

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจำแนกเชื้อราโรคแมลงบางชนิด

Identification of some entomopathogenic fungi



นางสาวภิญญ์พีรยา อัครนาเกษม  
นางสาวธนาภรณ์ อินทพิชัย  
นายอักรเศรษฐ์ หัตถาภรณ์

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน 117252  
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ค. 2554

b. 123456789  
i. ....

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ปีการศึกษา 2553  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# IDENTIFICATION OF SOME ENTOMOPHATOGENIC FUNGI

PHINPEERAYA AUTSAWATHANAGASEAM  
THANAPORN INTHAPICHAJ  
AKARASATE HUTTAPORN



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
IN BIOTECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและที่ยังคงอยู่ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
**ACADEMIC YEAR 2010**

หัวข้อโครงการพิเศษ      การจำแนกเชื้อราโรคแมลงบางชนิด  
 Identification of some entomopathogenic fungi



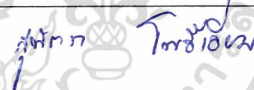
ชื่อนักศึกษา                    นางสาว ภิญญาพีรยา    อิศวธนาเกษม    รหัสนักศึกษา 50050699  
     นางสาว ธนาภรณ์       อินทพิชัย       รหัสนักศึกษา 50050720  
     นาย อัครเศรษฐ์       หัตถาภรณ์       รหัสนักศึกษา 50050785

ปริญญา                            วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา                        เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา                ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้  
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา  
 เทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2553

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อุ๋นเรื่อน เพชรวัลย์	
ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	



(รศ.ดร.นวลพรรณ ธีระนอง)  
 ประธานสาขาวิชาชีววิทยา

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษานานับ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การจำแนกเชื้อราโรคแมลงบางชนิด Identification of some entomopathogenic fungi
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ภิญญ์พีรยา อัสวธนาเกษม รหัสนักศึกษา 50050699 นางสาว ธนาภรณ์ อินทพิชัย รหัสนักศึกษา 50050720 นาย อัครเศรษฐ์ หัตถาภรณ์ รหัสนักศึกษา 50050785
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2553
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม

### บทคัดย่อ

ในการบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 10 ไอโซเลต ด้วยการวิเคราะห์ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุล โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร potato-dextrose-agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้เพียง 8 ไอโซเลต เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางลักษณะ โดยศึกษาลักษณะของโคโลนี ขนาดและรูปร่างของโคโลนีเดียว และการเกิดผลึก สามารถบ่งชี้ได้ 4 สกุล คือ สกุล *Lecanicillium* (ไอโซเลต A, B, C และ H) สกุล *Isaria* (ไอโซเลต D และ K) สกุล *Paecilomyces* (ไอโซเลต J) และไม่สามารถบ่งชี้สกุลได้อีก 1 ไอโซเลต คือ I สำหรับการศึกษาระดับโมเลกุล โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 หรือ PN3/PN16 พบว่าไอโซเลต D, J และ I ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 หรือ PN3/PN16 ส่วนไอโซเลต A และ B เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และไอโซเลต C, H และ K เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยไพรเมอร์ PN3/PN16 เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 มาจัดเรียงโดยใช้โปรแกรม ClustalX ซึ่งได้นำลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank มาวิเคราะห์ร่วมกัน และสร้างแผนภูมิกวามสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ Neighbor-joining algorithm ในชุดโปรแกรม Phylip สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ โดยไอโซเลต A, B, C และ H แสดงความสัมพันธ์กับสกุล *Lecanicillium* แต่อย่างไรก็ตาม มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนระหว่างในกลุ่มที่ 1 (ไอโซเลต A, B และ C) และกลุ่มที่ 3 (ไอโซเลต H) ซึ่งกลุ่มที่ 2 (ไอโซเลต D และ K) มีความสัมพันธ์กับสกุล *Isaria* ทั้งนี้กลุ่ม 1 และ กลุ่ม 3 เป็นสกุลเดียวกัน จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยใช้เทคนิคระดับโมเลกุลอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่อาจถือได้ว่าเป็นสาเหตุโรคในแมลง, ITS1-5.8S-ITS2, สกุล *Lecanicillium* ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Identification of some entomopathogenic fungi		
<b>Students</b>	Miss Phinpeeraya Autsawathanagaseam	Student ID	50050699
	Miss Thanaporn Inthapichai	Student ID	50050720
	Mrs. Akarasate Huttaporn	Student ID	50050785
<b>Degree</b>	Bachelor of Science		
<b>Major Program</b>	Biotechnology		
<b>Academic Year</b>	2010		
<b>Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Supattra Poeaim		

### Abstract

Ten isolates of entomopathogenic fungi were identified using morphology and molecular analysis. Only 8 isolates were grown on potato-dextrose-agar (PDA) medium at 25 °C. These isolates have been partially characterized using morphological traits such as features of colony morphology, size and shape of conidia as well as crystallization. Morphological characters could be separated into four genera. These were: *Lecanicillium* sp. (isolate A, B, C and H); *Isaria* sp. (isolate D and K); *Paecilomyces* sp. (isolate J) and isolate I can't identify. For molecular characteristic, ITS1/ITS4 and PN3/PN16 primers were used to PCR amplify the internal transcribed spacer (ITS) regions ITS1 and ITS2, along with the central 5.8S rDNA. However, those primers failed to amplify reproducible products from the isolates D, J and I. Isolates A and B were amplified with primers ITS1/ITS4 and isolate C, H and K were amplified with primers PN3/PN16. The ITS1-5.8S-ITS2 gene sequences were aligned with ClustalX. Selected sequences available from GenBank were also included in the analysis. Phylogenetic trees constructed using the Neighbor-joining algorithm in the Phylip package. Those sequences can be generated into three main groups. Isolates A, B, C and H were associated with *Lecanicillium* sp. However, it is clearly difference between group 1 (isolates A, B and C) and group 3 (isolate H). Group 2 (isolates D and K) were related to *Isaria* sp. Nevertheless, group 1 and 3 would be interesting to compare them using other molecular technique in the future.

**Keywords:** Entomopathogenic fungi, ITS1-5.8S-ITS2, *Lecanicillium* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาสละเวลา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความรู้ ตลอดการทำโครงการพิเศษ ผศ.ดร.อุ๋นเรื่อน เพชราวัดย์ ประธานกรรมการ การสอบ และ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม กรรมการการสอบ

ขอขอบพระคุณ ดร.เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ นักกวีวิทยาชำนาญการ กลุ่มงานวิจัยการปราบ ศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มวิจัยกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ อาจารย์ พี เพื่อน และน้อง ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือสนับสนุนมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของพวกเขาเข้าอย่างสูง ที่ให้ โอกาสทางการศึกษาอันมีค่ายิ่ง ให้กำลังใจและให้คำปรึกษาแนะนำ

