lineage of organisms from 123 isolates based on internal transcribed spacer (ITS) regions, 5.8S rDNA and the D3 region of 28S (LSU) of rDNA. This study was divided into three species; *M. album*, *M. anisopliae* and *M. flavoviride* that represent nine varieties; *M. flavoviride* type E, *M. flavoviride* var. *flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum* and *M. anisopliae* var. *acridum*. However, it is not yet clearly understood because they did not comment on the positions and validity of *M. pingshaense*, *M. cylindrospora*, *M. guizhouense* and *M. taii* taxa from china. Furthermore, they were studied only one isolate from Thailand.

In the most recent with the advent of genetic profile, Bischoff *et al.* (2009) recognized nine distinct species, *M. anisopliae* that described as *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. guizhouense* (syn. *M. taii*), *M. pingshaense*, *M. acridum* stat. nov. (*M. anisopliae* var. *acridum*), *M. lepidiotae* stat. nov. (*M. anisopliae* var. *lepidiotae*), *M. majus* stat. nov. (*M. anisopliae* var. *major*), *M. globosum* sp. nov., *M. robertsii* sp. nov. and *M. brunneum*. However, there were non isolate from Thailand had been studied. In this study, we investigated both morphological and molecular analyses that based on ITS regions and 5.8S rDNA for *Metarhizium* that have been isolated and collected in Thailand.

Material and method

Fungal isolation and morphological characteristics

The 25 isolates of *Metarhizium* spp. were studied, 13 isolates from insects and 11 isolates from soils in different regions in Thailand, except TISTR 3158 isolate was obtained from soil in the Philippines. All fungal isolates studied are listed in Table 1. The fungi from insects were isolated from samples by incubating or streaking a sub-sample on surface of selective media (potato dextrose agar: PDA, Criterion, USA with 0.1% chloramphenicol and 0.05% cycloheximide). Soil samples were processed by diluting 10 g in 100 ml of sterile water that was added 0.01% Tween-80. One milliliter of the soil dilution was spread over those selective media. Then, single colony of *Metarhizium* spp. was transferred to PDA for purification. All were propagated and maintained with a 5 mm diameter mycelial plug taken from the growing edge of a 7 days old culture grown on PDA plates for 28 days at room temperature. The identification was done by observation of conidia, colony and mycelia morphology.

DNA extraction and amplifications

Mycelia and conidia from each isolate were plated on potato dextrose agar (PDA) and single spore colony was grown on potato dextrose broth (PDB), incubated on shaker (150 rpm) at room temperature for 5-7 days. Mycelium was recovered by centrifugation and filtration through Whatman No. 1 filter paper, washed twice with sterilized water, adding liquid nitrogen and ground until a powder mycelium was obtained. The powder was extracted by DNeasy Plant Mini Kit® (QIAGEN) following the manufacture's instructions and stored genomic DNA at 4 °C. The ITS1-5.8s-ITS2 region of rDNA was amplified using the universal primers, ITS 1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990).

Amplification reactions were performed at a total volume 25 μ l, consisted of template DNA, 200 μ Mol dNTPs, 0.8 pMol each primer, 10X PCR buffer and 1U *Taq* DNA polymerase (Biolabs, England). The condition of temperature in thermal cycling was one cycle of initial denaturation at 95 °C for 5 minutes, followed by 35 cycles with denaturation at 94 °C for 1 minute 30 seconds, annealing at 55 °C for 2 minutes, and extension at 72 °C for 3 minutes and a final extension at 72 °C for 5 minutes. PCR products were separated by electrophoresis in 1% agarose gels by comparison with 100 bp DNA Ladder. The PCR products were purified and then used directly for rDNA sequencing.

Phylogenetic analysis

All sequences were compared to others in GenBank using BLASTN and the best match recorded and selected. Two sequences of *Beauveria bassiana* were used as an outgroup. The entire DNA sequences of 25 *Metarhizium* spp. isolates from this study, 19 public sequences of *Metarhizium* spp. and *B. bassiana* from the GenBank database were edited within Bioedit version 7.0.5.2. The sequences were aligned using the ClustalX 1.83 software. The consensus trees were constructed using Consense program in the Phylip package version 3.6 with Neighbor-joining method by 1000 bootstrap resembling. Phylogenetic inferences were performed and exposed using TreeView 1.6.6.

Results and discussion

Identification of *Metarhizium* was done by observation of colony morphology, size and shape of conidia. The conidia are cylindrical with round ends which vary color from light green to dark green and the conidiophores are simple and branch by apical phialides produce conidia. Twenty-five isolates in this study, most common isolates were identified as *M. anisopliae*. Conidia color may differ in colony size and condition (Latch, 1964). The growth of colony was observed on PDA at room temperature (25-30 °C) for 28 days. Fungal colonies are initially white or creamy mycelium, becoming shades of yellow, shades of green/yellow to shades of dark green during sporulation. Most isolates are brightly dark green colony, except MA 017 is duller dark green.

Table 1. Morphological and phylogenetic clade of *Metarhizium* spp.

Isolates	Host	Geographic Origin	Conidia size (μm)		Length/Width Ratio	Conidia Ratio	Morphology Group	Clade
			Width	Length				
			Mean	Mean				
MA001	Coleoptera	Nakhonratchasima	3.34	7.29	2.18	Low	3	C
MA002	Coleoptera	Bangkok	2.96	8.62	2.91	High	5	F
MA003	Coleoptera	Samutprakan	2.60	9.10	3.49	High	5	F
MA007	Coleoptera	Nakhonsawan	3.73	10.26	2.75	Medium	1	B
MA011	Isoptera	Suphanburi	3.22	9.36	2.91	High	2	B
MA012	Coleoptera	Khonkaen	3.10	9.75	3.15	High	1	B
MA014	Coleoptera	Kanchanaburi	3.33	9.10	2.73	Medium	1	B
MA015	Coleoptera	Not available	3.56	9.50	2.67	Medium	2	B
MA017	Dermaptera	Nakhonratchasima	3.50	9.22	2.64	Medium	4	E
MA018	Coleoptera	Kanchanaburi	3.18	9.15	2.87	Medium	2	B
MA019	Coleoptera	Kanchanaburi	3.39	9.72	2.87	Medium	1	B
MA025	Coleoptera	Prachuapkhirikhan	2.92	9.42	3.23	High	3	F
MA026	Coleoptera	Prachuapkhirikhan	2.90	9.17	3.17	High	3	F
TISTR 3158	Soil	Philippines	2.28	6.21	2.73	Medium	3	E
TISTR 3607	Soil	Thailand	2.35	5.12	2.18	Low	3	C
SEC04	Soil	Chanthaburi	2.26	6.37	2.82	Medium	3	F
SED07	Soil	Sakaeo	2.29	5.32	2.33	Medium	3	C
SNA01	Soil	Maehongson	2.25	6.75	3.00	High	5	F
SNB02	Soil	Chiangmai	3.85	10.77	2.80	Medium	3	C
SNB03	Soil	Chiangmai	2.42	5.85	2.42	Medium	5	F
SNB07	Soil	Chiangmai	3.04	9.01	2.96	High	5	F
SNB08	Soil	Chiangmai	3.50	10.23	2.92	High	5	F
SNEB17	Soil	Nakhonratchasima	2.39	6.30	2.64	Medium	3	F
SNEB18	Soil	Nakhonratchasima	2.06	6.41	3.11	High	3	E
SWC03	Soil	Prachuapkhirikhan	3.00	8.80	2.94	High	3	E