ภิญญ์พีรยา อิศวธนาเกษม  
ธนาภรณ์ อินทพิชัย  
อัครเศรษฐ์ หัตถาภรณ์  
มีนาคม 2554

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	3
2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง	3
2.1.1 ลักษณะการพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง	3
2.1.2 การจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง	5
2.2 หลักการของเทคนิคพีซีอาร์	7
2.3 การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต	8
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย</b>	14
3.1 สารเคมี อุปกรณ์ และเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา	14
3.1.1 สารเคมี	14
3.1.2 อุปกรณ์	14
3.1.3 ตัวอย่างเชื้อราที่นำมาใช้ในการศึกษา	15
3.2 วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์	15
3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	16
3.3.1 ลักษณะโคโลนีและสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ	16
3.3.2 ลักษณะเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์	16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3</b> วิธีการดำเนินงานวิจัย (ต่อ)	
3.4 การศึกษาด้วยเทคนิคระดับ โมเลกุล	16
3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	16
3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์	17
3.4.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	17
<b>บทที่ 4</b> ผลการวิจัยและอภิปรายผล	19
4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา	19
4.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคระดับ โมเลกุล	33
4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์	33
4.2.2 ผลการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	34
<b>บทที่ 5</b> สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	แสดงรายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	18
4.1	แสดงค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของความกว้างและความยาวของโคไนเดียมของแต่ละไอโซเลต	29
4.2	แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลต	30
4.3	สรุปผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในแต่ละกลุ่ม	31
4.4	แสดงสกุลของเชื้อราในแต่ละไอโซเลต	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

ภาพที่	หน้า	
2.1	แสดงลักษณะของ <i>Ophiocordyceps myrmecophila</i> ที่เข้าทำลายมวน	4
2.2	แสดงลักษณะของ <i>Ophiocordyceps unilateralis</i> ที่เข้าทำลายมด	5
2.3	แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล <i>Beauveria</i>	5
2.4	แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล <i>Peecilomyces</i>	6
2.5	แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล <i>Verticillium</i>	6
2.6	แสดงหลักการของเทคนิคพีซีอาร์	8
2.7	แสดงการจัดเรียงตัวของบริเวณต่างๆ บน rDNA	9
2.8	แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs	10
4.1	แสดงรูปร่างผลึก; A: ลักษณะผลึกของไอโซเลต A, B และ C; B: ลักษณะผลึกของไอโซเลต H	21
4.2	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต A; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	21
4.3	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต B; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	22
4.4	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต C; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	23
4.5	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต D; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	24
4.6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต H; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	25
4.7	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต I; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
4.8	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต J; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย	27
4.9	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต K; A: ลักษณะโคโลนี ด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย	28
4.10	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	34
4.11	แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา 5 ไอโซเลต (ไอโซเลต A, B, C, H และ K) เมื่อเปรียบเทียบกับ ตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม และในการทำการเกษตรก็จะมีปัญหาเรื่องแมลงศัตรูพืช ซึ่งทำให้ผลผลิตเกิดความเสียหายและได้ผลผลิตลดลง จึงมีการใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงศัตรูพืช แต่ในปัจจุบันคนไทยเริ่มหันมาให้ความสนใจในเรื่องสุขภาพมากขึ้น จึงมีการณรงค์เรื่องการงดใช้สารเคมีในการกำจัดแมลงศัตรูพืช และได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง เพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมี ตัวอย่างเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงที่นำมาใช้ เช่น *Beauveria* sp., *Lecanicillium* sp., *Cordyceps* sp., *Isaria* sp. และ *Verticillium* sp. เป็นต้น และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่อยู่ในเขตร้อนชื้นที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ซึ่งนับได้ว่าประเทศไทยเป็นแหล่งรวมสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพมากที่สุดแห่งหนึ่งของโลก ดังนั้นประเทศไทยจึงเหมาะแก่การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคนแมลง เช่น ได้มีการพบ *Hymenostilbe ventricosa* ซึ่งเป็นเชื้อราที่พบในตัวอ่อนของแมลงสาบที่ติดอยู่กับใบไม้ในป่าของประเทศไทย (Hywel-Jones, 1995a) *Cordyceps sphecocephala* และ *Hymenstilbe* sp. ที่พบได้จากแมลงที่อยู่ในอันดับ Hymenoptera เช่น ตัวต่อ และ ผึ้ง เป็นต้น ที่พบบริเวณป่าในเมืองไทย (Hywel-Jones, 1995b) และ *Torrubiella petchii* เป็นเชื้อราที่พบในเปลือกหอยซึ่งเป็นแมลงที่รบกวนใบไม้ในป่าเขตร้อน ณ อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ (Hywel-Jones, 1997)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคนแมลงมากขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น ทางด้านเกษตรกรรม ได้มีการศึกษาการสร้างสารออกฤทธิ์ที่อาจยับยั้งเชื้อที่ก่อโรคนในมนุษย์โดยได้มีการค้นพบสารที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนในหลอดทดลอง เช่น เชื้อวัณโรคน และ มาลาเรีย เป็นต้น ทางด้านการเกษตรนำไปใช้เป็นสารปราบแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมี (<http://www.biotech.or.th/TH/images/stories/IU/document/8/6.pdf>) และทางด้านการแพทย์ ได้มีนำไปผลิตเป็นวัสดุปิดแผล (<http://www.biotech.or.th/TH/images/stories/IU/document/8/5.pdf>) ทั้งนี้เชื้อราแต่ละชนิดจะมีลักษณะที่เฉพาะแตกต่างกันออกไปตามแต่ละสกุล ซึ่งสามารถสังเกตได้จากลักษณะทางสัณฐานวิทยา แต่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญพิเศษที่มีอยู่น้อยมากในประเทศไทย และการศึกษาอีกแขนงหนึ่งคือ การศึกษาระดับโมเลกุลซึ่งสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากสามารถทำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ที่สามารถใช้เปรียบเทียบและศึกษาความหลากหลายได้โดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

เพื่อจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงบางชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุล

## 1.3 ขอบเขตโครงการพิเศษ

ศึกษาเฉพาะเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 10 ไอโซเลตที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ นักกวีวิทยาชำนาญการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มวิจัยกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตรที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยศึกษาทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลในตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITSs)

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 จำแนกและบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง
- 1.4.2 เก็บรวบรวมตัวอย่างของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง (Entomopathogenic fungi หรือ Insect Fungi) เป็นเชื้อราที่อาศัยแมลงเป็นเจ้าบ้าน เจริญเติบโตในตัวแมลงที่มีชีวิตจนในที่สุดแมลงตาย เชื้อราต้องหาเจ้าบ้านใหม่ โดยการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์งอกออกมาจากซากแมลง สปอร์จะถูกคัดออกและไปตกลงบนแมลงตัวใหม่ เป็นวัฏจักรไปเรื่อยๆ บางช่วงเวลาของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง อาจอยู่เป็นอิสระในดินโดยไม่ต้องอาศัยเจ้าบ้าน เชื้อราในกลุ่มนี้บางชนิดมีการนำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในสกุล *Isaria*, *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Lecanicillium* และ *Verticillium* เป็นต้น เป็นเชื้อราในกลุ่มหนึ่งที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในธรรมชาติ โดยมีส่วนเป็นตัวช่วยในการควบคุมปริมาณของแมลงในธรรมชาติให้อยู่ในสมดุลไม่มากหรือน้อยเกินไป

จากการสำรวจและศึกษาพบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงจะมีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน เช่น เชื้อราในสกุล *Cordyceps*, *Hypocrella* และ *Torrubiella* พบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในสกุลนี้จะมีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงอาศัย เช่น แมงมุม เป็นต้น (วินันท์ดา และคณะ, 2551) ในขณะที่เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในสกุล *Metarhizium* และ *Beauveria* จะสามารถก่อให้เกิดโรคนกับแมลงอาศัยได้หลายชนิด เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงสามารถพบได้ทั่วไปในป่าธรรมชาติ หรือแม้กระทั่งในสวนผลไม้และไร่นา สภาพป่าที่มีความสมบูรณ์มากมักจะพบจำนวนชนิดและความหลากหลายของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงเพิ่มมากขึ้น ในทางกลับกันถ้าสภาพป่าที่มีการถูกทำลายหรือถูกรบกวนมากยิ่งขึ้นเท่าใด โอกาสที่จะพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงก็จะลดน้อยลงไป สืบเนื่องมาจากสูญเสียความสมดุลไปมีผลทำให้ปริมาณและชนิดของแมลงซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงลดลงตามไปด้วย