Morphological features of colonies were studied and could be separated into five groups on the basic of colony color and surface. The surface layer of the group 1 (MA 007, MA 012, MA 014, MA 019 and SWC 03) colony is flat and mycelium is smooth. Colonies have green/yellow pigmented within 4-5

days and came to brighter dark green and conidia showing zonation (Fig. 1A). Group 2 (MA 011, MA 015 and MA 018) colony is similar to group 1 except the color of media is shades of light yellow (Fig. 1B). The most common are group 3 (MA 001, MA 026, SEC 04, SED 07, SNEB 17, SNEB 18, SNB 02, TISTR 3158 and TISTR 3607) that colony is flat, conidia are medium size and showing both zonation and non-zonation (Fig. 1C). Group 4 are MA 017 and MA 025 similarity to group 3 but conidia mass like a mat (Fig. 1D). The last group (MA 002, MA 003, SNA 01, SNB 03, SNB 07 and SNB 08) showed differ from the others, because the colonies are not smooth, but mycelia upright as aerial mycelia, and the media color is yellow to orange (Fig. 1E).

Morphology of conidia in PDA under bright field light microscope showed cylindrical shapes and usually light green in color and string together (Fig. 2A-C). Those demonstrate overlap in ranges of conidia sizes; length and width of 40 conidia per isolate were measured and presented in table 1. Conidia sizes were varied from the width of 1.40 μm (TISTR 3158) to 4.75 μm (MA 007) and length 4.10 μm (TISTR 3607) to 12.59 μm (MA 019). The width of conidia ranged from 2.06 to 3.73 μm and the length of conidia ranged from 5.12 to 10.77 μm . This is similar to Riba *et al.* (1986) and Yip *et al.* (1992) who reported conidia dimension of *M. anisopliae*. Length/width ratio of the conidia was calculated and divided into three groups: isolates with length/width ratio ≤ 2.18 is low ratio group (Example; MA 001: Fig. 2A), isolates with length/width ratio between 2.33 and 2.87 is medium ratio group (Ex.; MA 018: Fig. 2B), and isolates with length/width ratio ≥ 2.91 is high ratio group (Ex.; MA 026: Fig. 2 C, Table 1).

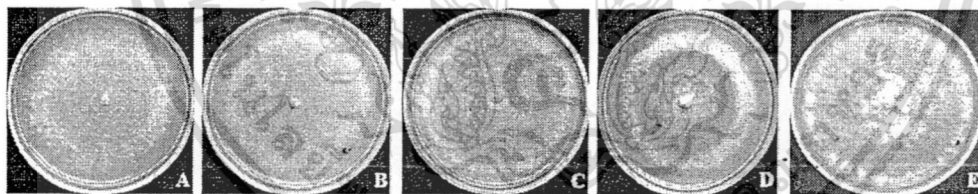


Fig. 1. *Metarhizium* colonies were grown on PDA at room temperature. Colony from group 1; MA 012 (A), group 2; MA 011 (B), group 3; SNEB 17 (C), group 4; MA 017 (D) and group 5; SNA 01 (E).

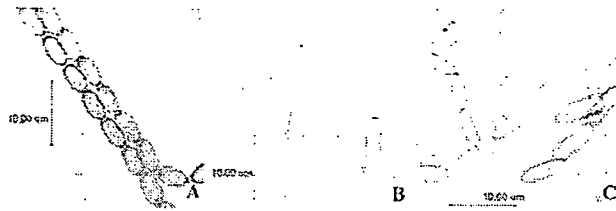


Fig. 2. The morphology of conidia under bright field light microscope (40X). Example image in low ratio group: MA001 (A), medium ratio group: MA018 (B) and high ratio group: MA026 (C).

The ITS regions and 5.8S rDNA of *Metarhizium* were amplified using the ITS1 and ITS4 primers that was a unique fragment of approximately 550 bp for all isolates. Destéfano *et al.* (2004) analyzed at the same region with 540 bp fragment for *M. anisopliae* var. *anisopliae* strain E9, B/Vi and C isolated in Brazil and 600 bp for *M. anisopliae* strain 14 isolates in Australia. The PCR products were sequenced and compared to others in GenBank using BlastN. Sequencing data conformed that all sample isolates are *M. anisopliae*. This study indicates that it is very similar that *M. anisopliae* is the predominant variety in this part of the world as stated by Roberts *et al.* (2004). Genetic distances between isolates are presented by branch length. Phylogenetic analysis showed other *Metarhizium* species or varieties and outgroup (*B. bassiana*) from GenBank can be separated clearly differentiated in clade A. The data support the monophyly of the *M. anisopliae* group except *M. anisopliae* var. *acridum*, and recognize five clades (clades B-F) within it. The isolates within clade A were subdivided into four groups with *B. bassiana*, *M. album*, *M. flavoviride* and *M. anisopliae* var. *acridum*. *M. album* and *M. flavoviride* are clearly distinguished from *M. anisopliae*. In this study, *M. anisopliae* var. *acridum* sequences were different from other *M. anisopliae* that was significantly supported by Diver *et al.* (2000) and Bischoff *et al.* (2009). Based on the results of morphological and molecular data, this study was confirmed by Bischoff *et al.* (2009) that the 5' region of EF-1 α is to date the most informative region to use for routine species identification with this genus. *M. anisopliae* var. *anisopliae* is pathogenic of innumerable insect variety. Whereas, *M. anisopliae* var. *acridum* is much more host specific only Orthoptera insects (Bridge *et al.*, 1997; Goettel and Jaronski, 1997; Milner *et al.*, 2002; Alston *et al.*, 2005). So, Bischoff and coworker (2009) were introduced *M. anisopliae* var. *acridum* to *M. acridum* stat. nov. species. This study confirms that rDNA sequence data can be used to resolve evolutionary relationships within *Metarhizium* that *M. anisopliae* separate evolutionary lines.

The dendrogram can be generated the 25 isolates into four main clades (clade B, C, E and F) (Fig 3). These works confirm the high variability of ITSs

and 5.8S rDNA within *M. anisopliae*. These results agree with Fegan *et al.* (1993) who found that *M. anisopliae* to be extremely diverse using RAPD. This study indicated that *M. anisopliae* are highly divergent, whereas MA 017, SNEB 18, SWC 03 and TISTR 3158 are closely related to isolates from other world regions than isolates from Thailand. Clade D and E contained isolates from elsewhere in the world, while the clade B, C and F contained only isolates from Thailand. However, Bootstrap resampling that used to estimate reliability of the tree shows less than 50% frequency. Despite their origin, the isolates collected from soil do not correlate together.

The most important taxonomic reviews of *Metarhizium* are the revisions by Tulloch (1976) and Rombach *et al.* (1986) that contains three species, *M. anisopliae*, *M. flavoviride* and *M. album*. *M. anisopliae* that was separated into two varieties; - *M. anisopliae* var. *anisopliae*; the short spored and *M. anisopliae* var. *major*; the long spored (Tulloch, 1976). Great diversity in *M. anisopliae* supports those of other workers using both biochemical and molecular markers (Fegan *et al.*, 1993; Mavridou and Typas, 1998; Diver *et al.*, 2000). Using biochemical profiles, Rombach *et al.* (1987) could distinguish groups of var. *anisopliae* more divergent than var. *majus*. Using allozyme profiles, St. Leger and coworker (1992) propose that *M. anisopliae* may be composed of at least five varieties. However, *M. anisopliae* was separated into 4 clades by RAPD-PCR method and sequence data from the ITS, 5.8S rDNA and 28S rDNA D3 regions: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, var. *major*, var. *acridum* and var. *lepidiotum* (Diver *et al.*, 2000).

Among these groups in this study, most of the isolates in clade B perfectly homogeneous group were highly differed from other *M. anisopliae*. Those differ from the others by their biological origin and colony pattern. The most isolates in clade B included of both of group 1 and 2 according to morphological characterization and showed medium conidia ratio. which isolated from insect hosts in order Coleoptera except MA 011 that host is order Isoptera (Table 1). Our result indicates that this group may correlate with insect host.

The four isolates in clade C was characterized only in group 3 according to morphological characterization. TISTR 3607 isolate was more closely related to MA 001 than the other, and clustered to SNB 02 and SED 07 that showed low conidia ratio.

The phylogenetic tree, clade D and E do not show a clear relationship between *M. anisopliae* var. *anisopliae* and *M. anisopliae* var. *majus* (*major*). *M. anisopliae* var. *majus* fell within range of genetic diversity of *M. anisopliae* var. *anisopliae* indicated that genetic relationship does not differences. *M. anisopliae* was divided into two varieties based on conidia size, short conidia (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) and long conidia (*M. anisopliae* var.

majus). In general the conidia of *M. anisopliae* var. *majus* are rarely less than 10 μm long and are usually 12-13 μm (Rombach *et al.*, 1986; Boucias and Pendland, 1998; Bischoff *et al.*, 2009). Nevertheless, DNA-based studies were placed *M. majus* separate group from *M. anisopliae* (Yoon *et al.*, 1999; Driver *et al.*, 2000). The delimitation of *M. majus* only conidia size without molecular data is difficult. However, ITS regions data can be divided the MA 017 isolate into clade E that more closely related to *M. anisopliae* var. *majus* (AY781690) in clade E than *M. anisopliae* var. *anisopliae*. So, that problem warrants further investigation. Additionally, clade E were obtained the samples from various regions. TISTR 3158 isolate originating in Philippines was distinguished from isolates from Thailand but closely related to isolate from the other worldwide. There was not clear by associated between the genetic and geographical distance separating the isolates.

Clade F, most isolates from soil were subdivided into two well-supported groups. The isolates in this clade were high conidia ratio as morphology in group 5. This clade was more closely related to *M. anisopliae* var. *anisopliae* in clade E than other clade which were remaining samples of *M. anisopliae* var. *anisopliae*. Pantou *et al.*, 2003 indicated that IGS region using primers Ma-IGSspF and Ma-IGSspR could be identified. These primers amplified only a partial sequence of the IGS region in *M. anisopliae* var. *anisopliae*, but which did not amplify in other species or varieties of *Metarhizium* spp. (Hughes *et al.*, 2004). From those data indicating that *M. anisopliae* may compose of at least five varieties (clade B-F). Clade B, C and F from Thailand were phylogenetically distantly related when compared to *M. anisopliae* from another country. Nevertheless, based on ITS regions, data did not provide sufficient resolution to clarify the relationships within isolate or variety.

Many researchers were interested in this fungus and many taxonomic studies were made because of their importance and potential in the biological control of pests. As the use of *M. anisopliae* as a biological control increases, a more adequate and accurate identification and separation of variety of *M. anisopliae* or genus *Metarhizium* become important to confirm species and to specify this fungus to colonize a specific insect host. Our data were revealed fundamental similarities between morphological and molecular groupings by morphological feature groups that correlated strongly with ITS and 5.8S rDNA sequence identity groups. The occurrence of *M. anisopliae* in Thailand is indicated that this fungus is an ubiquitous organism with a worldwide distribution and most of them more distantly related to *M. anisopliae* from other countries. For any line of *M. anisopliae* may include a variety of potential host insect species, sporulation, secondary metabolite as well as origin or source of collection. However, genetic materials may express distinguishing between the

isolates even similar in morphology. In contrast, morphological characteristics are generally complex and many involve genome expression. It is suggested that morphology and molecular phylogeny would be studied together to confirm identification of this fungus and their biological properties.