#### 2.1.1 ลักษณะการพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลง

จากการศึกษาของศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้คือ

2.1.1.1 แมลงที่ตายฝังตัวอยู่ใต้พื้นดิน ลักษณะการพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในกลุ่มนี้จะพบตามพื้นดิน โดยที่เชื้อราจะสร้างก้าน (stalk) ชูขึ้นมาเหนือพื้นดิน บางชนิดมีสีหรือเป็นช่อดกคล้ายดอกไม้ โดยเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงในกลุ่มนี้ ส่วนใหญ่เราจะพบในฤดูฝน เนื่องมาจากว่าเชื้อราต้องการความชื้นในปริมาณที่สูงในการเจริญเติบโต เช่น เชื้อราใช้

*Ophiocordyceps myrmecophila* แสดงดังภาพที่ 2.1 ซึ่งพบว่าแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มแรกคือแมลงที่อาศัยอยู่ใต้พื้นดิน เชื้อราจะเจริญในตัวแมลงแล้วสร้างเส้นใยขดรวมกันเป็นก้าน เจริญผ่านชั้นของผิวหนัง ชูก้านออกมาพร้อมกับการสร้างสปอร์ที่ส่วนบนเพื่อการแพร่พันธุ์ และ แมลงที่อาศัยอยู่ตามผิวน้ำดินขึ้นไป แมลงที่มีถิ่นที่อยู่ตามผิวน้ำดินนี้ เช่น มด ต่อและแตน โดยที่ก้านของเชื้อราไม่ได้เจริญผ่านชั้นดินขึ้นมา แต่จะเจริญผ่านชั้นของใบไม้ที่ปกคลุมแมลงอยู่ เพื่อชูก้าน synnema ขึ้นมาในการแพร่พันธุ์ต่อไป



ภาพที่ 2.1 แสดงลักษณะของ *Ophiocordyceps myrmecophila* ที่เข้าทำลายมวน  
(ที่มา: Luangsa-ard และคณะ, 2009)

2.1.1.2 แมลงที่ตายแล้วเกาะติดบน ใบไม้ กิ่งไม้ ลักษณะการพบเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงในกลุ่มนี้จะพบตามส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แมลงอาศัยอยู่ มีเส้นใยราปกคลุมอยู่บนตัวแมลงหรือมีข้อสปอร์งอกออกมา เช่น เชื้อรา *Ophiocordyceps unilateralis* แสดงดังภาพที่ 2.2

(<http://www.dnp.go.th/foremic/fmo/insectfungi.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.2 แสดงลักษณะของ *Ophiocordyceps unilateralis* ที่เข้าทำลายมด

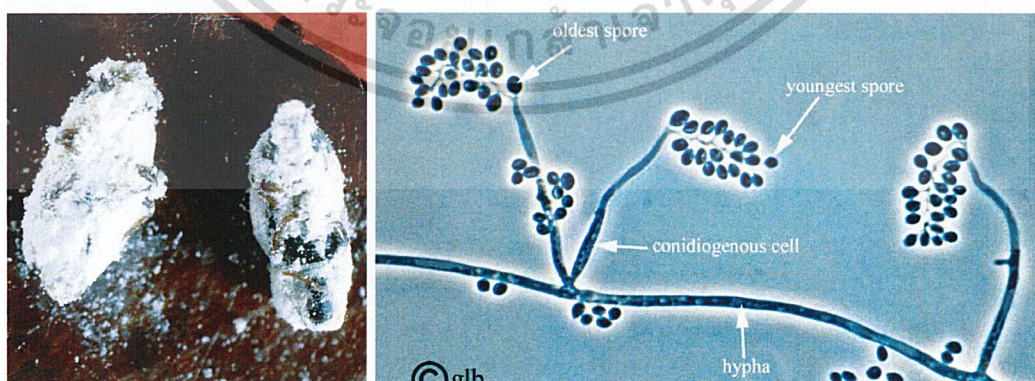
(ที่มา: Luangsa-ard และคณะ, 2009)

### 2.1.2 การจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนแมลง

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนแมลง สามารถจัดจำแนกออกได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งมีสกุลที่สำคัญๆ ดังนี้

#### 2.1.2.1 สกุล *Beauveria* Vuillemin

ลักษณะสำคัญ: อยู่ในไฟลัม Ascomycota ก้านชูสปอร์ใสไม่มีสี ผิวเรียบ ประกอบด้วย conidiogenous cell ที่หนาแน่น เซลล์ที่สร้างโคนิเดียสั้นจะมีรูปร่างกลมหรือ flask shape ส่วนปลายมีลักษณะซิกแซก ให้กำเนิดโคนิเดียตามรอยซิกแซกของก้านชูสปอร์ โคนิเดียมีรูปร่างกลมจนถึงทรงรี มีเซลล์เดียว ใสไม่มีสี พบบาง (ดังภาพที่ 2.3) teleomorph อยู่ในสกุล *Cordyceps* เชื้อรา *Beauveria bassiana* สามารถทำลายแมลงในอันดับ Coleoptera, Hemiptera และ Homoptera (Samson และคณะ, 1988)



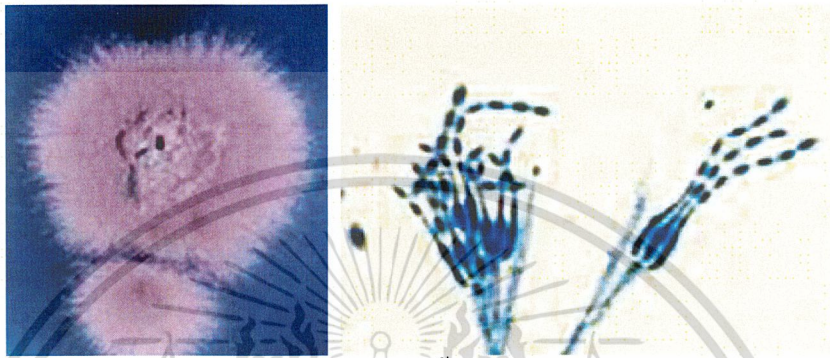
ภาพที่ 2.3 แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล *Beauveria*

(ที่มา: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.2.2 สกุล *Paecilomyces*

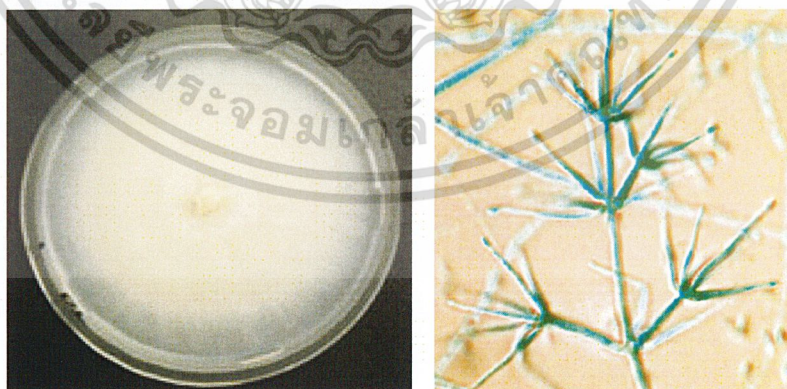
ลักษณะสำคัญ: ก้านชูสปอร์ชูตั้งขึ้นเดี่ยวๆ จะอยู่บน synnema ก้านชูสปอร์อยู่กันเป็นกลุ่ม phialide รูป flask shape หรือฐานพองออก ส่วนปลายแหลมเรียว โคนเดี่ยวเซลล์เดี่ยว ผิวเรียบ บางครั้งผิวมีลักษณะคล้ายหนาม (ดังภาพที่ 2.4) teleomorph ของเชื้อราสกุลนี้ได้แก่ *Torrubiella* และ *Cordyceps* (Samson และคณะ, 1988)