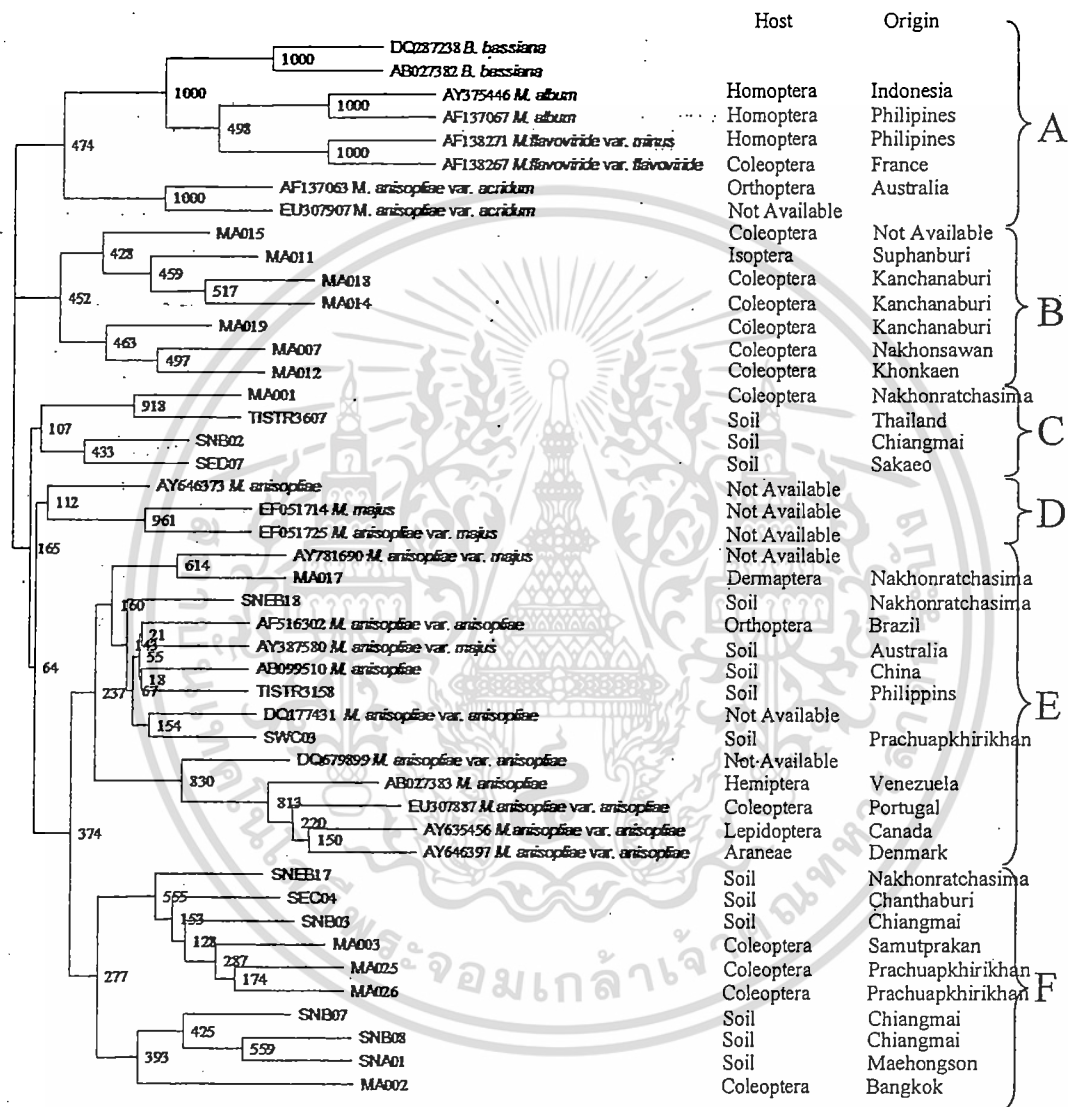


Fig. 3. Phylogenetic analysis on ITS regions and 5.8S of rDNA, 25 isolates of *Metarhizium* comparative with other isolates from GenBank using Neighbour-joining algorithm. Number on the branches represent 1,000 replicates of Bootstrap values.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Acknowledgements

This work was supported by a grant of the National Research Council of Thailand and Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. We are also grateful to National Biological Control Research Center, Biological Control Section (Entomology and Zoology Research Group) of Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives and Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) for providing the partial isolates of *Metarhizium* spp. We thank anonymous reviewers for their helpful comments on the manuscript.

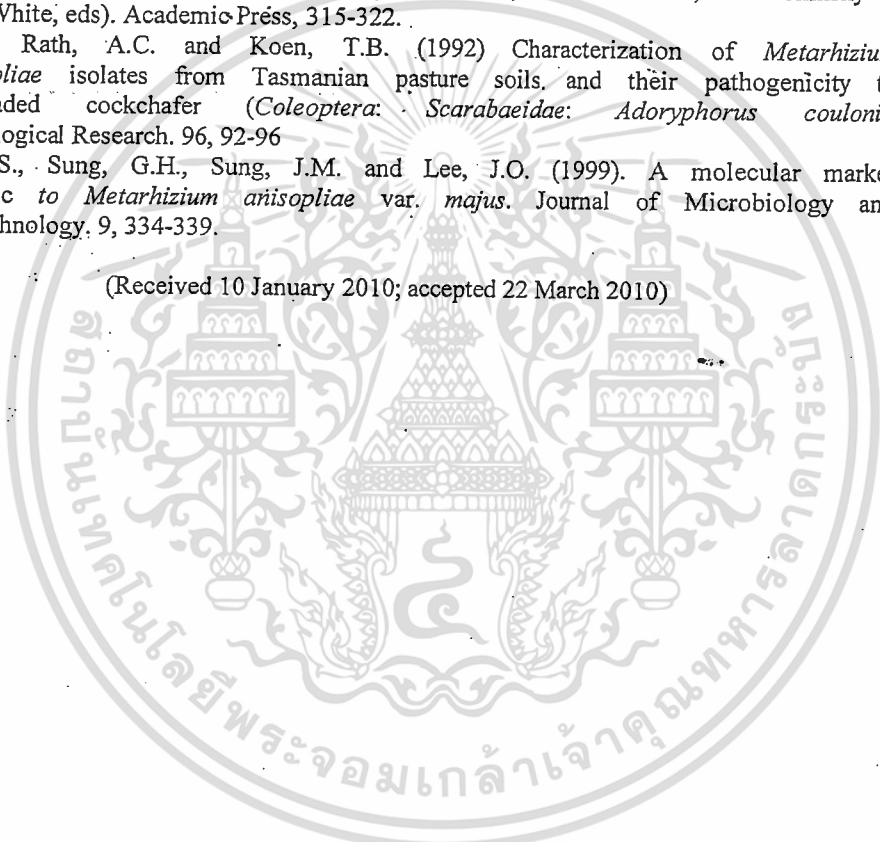
References

- Alston, D.G., Range, D.E.N., Lacey, L.A., Golez, H.G., Kim J.J. and Roberts D.W. (2005). Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*. 35, 163-171.
- Bidochka, M.J., McDonald, M.A., St. Leger, R.J. and Roberts, D.W. (1994). Differentiation of species and strains of entomopathogenic fungi by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Current Genetics*. 25, 107-113.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*. 101, 512-530.
- Boucias, D.G. and Pendland, J.C. (1998). *Principles of Insect Pathology*. Kluwer academic publisher. Boston.
- Bridge, P.D., Prior, C., Sogbohan, J., Lomer, C.M., Carey, M. and Buddie, A. (1997). Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshopper. *Biodiversity and Conservation*. 6, 177-189.
- Bridge, P.D., Williams, M.A.J., Prior, C. and Paterson, R.R.M. (1993). Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology* 139, 1163-1169.
- Cobb, B.D. and Clarkson, J.M. (1993). Detection of molecular variation in the insect pathogenic fungus *Metarhizium* using RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 112, 319-324.
- Curran, J., Driver, F., Ballard, J.W.O. and Milner, R.J. (1994). Phylogeny of *Metarhizium*: sequence analysis of the internally transcribed spacer and 5.8s region of the ribosomal DNA repeat. *Mycological Research*. 98, 547-552.
- Destéfano, R.H.R., Destéfano, S.A.L. and Messias, C.L. (2004). Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology*. 27, 245-252.
- Dong, C., Zhang, J., Chen, W., Huang, H. and Hu, Y. (2007). Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme, and phylogenetic analysis. *Microbiological Research*. 162, 53-61.
- Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 104, 134-150.
- Fegan, M., Manners, J.M., Maclean, D.J., Irwin, J.A.G., Samuels, K.D.Z., Holdom, D. G. and Li, D.P. (1993). Random amplified polymorphic DNA markers reveal a