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล *Paecilomyces*  
(ที่มา: <http://www.neemproducts.com/paecilomyces.htm>)

### 2.1.2.3 สกุล *Verticillium*

ลักษณะสำคัญ: ก้านชูสปอร์ชูตั้งขึ้น โดยพัฒนามาจาก vegetative hypha phialide อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหลวมๆ รูป awl shape บางครั้งพองที่ฐาน โคนเดี่ยวมีเซลล์เดี่ยว ใสไม่มีสี ผิวเรียบ อยู่กันเป็นกลุ่ม มีลักษณะคล้ายเมือก (slime head) บางครั้งเป็นลูกโซ่ (ดังภาพที่ 2.5) teleomorph ของเชื้อราสกุลนี้ได้แก่ *Cordyceps* และ *Torrubiella* (Samson และคณะ, 1988)



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะของเชื้อราสกุล *Verticillium*  
(ที่มา: [http://www.runetwork.de/html/en/index.html?article\\_id=4503](http://www.runetwork.de/html/en/index.html?article_id=4503))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันพบว่ามี การเปลี่ยนแปลงกลุ่มของเชื้อราสกุล *Verticillium* บางชนิดให้ไปรวมอยู่ในสกุล *Lecanicillium* ดังงานวิจัยของ Zare และ Gams (2008) ได้ทำการศึกษาเชื้อราสกุล *Verticillium* โดยใช้ *Verticillium fungicola* เป็นตัวอย่าง เพื่อศึกษาการจัดหมวดหมู่โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระดับโมเลกุล ในตำแหน่ง ITS และ SSU ที่อยู่ใน rDNA พบว่า *V. fungicola* มีความใกล้ชิดกับเชื้อราสกุล *Lecanicillium* และไม่สัมพันธ์กับราชนิดอื่นที่อยู่ในสกุล *Verticillium* จึงเสนอให้ *V. fungicola* และ *V. fungicola* var. *flavidum* อยู่ในสกุล *Lecanicillium* รวมทั้ง *L. fungicola* var. *aleophilum* ซึ่งสามารถจัดจำแนกโดยอาศัยความแตกต่างของอุณหภูมิที่เหมาะสม และอุณหภูมิสูงสุดที่ใช้ในการเจริญ และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า *L. flavidum* มีความแตกต่างจาก *L. fungicola* 2 varieties ตรงบริเวณก้านชูสปอร์ (conidiophores)

## 2.2 หลักการของเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการจำลองตัวของดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่าเทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิคพีซีอาร์ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้าน จนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

หลักการของพีซีอาร์คือ ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

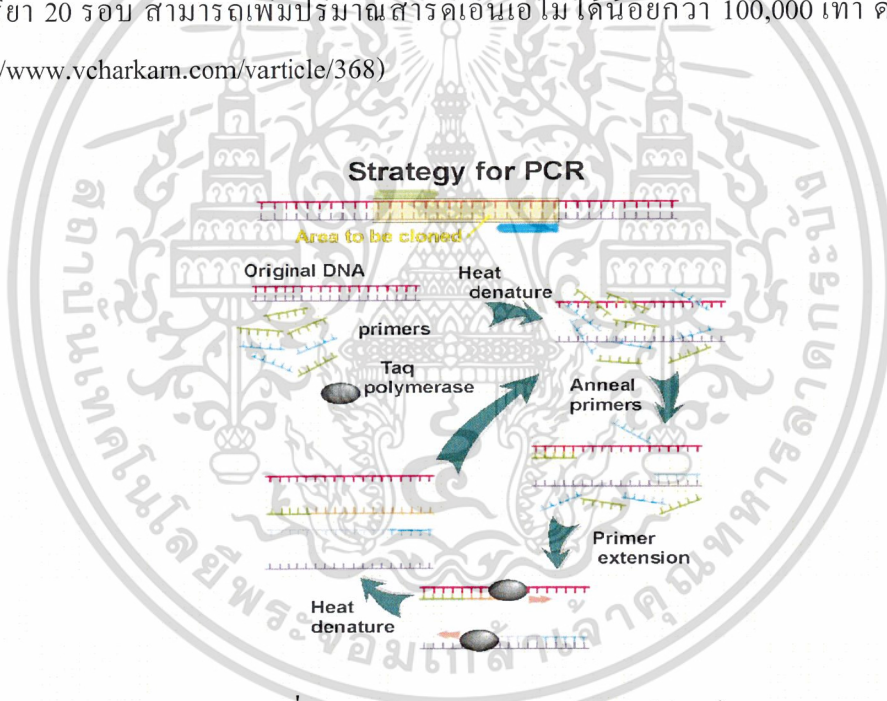
ขั้นตอนแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเกลียวคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นของทรัพย์สินของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นที่สอง เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิลงและจัดให้ไพรเมอร์ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้น ๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 20 คู่เบส) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจับคู่กันซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 37-60 องศาเซลเซียส

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะสามารถจับคู่อยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อจัดให้เกิดปฏิกิริยาถูกซ้ำจากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมายประมาณว่าปฏิกิริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอไม่ได้น้อยกว่า 100,000 เท่า ดังภาพที่ 2.6 (<http://www.vcharkarn.com/varticle/368>)



ภาพที่ 2.6 แสดงหลักการของเทคนิคพีซีอาร์

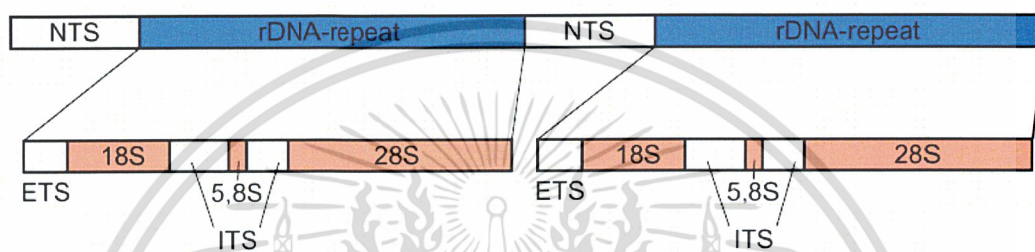
(ที่มา: <http://fmel.ifas.ufl.edu/buzz/images/pcr.jpg>)

## 2.3 การศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต

ในการศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุลนั้นมีหลายเทคนิคที่ต้องอาศัยหลักการพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์ โดยอาศัยความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตซึ่งทำการศึกษาได้จากหลายบริเวณ เช่น ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA, rDNA) ไมโทคอนเดรีย และยีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิต เป็นต้น

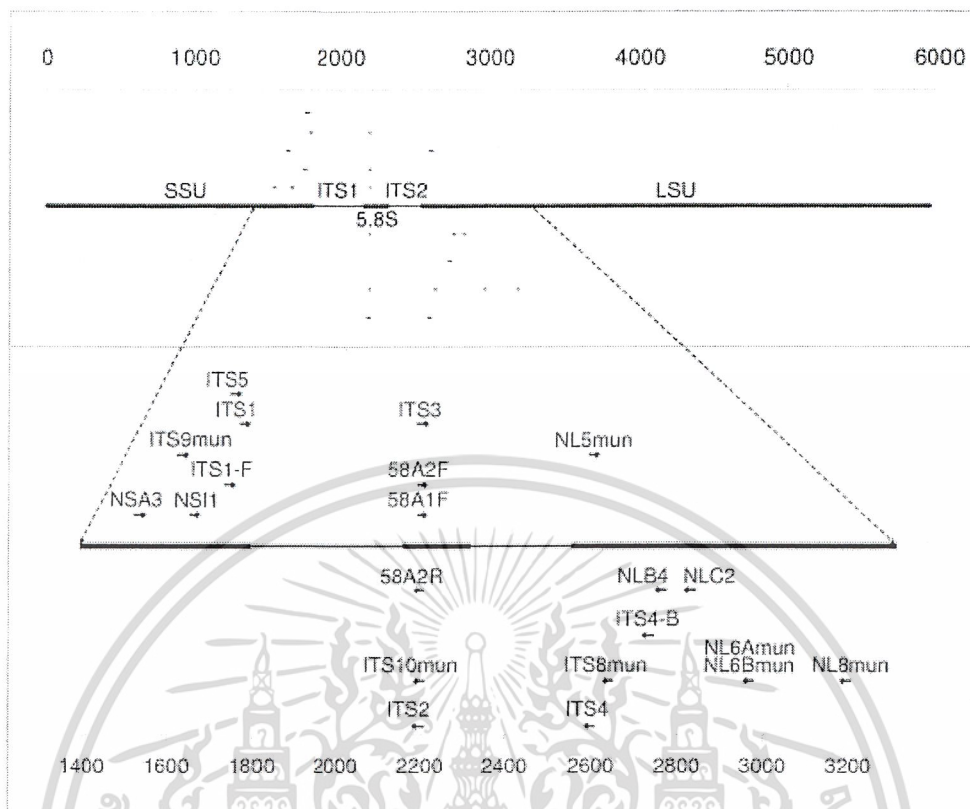
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต จะมีตำแหน่งที่สังเคราะห์ไปเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ชนิดไรโบโซมอลดีเอ็นเอ นั่นคือ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved regions) ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จะพบหน่วยซ้ำ (repeat unit) ที่เรียงต่อกันบนโครโมโซมในส่วน nucleolar organizing regions (NORs) แต่ละหน่วยจะประกอบไปด้วยบริเวณ transcribed ได้แก่ บริเวณ small subunit (SSU) คือ ส่วน 18S บริเวณ large subunit (LSU) คือส่วน 28S และบริเวณ 5.8S บริเวณ external transcribed spacers (ETS) ได้แก่ ETS1 และ ETS2 บริเวณ non-transcribed spacer (NTS) และบริเวณ internal transcribed spacer (ITSs) ได้แก่ ITS1, 5.8S และ ITS2 ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 แสดงการจัดเรียงตัวของบริเวณต่างๆ บน rDNA  
(ที่มา: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot\\_rdna.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png))

สำหรับบริเวณที่นิยมนำมาศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต ได้แก่ บริเวณ 28S rDNA เหมาะสำหรับแยกความแตกต่างในระดับวงศ์ บริเวณ 18S rDNA เหมาะสำหรับแยกความแตกต่างในระดับสกุล เพราะมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูง และบริเวณ ITSs บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ มักนิยมใช้กันโดยทั่วไปเนื่องจากมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นบนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ได้ ทำให้บริเวณ ITSs เป็นบริเวณที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITSs ยังนำมาใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรม ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จะมีขนาดเล็ก (600 – 700 คู่เบส) และตำแหน่งที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs ต่างกันจะทำให้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ต่างกันด้วย โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาบริเวณ ITSs (ดวงกมล และคณะ, 2548) แสดงดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอในบริเวณ ITSs (ที่มา: Martin และ Rygielwicz, 2005)

ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง ต้องการจำแนกความแตกต่างเชื้อราในระดับสปีชีส์ จึงทำการศึกษาที่ตำแหน่ง ITSs เนื่องจากมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นบนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่งถ้าศึกษาในบริเวณอื่นบนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ จะไม่สามารถจำแนกในระดับสปีชีส์ได้ แต่จะจำแนกความแตกต่างได้แค่ในระดับวงศ์และสกุลเท่านั้น

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Aung และคณะ (2008) ได้ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลงในประเทศไทย โดยได้ทำการสำรวจในพื้นที่ป่าอนุรักษ์ พื้นที่ป่าที่ถูกรบกวน และพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการเก็บตัวอย่างแมลงและดินในพื้นที่ต่างๆ ระหว่างช่วงฤดูฝนปี 2005 และ 2006 จากการวิจัยพบเชื้อรา 34 ตัวอย่างซึ่งจัดอยู่เอกสารเป็นเอกสารที่ส่งงานวิชาสำหรับโปรแกรมเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นับญาติเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ใน 15 สกุล เป็นเชื้อราที่สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (telomorphs) 18 ตัวอย่าง และเชื้อราที่สืบพันธุ์แบบไม่ว่ากรรมใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งที่ให้มีเหตุที่แบคทีเรียและของสิ่งมีชีวิตของอีกสารทุกครั้งที่มีการไปใช้

ไม้อาศัยเพศ (anamorphs) 16 ตัวอย่าง โดยพบว่าเป็นเชื้อราชนิดใหม่ 2 ตัวอย่างคือ *Opiocordyceps mrciensis* และ *Hymenostilbe furcata* พบเชื้อราชนิดใหม่ครั้งแรกในประเทศไทย 2 ตัวอย่างคือ *Cordyceps militaris* และ *C. militaris* var. *sphaerocephala*

Gaitan และคณะ (2002) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Beauveria bassiana* จำนวน 95 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RAPDs (random amplified polymorphic DNA) และ ITS-RFLP (restriction digestion of the ITS fragment) การจัดกลุ่มทำได้โดยใช้ UPGMA และ Principal Coordinates Analysis การวิเคราะห์โดยใช้ RAPDs สามารถแบ่งกลุ่มของ 95 สายพันธุ์ออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยในกลุ่มที่ 2 เชื้อราจะได้อาจมาจากแมลง *Hypothenemus hampei* เป็นส่วนใหญ่สำหรับพีซีอาร์ ได้ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ PN16 ได้ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 930 คู่เบส เมื่อนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 8 ชนิด คือ *AluI* *ClaI* *EcoRI* *HaeIII* *HincII* *MboI* *MspI* และ *SspI* มีเฉพาะเอนไซม์ *AluI* และ *MspI* เท่านั้นที่สามารถแยกรูปแบบความแตกต่างของดีเอ็นเอออกได้เป็น 2 กลุ่ม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *B. bassiana* ในโคลัมเบียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยและไม่สัมพันธ์กับแมลงเจ้าบ้านหรือพื้นที่อาศัย

Fargues และคณะ (2002) ได้ศึกษาความเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมระหว่าง *Paecilomyces fumosoroseus* ในตำแหน่ง ITSs บนไรโบโซมดีเอ็นเอทั้งสิ้น 48 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากพื้นที่อาศัยที่แตกต่างกันและจากแมลง โดยเฉพาะแมลงหัวขาว *Bemisia tabaci* ซึ่งเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญในทุ่งนาและพืชเรือนกระจก นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยที่ตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และวิเคราะห์ด้วยวิธี ITS-RFLP โดยใช้เอนไซม์ 6 ชนิด คือ *AluI* *HaeIII* *Hin6I* *HpaII* *NdeII* และ *SmaI* สามารถแบ่ง *P. fumosoroseus* ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีจำนวน 25 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถแยกได้จาก *B. tabaci* เท่านั้น กลุ่มที่ 2 มีจำนวน 2 สายพันธุ์ แยกได้จากแมลงต่างๆ ซึ่งต่างจากกลุ่มที่ 1 ตรงที่รูปแบบของ *HpaI* พบว่ามีแถบที่น้อยที่สุด 4 แถบ และกลุ่มที่ 3 มีจำนวน 21 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยุโรป 17 สายพันธุ์และไม่ใช่สายพันธุ์ยุโรปอีก 4 สายพันธุ์