- high degree of genetic diversity in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Journal of General Microbiology. 139, 2075-2081.
- Goettel, M.S. and Järónski, S.T. (1997). Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. Memoirs of the Entomological Society of Canada. 171, 83-99.
- Hughes, W.O.H., Thomsen, L., Eilenberg, J. and Boomsma, J.J. (2004). Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology. 85, 46-53.
- Latch, G.C.M. (1964) *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin strains in New Zealand and their possible use for controlling pasture inhabiting insects. New Zealand Journal of Agricultural Research. 8, 384-396.
- Leal, S.C.M., Bertoli, D.J., Butt, T.M. and Peberdy, J.F. (1994). Characterization of isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by RAPD-PCR. Mycological Research. 98, 1077-1081.
- Leal, S.C.M., Bertoli D.J., Butt T.M., Carder J.H., Burrow P.R. and Peberdy T.M. (1997). Amplification and restriction endonuclease digestion of the *Pr1* gene for the detection and characterization of *Metarhizium* strain. Mycological Research. 101, 257-265.
- Mavridou, A. and Typas, M.A. (1998). Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. Mycological Research. 102, 1233-1241.
- Milner, R.J., Baker, G.L. and Cliff, A.D. (2002). Effect of parasitism by *Trichopsidea oestracea* Westwood (Diptera: Nemestrinidae) on the susceptibility of *Phaulacridium vittatum* (Sjostedt) (Orthoptera: Acrididae) to infection by *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver and Milner. Journal Entomology. 41, 82-87.
- Pantou, M.P., Mavridou, A. and Typas, M.A. (2003). IGS sequence variation, group-introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*; excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. Fungal Genetics and Biology. 38, 157-174.
- Pipe, N.D., Chandler, D., Bainbridge, B.W. and Heale, J.B. (1995). Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Mycological Research. 99, 485-491.
- Riba, G., Bouvier-Fourcade, I. and Caudal, A. (1986) Isozyme polymorphism in *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) entomogenous fungi. Mycopathologia. 96, 161-169.
- Rakotonirainy, M.S., Cariou, M.L., Brygoo, Y. and Riba, G. (1994). Phylogenetic relationships within the genus *Metarhizium* based on 28S rRNA sequences and isozyme comparison. Mycological Research. 98, 225-230.
- Roberts, D.W. and St Leger, R.J. 2004. *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. Advances in Applied Microbiology. 54, 1-70.
- Rombach, M.C., Humber, A.R. and Evans, H.C. (1987). *Metarhizium album*, a pathogen of leaf-and planthoppers of rice. Transactions of the British Mycological Society. 37, 37-45.

- Rombach, M.C., Humber, A.R. and Roberts, D.W. (1986). *Metarhizium flavoride* var. *minus* var. nov., a pathogen of plant- and leafhoppers on rice in Philippines and Solomon Islands. *Mycotaxon* 27, 87-92.
- St. Leger, R.J., May, B., Allee, L.L., Frank, D.C., Staples, R.C. and Roberts, D.W. (1992). Genetic differences in allozymes and in formation of infection structures among isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*. 60, 89-101.
- Tulloch, M. (1976). The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 66, 407-411.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, eds). Academic Press, 315-322.
- Yip, H., Rath, A.C. and Koen, T.B. (1992) Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils, and their pathogenicity to redheaded cockchafer (*Coleoptera: Scarabaeidae: Adoryphorus couloni*). *Mycological Research*. 96, 92-96
- Yoon, C.S., Sung, G.H., Sung, J.M. and Lee, J.O. (1999). A molecular marker specific to *Metarhizium anisopliae* var. *majus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9, 334-339.

(Received 10 January 2010; accepted 22 March 2010)



การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium*
โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS

Study on Morphological and Genetic of *Metarhizium* spp. using ITS Region Sequences

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์¹ สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม¹ เกษม สร้อยทอง² พิมพ์พรรณ สมมาตย์³ และเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์⁴
Narumon Tangthirasunun¹, Supattar Poeaim¹, Kasem Soyong², Pimpun Sommartya³ and Saowanit Popoonsak⁴

บทคัดย่อ

ศึกษาความหลากหลาย และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง จำนวน 14 ไอโซเลต โดยเทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บน Nuclear Ribosomal DNA (rDNA) ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ rDNA บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพร์เมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าทุกไอโซเลตมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* และ *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *Metarhizium anisopliae* ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ซึ่งสามารถจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในระดับสปีชีส์ได้

ABSTRACT

Genetic diversity and phylogenetic relationships within 14 isolates of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium* spp. has been investigated by PCR and nucleotide sequencing technique based on nuclear ribosomal DNA (rDNA). Amplification and sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) regions of rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) was performed using universal primers (ITS1 and ITS4). The PCR amplification of this region was detected a unique fragment of approximately 550 bp. The nucleotide sequences were analyzed against those of *Metarhizium* spp. and *Beauveria* spp. sequences from GenBank database using the ClustalX program and PHYLIP software for phylogenetic analysis. The neighbour-joining dendrogram was generated which provided more information on polymorphism. These data demonstrate the level of genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* that related with morphological data and ITS sequences are useful for the identification of *Metarhizium* spp. at the species level.

Key words: *Metarhizium* spp., Genetic Diversity, Phylogenetic Relationships, Internal Transcribed Spacers (ITS) Regions
N. Tangthirasunun: tonamsom@hotmail.com

¹ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Department of Applied Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

²ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง Department of Pest Management Technology, Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

³ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ National Biological Control Research Center

⁴กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

เชื้อราสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียว (Green Muscardine Fungi) เป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง (Entomopathogenic Fungi) (Bridge *et al.*, 1997; Milner *et al.*, 1998 และ Iskandarov *et al.*, 2006) ประกอบด้วยหลายชนิด (Species) หรือหลายสายพันธุ์ (Variety) เช่น *M. anisopliae*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *acidum*, *M. flavoviride*, *M. flavoviride* var. *minus* และ *M. album* เป็นต้น (Diver *et al.*, 2000 และ Pantou *et al.*, 2003) สามารถพบเชื้อรานี้ได้ตามธรรมชาติ โดยพบอยู่ในดิน และแมลงหรือหนอนต่างๆ ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological Control) (Zimmermann, 1993 และ Bidochka *et al.*, 2001)

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological) ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่สามารถสังเกตเห็นได้ในแต่ละชนิดนั้นมีความคล้ายคลึงกัน รวมทั้งลักษณะของโคโคนีสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะแวดล้อม และรูปทรงของโคโคนี (Conidia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน ดังเช่น Bridge และคณะ (1993) ที่ไม่สามารถแยกเชื้อรา *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* ออกจากกันได้ด้วยขนาดของโคโคนี จากปัญหาดังกล่าวจึงส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการป้องกันของเชื้อราสกุล *Metarhizium* และเพื่อให้การจำแนกถูกต้องอันจะเกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ควบคุมแมลงแบบจำเพาะเจาะจง จึงมีการใช้และพัฒนาเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular Genetic) เพื่อใช้ในการจำแนกและระบุชนิดเชื้อราสกุล *Metarhizium* เช่น เทคนิค Polymerase Chain Reaction: PCR (Pantou *et al.*, 2003 และ Entz *et al.*, 2005) เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP (Bridge *et al.*, 1993; Pipe *et al.*, 1995 และ Bidochka *et al.*, 2001) และเทคนิค DNA Sequencing เป็นต้น โดย ribosomal DNA (rDNA) เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา โดยเฉพาะบริเวณ Internal Transcribed Spacer: ITS (ITS1-5.8S-ITS2) (Curran *et al.*, 1994; Driver *et al.*, 2000; Pantou *et al.*, 2003; Ricardo *et al.*, 2004; Inglis *et al.*, 2008 และ Vivana *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความหลากหลาย (Variation) ทางพันธุกรรมสูง (Mitchell and Zuccaro, 2006) จึงสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และสามารถจำแนกความแตกต่างภายในสายพันธุ์ รวมทั้งไอโซเลตต่างๆ ที่มีความแตกต่างของแมลงที่อาศัย (Host) หรือถิ่นที่อยู่อาศัย (Geographic Origin) ได้ โดยจุดประสงค์ในการทดลองนี้เพื่อศึกษา และเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง การคัดแยก และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

รวบรวมเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากแหล่งต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 รวมทั้งหมด 14 ไอโซเลตมาจากกรมวิชาการเกษตร ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ และคัดแยกใหม่ ทำการเพาะเลี้ยง Single Spore แต่ละไอโซเลตบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) มีเฉพาะไอโซเลต MA 018 และ MA 019 ที่คัดแยกใหม่นั้น ผ่านการคัดแยกบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารคัดเลือก (PDA, Chloramphenicol 0.1 % และ Cyclohexamind 0.05 %) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 °C) เพิ่มปริมาณเชื้อ และเก็บรักษาเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในหลอดทดลองที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 4 °C และนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาในแต่ละไอโซเลต เช่น รูปร่างและขนาดของโคนิเดีย ลักษณะเส้นใยและสีโคโลนี และสีอาหาร เป็นต้น โดยทำการศึกษาลักษณะต่างๆ ของโคโลนีบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 1 เดือนที่อุณหภูมิห้อง และทำการวัดขนาดของโคนิเดียจำนวน 40 โคนิเดียต่อไอโซเลต นำมาหาค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error of mean : SE)

Table 1. Detail and approximate conidial size of *Metarhizium* spp. isolates from 14 isolates in this study.

Isolate	Source	Host	Province	Mean of conidia ± SE (µm)		Color of media	
				Wide	Long		
MA 001	กรมวิชาการเกษตร	-	-	3.34±0.07	7.34±0.12	เหลืองอมส้ม	
MA 002		แมลงดำหนาม	-	2.96±0.07	8.62±0.14	เหลืองอมส้ม	
MA 007		ด้วงหนวดยาวอ้อย	นครสวรรค์	3.73±0.08	10.29±0.15	ขาว	
MA 010	ศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีววิธีแห่งชาติ	ปลวก	-	3.37±0.07	9.53±0.13	ขาว	
MA 011		ปลวก	สุพรรณบุรี	3.22±0.07	9.38±0.11	เหลืองอมส้ม	
MA 012		ด้วงหนวดยาวอ้อย	ขอนแก่น	3.10±0.06	9.98±0.26	ขาว	
MA 013		ด้วงหมักผัก	-	3.19±0.08	9.26±0.15	เหลืองอมส้ม	
MA 014		ด้วงหนวดยาว	กาญจนบุรี	3.33±0.06	9.10±0.08	ขาว	
MA 015		-	-	3.52±0.07	9.50±0.10	เหลืองอมส้ม	
MA 016		-	-	3.41±0.08	9.12±0.12	เหลืองอมส้ม	
MA 017		แมลงหางหนีบ	นครราชสีมา	3.52±0.07	9.22±0.18	เหลืองอมส้ม	
MA 018		แปลงอ้อย	ด้วงหนวดยาวอ้อย	กาญจนบุรี	3.18±0.07	9.32±0.32	เหลืองอมส้ม
MA 019			ด้วงหนวดยาวอ้อย	กาญจนบุรี	3.39±0.06	9.72±0.16	ขาว
MA 022	กรมวิชาการเกษตร	-	-	3.37±0.07	9.26±0.11	เหลืองอมส้ม	

หมายเหตุ - = ไม่ทราบแหล่งที่มา

การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยง Single Spore ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลาประมาณ 3-5 วัน แยกเพลเลต (Pellet) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000-9,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที ล้างเพลเลตซ้ำ 2 รอบด้วยสารละลาย 25 mM EDTA, pH 8 ตามด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำเพลเลตมาบดโดยไนโตรเจนเหลว (Liquid Nitrogen) และสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit (บริษัท Qiagen®) โดยใช้วิธีการตามคู่มือของชุดสกัดดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพ และปริมาณ โดยใช้เทคนิค Agarose Gel

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Electrophoresis และการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 nm และ 280 nm นำค่ามาคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 4 °C

เทคนิค PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทุกไอโซเลตในบริเวณ rDNA ตำแหน่ง ITS ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990) ปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 ng ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 (Invitrogen) 1 μ l (0.8 μ M) Deoxynucleotide, dNTPs (Roche) 0.5 μ l (200 μ M) Taq DNA polymerase (Biolabs) 0.2 μ l (1 U) และ 10 X PCR Buffer (Biolabs) 2.5 μ l (1 X) นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ที่ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิขึ้นต่างๆ ดังนี้ ขั้น Initiation Denaturing อุณหภูมิ 95 °C 5 นาที 1 รอบ อุณหภูมิ 94 °C 1 นาที 30 วินาที อุณหภูมิ 60 °C 2 นาที อุณหภูมิ 72 °C 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น Final Elongation อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ PCR ดังกล่าวมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) และวิเคราะห์หาแผนภูมิความสัมพันธ์ (Phylogenetic Tree) เปรียบเทียบกับเชื้อราสกุล *Metarhizium* และเชื้อราสกุล *Beauveria* โดยโปรแกรม BioEdit, ClustalX 1.83 และ PHYLIP Software (Neighbor-joining method, NJ) ที่ค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000

ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ของทั้ง 14 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 1 เดือนพบว่าโคนิเดียเป็นทรงกระบอกหรือคล้ายเมล็ดข้าวสาร มีขนาดเฉลี่ยดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าโคนิเดียมีค่าเฉลี่ยรวม (กว้างxยาว) เท่ากับ $3.33 \pm 0.02 \times 9.26 \pm 0.05 \mu\text{m}$ สามารถแบ่งขนาดความยาวของโคนิเดียได้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มที่ 1 มีความยาวประมาณ 7 μm ได้แก่ MA 001 (รูปที่ 1 A) มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ $7.34 \pm 0.12 \mu\text{m}$ กลุ่มที่ 2 มีความยาวประมาณ 8 μm ซึ่งมี 1 ไอโซเลต คือ MA 002 (รูปที่ 1 B) มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ $8.62 \pm 0.14 \mu\text{m}$ และไอโซเลตอื่นๆ จัดเป็นกลุ่มที่ 3 ที่มีขนาดความยาวมากกว่า 9 μm เช่น MA 007 (รูปที่ 1 C) MA 010, MA 011 เป็นต้น โดยมีขนาดความยาวโคนิเดียทั้งหมดเฉลี่ยรวมประมาณ $9.47 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ส่วนลักษณะสีของโคนิเดียมีสีตั้งแต่เขียวเข้มถึงเขียวขี้ม้า สอดคล้องกับของสำรวจ (2526) และพิมลพร (2545) และลักษณะสีของอาหารเมื่อทำการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ สีอาหารไม่เปลี่ยนแปลงคือเป็นสีขาว (รูปที่ 2 C) ได้แก่ MA 007, MA 010, MA 012, MA 014 และ MA 019 และสีอาหารเปลี่ยนเป็นเหลืองอมส้ม (รูปที่ 2 B) ได้แก่ MA 001, MA 002, MA 011, MA 013, MA 015, MA 016, MA 017, MA 018 และ MA 022 และยังมีลักษณะอื่นๆ ที่แตกต่างอย่างเห็นได้อย่างชัดเจนใน 2 ไอโซเลต คือ MA 002 ที่มีเส้นใยฟูมาก (รูปที่ 2 A) และ MA 017 ที่มีสีของโคนิเดียเป็นสีเขียวเข้มเกาะแน่นรวมเป็นแผ่นเดียว (รูปที่ 2 D)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