Kouvelis และคณะ (2008) ศึกษาการย้ายสกุลของเชื้อรา *Verticillium* กลุ่ม Prostrata ให้อยู่ในสกุล *Lecanicillium* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลง ก่อนหน้านี้ได้มีการจัดกลุ่มเป็น *Verticillium lecanii* หรือ *Verticillium* sp. จำนวน 65 สายพันธุ์ ที่แยกจากพื้นที่อาศัยและแมลงเจ้าบ้านที่แตกต่างกัน และทำศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนบริเวณไมโทคอนเดรีย (mt) และบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยนำกลุ่มของ *L. lecanii*, *L. longisporum*, *L. muscarium* และ *L. nodulosum* ไปตรวจสอบด้วยวิธีการวิเคราะห์ BS (Bootstap) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณไมโทคอนเดรียในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่เอกสารเกิดขึ้น จากการวิเคราะห์ตรงบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 การใช้ยีนบริเวณไมโทคอนเดรียเพียงอย่างเดียวหรือไม่เพียงหรือใช้ยีนบริเวณไมโทคอนเดรียร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS นั้นพบว่าสามารถช่วยใช้

ในการจัด *V. lecanii* และ *Verticillium* sp. ไปอยู่ในสกุล *Lecanicillium* ดังนั้นประโยชน์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ ไมโทคอนเดรียคือใช้เป็นเครื่องมือในการช่วยในการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนแมลงสะควมมากขึ้น

Mayer และคณะ (2008) ได้ศึกษาการแยกและการศึกษาลักษณะของ *Isaria fumosorosea* ที่แยกได้จาก Asian citrus psyllid ในรัฐฟลอริดา ได้ทำการแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคน *Diaphorina citri* Kuwayama ในสวนส้มที่รัฐฟลอริดา ช่วงฤดูใบไม้ร่วงปี 2005 ซึ่งการศึกษานี้มีความสำคัญเนื่องจาก *Diaphorina citri* ก่อให้เกิดโรคนพืช ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมจะช่วยจำแนกเชื้อรา *I. fumosorosea* จาก Asian citrus psyllid (*Ifr* AsCP) ได้ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีจากเชื้อ *Ifr* AsCP ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDY และ MEA หลังจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDY เป็นเวลา 7 วัน พบว่า โคโลนีมีลักษณะฟู เป็นผงแป้ง มีสีขาวไปจนถึงสีเทาอ่อน เมื่อสังเกตด้านหลังจานเพาะเชื้อพบว่า มีลักษณะเรียบและมีสีเหลืองอ่อนเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน โคนิเดียจะมีจำนวนมาก มีสีเทาถึงเหลืองอ่อน ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ  $3.0 \pm 0.1$  เซนติเมตร

Park และ Kim (2010) ได้ศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ *Lecanicillium* ที่มีความเป็นพิษสูงต่อการเจริญเติบโตของ *Bemisia tabaci* โดยทำที่บริเวณตำแหน่ง ITS จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สายพันธุ์ของเชื้อราทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้ สามารถจำแนกได้เป็น *Lecanicillium* spp. โดยสายพันธุ์ 4078 มีความเหมือนกับ *L. fisisporum* 100 % ในขณะที่สายพันธุ์ 4075 Btab01 และ 41185 มีความเหมือนกับ *L. attenuatum* มากกว่า 98 % สายพันธุ์ 6543 และ 6541 มีความเหมือนกับ *L. lecanii* มากกว่า 98 % และสายพันธุ์ 3387 มีความเหมือนกับ *L. lecanii* 97 % และมีขนาดขึ้นของดีเอ็นเอประมาณ 497-513 คู่เบส

Samson (1974) ได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อรา *Paecilomyces cinnamomeus* จากอเมริกาเหนือ อเมริกากลาง ประเทศอาร์เจนตินา และจากประเทศไทย พบว่าเชื้อรา *P. cinnamomeus* พบกระจายในเขตร้อน สำหรับเชื้อ *Torrubiella luteorostrata* และ *P. cinnamomeus* พบได้ตลอดทั้งปี teleomorph พบระหว่างเดือนพฤษภาคมและพฤศจิกายน anamorph พบได้ในช่วงเริ่มต้นและสิ้นสุดฤดูฝน ซึ่งในความเป็นจริง *T. luteorostrata* พบเฉพาะฤดูฝน และพบว่าลักษณะเชื้อราสกุล *Paecilomyces* มีลักษณะดังนี้ เส้นใยมีสีเหลืองอมน้ำตาล ถึงสีน้ำตาลชืด conidiophores มีอันเดียว ตั้งตรง ประกอบด้วย phialide 2-5 phialide มีรูปร่างคนโท ส่วนโคนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสาย รูปไข่ขนาดเล็ก

Sukarno และคณะ (2009) ศึกษา *Lecanicillium* 46 ตัวอย่าง และ *Verticillium* 1 ตัวอย่าง ที่แยกได้จากดินและแมลงที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ในประเทศอินโดนีเซียและญี่ปุ่น จากการศึกษาทางสัณฐานวิทยาและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ ITS1+5.8S+ITS2 แบ่งได้เป็น *Lecanicillium* 9 สายพันธุ์ และ *Verticillium* 1 สายพันธุ์ รวมทั้งที่ระบุไม่ได้อีก 6 ตัวอย่าง ซึ่งพบว่าได้จากประเทศ

อินโดนีเซีย 4 สายพันธุ์คือ *L. araneicola*, *L. kalimantanense*, *Lecanicillium* sp. 4 และ *V. indonesiacum* จากประเทศญี่ปุ่น 5 สายพันธุ์ คือ *L. attenuatum*, *L. fusisporum*, *L. psalliotae*, *Lecanicillium* sp. 1 และ *Lecanicillium* sp. 3 และจากทั้งสองประเทศ คือ *L. saksenae* เกิดสายพันธุ์ใหม่ คือ *L. araneicola*, *L. kalimantanense* และ *V. indonesiacum* และมีการจัดกลุ่มของ *L. saksenae* ใหม่

สุวิชา (2008) ได้ศึกษาเชื้อราสกุล *Beauveria* ซึ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่แยกได้จากแมลงและดินในประเทศไทยจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต นำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งจากการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลโดยจะนำมาศึกษาด้วยเทคนิค PCR และ RFLP ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และบางส่วนของ 18S และ 28S ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และ PN3/PN16 สามารถเพิ่มผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 600 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ และจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *HhaI* (*AspLEI*) สามารถแยกเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต ออกจากเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลตได้ เมื่อจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบด้วยโปรแกรม ClustalX และนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราโดยใช้ Kimura-two parameter จากจำนวนชุดข้อมูล 1000 ชุด ด้วยโปรแกรม PHYLIP หากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปของ Phylogenetic tree ในบริเวณ ITSs สามารถจัดกลุ่มเชื้อราได้อย่างชัดเจนเป็น 3 กลุ่ม คือเชื้อรา *B. bassiana*, *B. brongniartii* และเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* ซึ่งเป็นตัวอย่างที่นำมาเป็น out group

นฤมล (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ซึ่งเป็นเชื้อราสาเหตุโรคในแมลงจำนวน 32 ไอโซเลต โดยได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลโดยใช้เทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บนไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอบริเวณ ITS ตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 พบว่าทุกไอโซเลตมีขนาดชิ้นของดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบส จากนั้นนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* และ *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank เพื่อหาแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ โดยวิธี Neighbour-Joining แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของ *M. anisopliae* ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITSs ซึ่งสามารถจัดจำแนกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในระดับสปีชีส์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

# วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 สารเคมี อุปกรณ์และเชื้อราที่ใช้ในการศึกษา

#### 3.1.1 สารเคมี

- 3.1.1.1 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)
- 3.1.1.2 อาหาร Potato Dextrose Broth (PDB)
- 3.1.1.3 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด GF-1 ของบริษัท Vivantis
- 3.1.1.4 ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (Taq DNA Polymerase) ของบริษัท Vivantis
- 3.1.1.5 ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Vivantis
- 3.1.1.6 บัฟเฟอร์ TBE (TBE Buffer)
- 3.1.1.7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder) ขนาด 100 คู่เบส ของบริษัท Vivantis
- 3.1.1.8 สีย้อม (loading dye) ของบริษัท Vivantis
- 3.1.1.9 สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide)
- 3.1.1.10 อะกาโรสเจล (agarose gel)
- 3.1.1.11 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- 3.1.1.12 น้ำปราศจากไอออน (deionize H<sub>2</sub>O)
- 3.1.1.13 แอลกอฮอล์ร้อยละ 70 และ 95
- 3.1.1.14 สารละลายกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิเตต (ethylenediaminetetraacetate, EDTA) ความเข้มข้น 25 mM (pH = 8.0)
- 3.1.1.15 ไพรเมอร์ (primer) ของบริษัท Invitrogen
  - ไพรเมอร์ ITS1 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
  - ไพรเมอร์ ITS4 (5'-GGAAGGAGAAGTAACAAGG-3')
  - ไพรเมอร์ PN3 (5'-CCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATC-3')
  - ไพรเมอร์ PN16 (5'-TCCCTTCAACAATTCACG-3')

#### 3.1.2 อุปกรณ์

- 3.1.2.1 เครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis)
- 3.1.2.2 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV transilluminator)
- 3.1.2.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

#### 3.1.2.4 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.2.5 เครื่องเขย่าผสมสารละลาย (vortex mixer)
- 3.1.2.6 หลอดทดลอง (microcentrifuge tube) ขนาด 0.2 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.2.7 ชุดไมโครปิเปตต์ (micropipette set)
- 3.1.2.8 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.2.9 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.1.2.10 ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
- 3.1.2.11 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (balance)
- 3.1.2.12 ตู้เย็น 4 และ -20 องศาเซลเซียส (refrigerator)
- 3.1.2.13 จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- 3.1.2.14 สไลด์ (slide) และกระจกปิดสไลด์ (cover glass)
- 3.1.2.15 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 3.1.2.16 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle)
- 3.1.2.17 ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- 3.1.2.18 เครื่องไมโครเวฟ (microwave)
- 3.1.2.19 เครื่องหม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)
- 3.1.2.20 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.2.21 โกร่งบดยาและที่บด (mortar and pestle)
- 3.1.2.22 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (alcohol lamp)
- 3.1.2.23 หลอดกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.91 มิลลิเมตร
- 3.1.2.24 เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (hook)
- 3.1.2.25 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 มิลลิลิตร

### 3.1.3 ตัวอย่างเชื้อราที่นำมาใช้ในการศึกษา

เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่นำมาศึกษาได้รับความอนุเคราะห์มาจาก ดร.เสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์ นักกีฏวิทยาชำนาญการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มวิจัยกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ทั้งหมด 10 ไอโซเลต ที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล

## 3.2 วิธีการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เขี่ยเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงมาทำการลากหรือขีด (streak) ลงบนอาหาร

Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน จากนั้นเขี่ยเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคที่เป็นโคโคนีเดี่ยวๆ มาลากหรือขีดลงบนอาหาร PDA

อีกครั้งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน นำเชื้อราที่ได้ไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุลต่อไป

### 3.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

#### 3.3.1 ลักษณะโคโคนีและสีของอาหารของเชื้อ

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน ใช้หลอดกลมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.91 มิลลิเมตร เจาะที่ปลายเส้นใยและย้ายมาวางลงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และทำการศึกษาและบันทึกการเจริญของโคโคนี ลักษณะของเส้นใย สีของเส้นใยทั้งด้านหน้าบนผิวอาหารและด้านหลังของจานเพาะเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร ทุกๆ 2 และ 4 วัน เป็นเวลา 4-6 สัปดาห์ แล้วจึงทำการบันทึกภาพลักษณะโคโคนี

#### 3.3.2 ลักษณะเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเตรียมสไลด์โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยเส้นใย วางบนสไลด์ที่หยดด้วยสีย้อม lactophenol cotton blue และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์นำไปศึกษารูปร่างของโคโคนีเดี่ยว ลักษณะของเส้นใย รูปร่างและลักษณะการเกิด phialide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่าและ 100 เท่า บันทึกภาพเส้นใยและโคโคนีเดี่ยวพร้อมทั้งวัดขนาดโคโคนีเดี่ยวด้วยชุดโปรแกรมถ่ายภาพ Nikon ACT – 2U Imaging Software จำนวน 20 ซ้ำต่อไอโซเลต ( $n = 20$ ) จากนั้นนำขนาดความยาว (length) และความกว้าง (width) ของแต่ละโคโคนีเดี่ยมาหาค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ( $\text{mean} \pm \text{S.E.}$ ) คำนวณค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานในแต่ละไอโซเลตด้วยโปรแกรม SPSS (Statistic Package for Social Science) เพื่อจัดกลุ่มของตัวอย่างเชื้อรา

### 3.4 การศึกษาด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

#### 3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงในแต่ละไอโซเลตในอาหาร PDB (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 7-10 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณของเส้นใย ทำการแยกเพลเลต (Pellet) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000-9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำการล้างเพลเลต 2 ครั้งด้วย 25 mM EDTA (pH = 8.0) (ภาคผนวก ก) ตามด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้ออีกครั้ง นำเพลเลตมาบดด้วย

ไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผงคล้ายผงแป้ง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยชุดสกัดสำเร็จรูปไมว่า GF-1 นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบคุณภาพ

และปริมาณ จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอโดยทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอและค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (ภาคผนวก ข) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำดีเอ็นเอของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคนในแมลงที่ได้จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITSs ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 หรือ PN3/PN16 ด้วยวิธีพีซีอาร์ ปริมาณสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ ITS/ITS4 หรือ PN3/PN16 1 ไมโครลิตร (0.8 พิโคโมล) dNTP 0.5 ไมโครลิตร (200 ไมโครโมล) ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส 0.2 ไมโครลิตร (1 ยูนิต) และบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 เท่า 2.5 ไมโครลิตร (1 เท่า) นำใส่เครื่องพีซีอาร์ ทำการเริ่มโปรแกรมพีซีอาร์ที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วย denature ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที denature ที่ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที annealing ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดีเอ็นเอจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำวิเคราะห์ด้วยวิธีอคาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (ภาคผนวก ข)