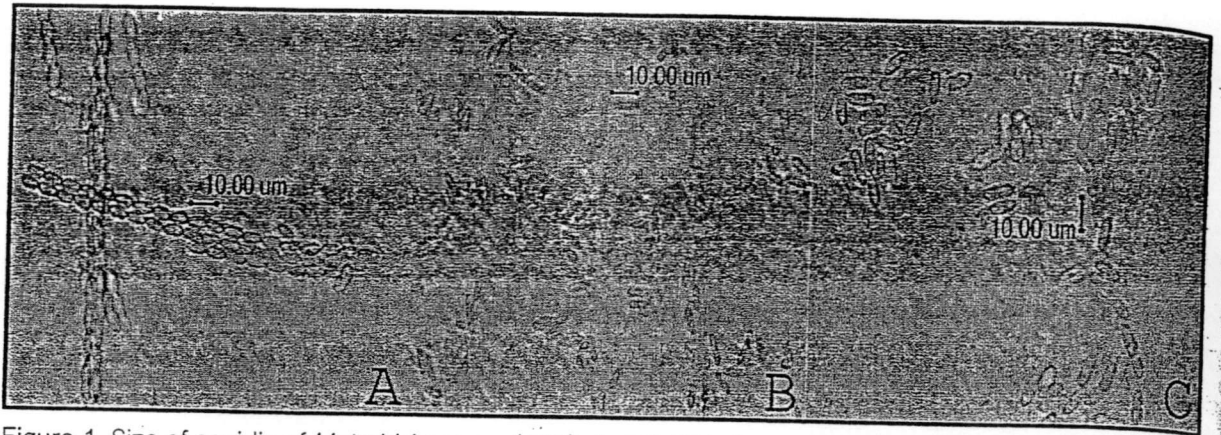


Figure 1. Size of conidia of *Metarhizium* spp. (40X); A: MA 001, B: MA 002 and C: MA 007

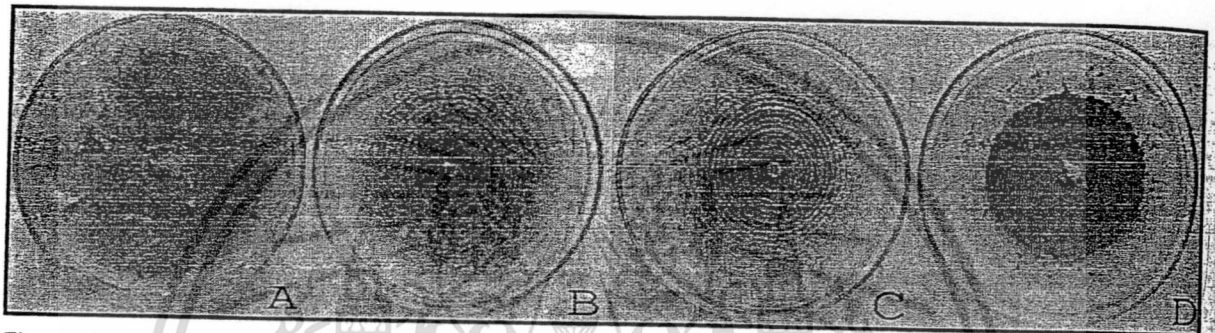


Figure 2. Morphological characterized of colony and media color of *Metarhizium* spp.; A: MA 002, B: MA 011, C: MA 014 and D: MA 017

การวิเคราะห์ทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล โดยเทคนิค PCR ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ในแต่ละไอโซเลต พบว่ามีขึ้นดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวประมาณ 550 คู่เบส สอดคล้องกับ Ricardo และคณะ (2004) ที่พบว่า *M. anisopliae* มีขนาดของขึ้นดีเอ็นเอประมาณ 540 คู่เบส เมื่อนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับ เชื้อราสกุล *Metarhizium* และเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ใช้เป็น Outgroup จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อหาแผนภูมิ ความสัมพันธ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (Clade) (รูปที่ 3) โดยกลุ่มที่ 1-3 เป็นเชื้อราสกุล *Metarhizium* 14 ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษา เชื้อรา *M. album* และเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* ไอโซเลตในกลุ่มที่ 1 ส่วนใหญ่มีลักษณะสีของอาหารสีเหลืองอมส้มยกเว้น MA 014 ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร ในกลุ่มที่ 2 ไอโซเลต ส่วนใหญ่ลักษณะสีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลงยกเว้น MA 013 อาจกล่าวได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ลักษณะหนึ่งคือการผลิตสาร Secondary Metabolite ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป และ กลุ่มที่ 3 ที่เป็นเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. album* โดยมี MA 001 MA 002 และ MA 017 รวมอยู่ ด้วย ซึ่งไอโซเลต MA 001 และ MA 002 นั้นมีความสัมพันธ์ที่แตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ สอดคล้องกับลักษณะ โคนินเดี่ยวที่มีขนาดเล็กแตกต่างออกไปซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิความสัมพันธ์ยกเว้น MA 017 ที่มีขนาดความยาวของ โคนินเดี่ยวไม่ต่างจากไอโซเลตในกลุ่มที่ 1 และ 2 แต่มีลักษณะโคนินเป็นสีเขียวเข้มเกาะแน่นรวมเป็นแผ่นเดียวแตกต่าง ออกจากไอโซเลตอื่นๆ ดังนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งสีของอาหาร ลักษณะของโคนิน และขนาดของโคนินเดี่ยวมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสำคัญมาก จากแผนภูมิความสัมพันธ์ไอโซเลต MA 014 และ MA 018 มีความใกล้เคียงกันมากนั้นมาจากแมลงชนิดเดียวกันและจังหวัดเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามไอโซเลต MA 018 และ MA 019 ที่มาจากแปลงอ้อยเดียวกันในจังหวัดกาญจนบุรี ยังมีความสัมพันธ์น้อยกว่า จึงยังไม่สามารถสรุปความสัมพันธ์ระหว่างถิ่นที่อยู่อาศัยได้ สำหรับกลุ่มอื่นๆ จากแผนภูมิความสัมพันธ์ที่จัดแยกออกจากไอโซเลตที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. flavoviride* และเชื้อราสกุล *Beauveria* (รูปที่ 3)

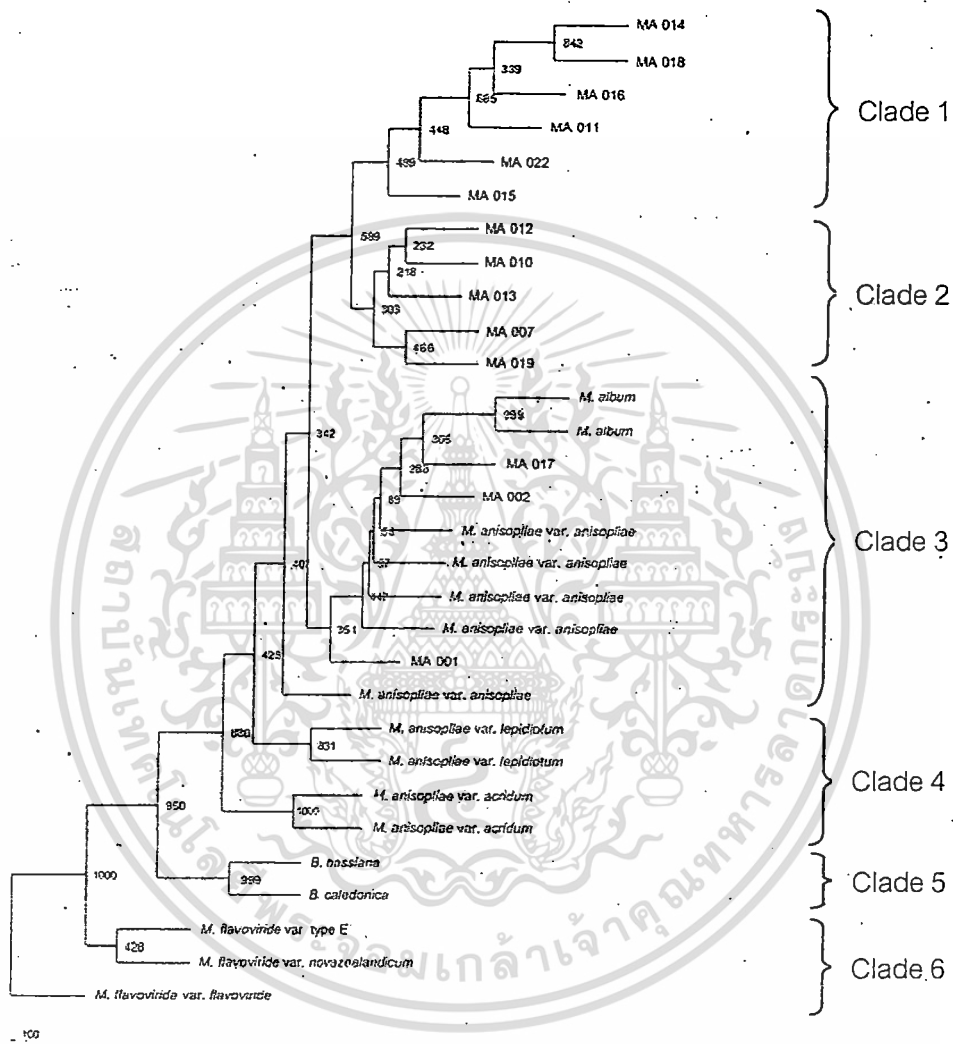


Figure 3. Phylogenetic trees is show the relationship of 14 isolates *Metarhizium* spp. in this study compared with other database of *Metarhizium* spp. and outgroup (*Beauveria* spp.) from GenBank. Bootstrap indexes are indicated above each branch node

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้ง 14 ไอโซเลตพบว่าขนาดของโคนิเดียมีขนาดแตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามความยาว คือ ขนาดเฉลี่ยประมาณ 7, 8 และมากกว่า 9 μm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่อแบ่งกลุ่มตามการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอจะมีทั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง (สีขาว) และมีการสร้างสารสี (สีเหลืองอมส้ม) ส่วนในการศึกษาทางพันธุกรรมโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ rDNA ตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าทุกไอโซเลตมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส และเมื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์เปรียบเทียบกับเชื้อราสกุล *Metarhizium* อื่นๆ โดยมี Outgroup เป็นเชื้อราสกุล *Beauveria* ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงเช่นเดียวกันจากฐานข้อมูล GenBank พบว่าสามารถแบ่งแผนภูมิความสัมพันธ์ได้ 6 กลุ่ม และไอโซเลตที่ศึกษาในครั้งนี้จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1-3 ที่มีเชื้อรา *M. album* และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* รวมอยู่ด้วย

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนทุนวิจัยในส่วนของงบประมาณ ประจำปี 2551 และทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องทำให้งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- พิมลพร นันทะ. 2545. ศัตรูธรรมชาติหัวใจของ IPM. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.
- สำรวจ ดอกไม้หอม และนรงค์ศักดิ์ โพธิ์ไพฑูรณ์. 2526. การใช้เชื้อราเขียวกำจัดด้วงแรดมะพร้าว. ราชบุรี. ฝ่ายป้องกันและกำจัดศัตรูพืช สำนักงานส่งเสริมการเกษตรภาคตะวันตก.
- Bidochka, M.J., A.M. Kamp, T.M. Lavender, J. Dekoning, and J.N.A. De Croos. 2001. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1335-1342.
- Bridge, P.D., C. Prior, J. Sogbohan, C.M. Lomer, M. Carey, and A. Buddie. 1997. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. *Biodiversity and Conservation* 6: 177-189.
- Bridge, P.D., M.A.J. Williams, C. Prior, and R.R.M. Paterson. 1993. Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology* 13: 1163-1169.
- Curran J., F. Driver, J.W.O. Ballard, and J. Milner. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological research* 98: 547-552.
- Driver, F., R.J. Milner, and J.W.H. Trueman. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological research* 104: 134-150.
- Entz, S.C., D.L. Johnson, and L.M., Kawchuk. 2005. Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Mycological research* 109: 1302-1312.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gillespie, A.T., and N. Claydon. 1989. The use of entomopathogenic fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science* 27: 203-215.
- Inglis, G.D., G.M. Duke, M.S. Goettel, and J.T. Kabaluk. 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *Journal of Invertebrate Pathology* 98: 101-113.
- Iskandarov, U.S., A.G. Guzalova, and K.D. Davranov. 2006. Effects of nutrient medium composition and temperature on the germination of conidia and the entomopathogenic activity of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 42: 72-76.
- Milner, R.J., J.A. Staples, and G.G. Lutton. 1998. The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological control* 11: 240-247.
- Mitchell, J.I., and A. Zuccaro. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20: 62-74.
- Pantou, M.P., A. Mavridou, and M.A. Typas. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent tools for isolate detection and phylogenetic analysis. *Fungal Genetics and Biology* 38: 159-174.
- Pipe, N.D., D. Chandler, B.W. Bainbridge, and J.B. Heale. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in the ribosomal RNA gene complex of isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Mycological research* 99: 485-491.
- Ricardo, H.R.D., A.L.D. Suzete, and L.M. Claudio. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetics and Molecular Biology* 27: 245-252.
- Viviana, B.V., P.C. Mario, R.M. Carmen, A.F. Iglesias, and F.D. Jorge. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genetics and Molecular Biology* 30: 89-99.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic, San Diego: 315-322.
- Zimmermann G. 1993. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Journal of Pesticide Science* 37: 375-379.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้