#### 3.4.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พร้อมทั้งนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับฐานข้อมูล GenBank ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยใช้ Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) และวิเคราะห์หาแผนภูมิกวามสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic Tree) โดยโปรแกรม BioEdit, ClustalX 1.83 และ PHYLIP (Neighbor-joining method, NJ) (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในการเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

Locus	สปีชีส์	อ้างอิง
AY755506	<i>Isaria fumosorosea</i>	Ergashev และคณะ, 2004
AY624184	<i>Isaria fumosorosea</i>	Luangsa-ard และคณะ, 2005
AY624182	<i>Isaria fumosorosea</i>	Luangsa-ard และคณะ, 2005
GU453924	<i>Isaria fumosorosea</i>	He และคณะ, 2010
EU553329	<i>Isaria tenuipes</i>	Inglis และ Tigano, 2006
EU553323	<i>Isaria tenuipes</i>	Inglis และ Tigano, 2006
AB378506	<i>Lecanicillium araneicola</i>	Sukarno และคณะ, 2009
EF513009	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Kouvelis และคณะ, 2008
EF513014	<i>Lecanicillium lecanii</i>	Kouvelis และคณะ, 2008
EF513027	<i>Lecanicillium psalliotae</i>	Kouvelis และคณะ, 2008
HQ711848	<i>Paecilomyces carneus</i>	Han และคณะ, 2010
GU586845	<i>Paecilomyces marquandii</i>	Zhou และ Zhang, 2010

ข้อมูลจาก: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการศึกษาเพื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่คัดแยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลจำนวน 10 ไอโซเลต (ไอโซเลต A, B, C, D, F, G, H, I, J และ K) และเมื่อศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และระดับโมเลกุล ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้เพียง 8 ไอโซเลต โดยมี 2 ไอโซเลต คือ F และ G ไม่สามารถเจริญเติบโตได้

#### 4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะของโคโคโคนิ อัตรการเจริญ ลักษณะเส้นใย และรูปร่างของโคโคนิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อราจำนวน 8 ไอโซเลต สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้

กลุ่มที่ 1 เชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นโคโคโคนิมีสีขาว ลักษณะฟู แผ่นเป็นวง เกิดหยดน้ำใสขึ้นบนเส้นใย โคโคนิมีสีขาว เมื่อสังเกตด้านหลังจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองอ่อนและพบรอยพับบนสีของอาหาร ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อดูลักษณะเส้นใยและโคโคนิภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบ conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-5 conidiophore และพบโคโคนิมี 2 ขนาด คือขนาดใหญ่ (Macroconidia) และขนาดเล็ก (Microconidia) โดยโคโคนิขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายแคบคล้ายเข็ม และโคโคนิขนาดเล็กมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน และพบผลึก (Crystal) มีลักษณะวาวและมีหลายขนาด หลายรูปร่าง ยกเว้นไอโซเลต H ซึ่งมีผลึกขนาดใหญ่กว่าไอโซเลตอื่นๆ (ภาพที่ 4.1 A-B) เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต A (ภาพที่ 4.2 A-D), ไอโซเลต B (ภาพที่ 4.3 A-D), ไอโซเลต C (ภาพที่ 4.4 A-D), ไอโซเลต H (ภาพที่ 4.5 A-D) ซึ่งขนาดของโคโคนิทั้งความกว้างและความยาวในแต่ละไอโซเลต ไม่แตกต่างกันมาก โดยไอโซเลต A มีขนาดของโคโคนิความกว้างต่อความยาวประมาณ  $1.49 \pm 0.03 \times 4.25 \pm 1.98$  ไมโครเมตร, ไอโซเลต B มีขนาดของโคโคนิความกว้างต่อความยาวประมาณ  $1.43 \pm 0.03 \times 4.27 \pm 0.10$  ไมโครเมตร, ไอโซเลต C มีขนาดของโคโคนิความกว้างต่อความยาวประมาณ  $1.78 \pm 0.04 \times 4.42 \pm 0.08$  ไมโครเมตร และไอโซเลต H มีขนาดความกว้างต่อความยาวของโคโคนิประมาณ  $1.76 \pm 0.03 \times 4.67 \pm 0.36$  ไมโครเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 และเมื่อทำการวัดอัตราการเจริญในระยะเวลา 1 เดือน พบว่า ไอโซเลต A เจริญได้ดีที่สุด โดยมีค่าเฉลี่ยโคโคโคนิเท่ากับ  $84.45 \pm 0.85$  มิลลิเมตร ได้แสดงรายละเอียดอัตราการเจริญของแต่ละไอโซเลตในตารางที่ 4.2

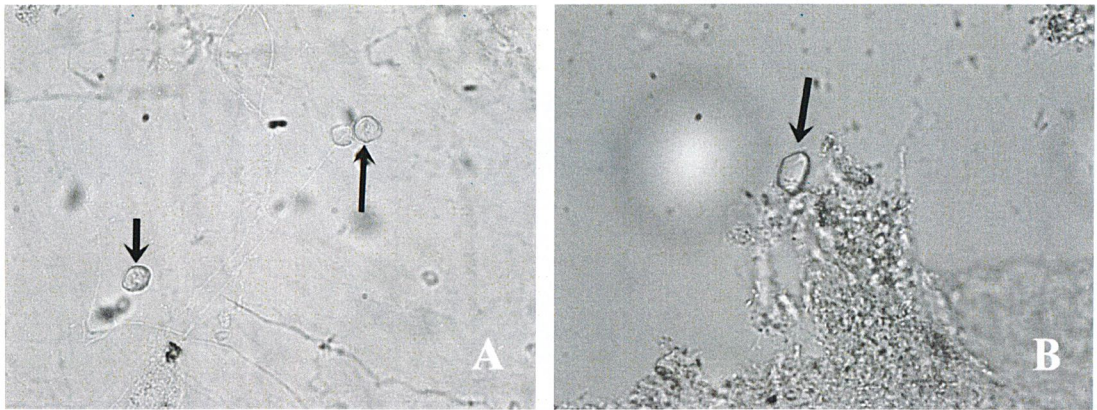
กลุ่มที่ 2 เชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นโคโคโคนิมีสีขาว มีลักษณะฟู และแผ่นเป็นวง ไม่พบการสร้างหยดน้ำบนเส้นใย โคโคนิในช่วงแรกจะมีสีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อสังเกตด้านหลังจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองอ่อน ไม่พบรอยพับบน ยกเว้น ไอโซเลต K ซึ่งพบรอยพับบน

เพียงเล็กน้อย สีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อคุณลักษณะเส้นใยและโคนิเดียได้กลิ้ง จุลทรรศน์พบ conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-6 conidiophore มีลักษณะเป็นรูปคนโท และพบโคนิเดียมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต D (ภาพที่ 4.5 A-D), ไอโซเลต K (ภาพที่ 4.8 A-D) ทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มีขนาดของโคนิเดียไม่แตกต่างกัน โดยไอโซเลต D มีขนาดความกว้างต่อความยาวของโคนิเดียประมาณ  $1.47 \pm 0.05 \times 3.95 \pm 0.07$  ไมโครเมตร และไอโซเลต K มีขนาดความกว้างต่อความยาวของโคนิเดียประมาณ  $1.47 \pm 0.04 \times 3.89 \pm 0.07$  ไมโครเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 และเมื่อทำการวัดอัตราการเจริญในระยะเวลา 1 เดือนจะได้ค่าเฉลี่ยโคโลนีของไอโซเลต D เท่ากับ  $86.04 \pm 1.09$  มิลลิเมตร และไอโซเลต K เท่ากับ  $84.02 \pm 0.49$  มิลลิเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2

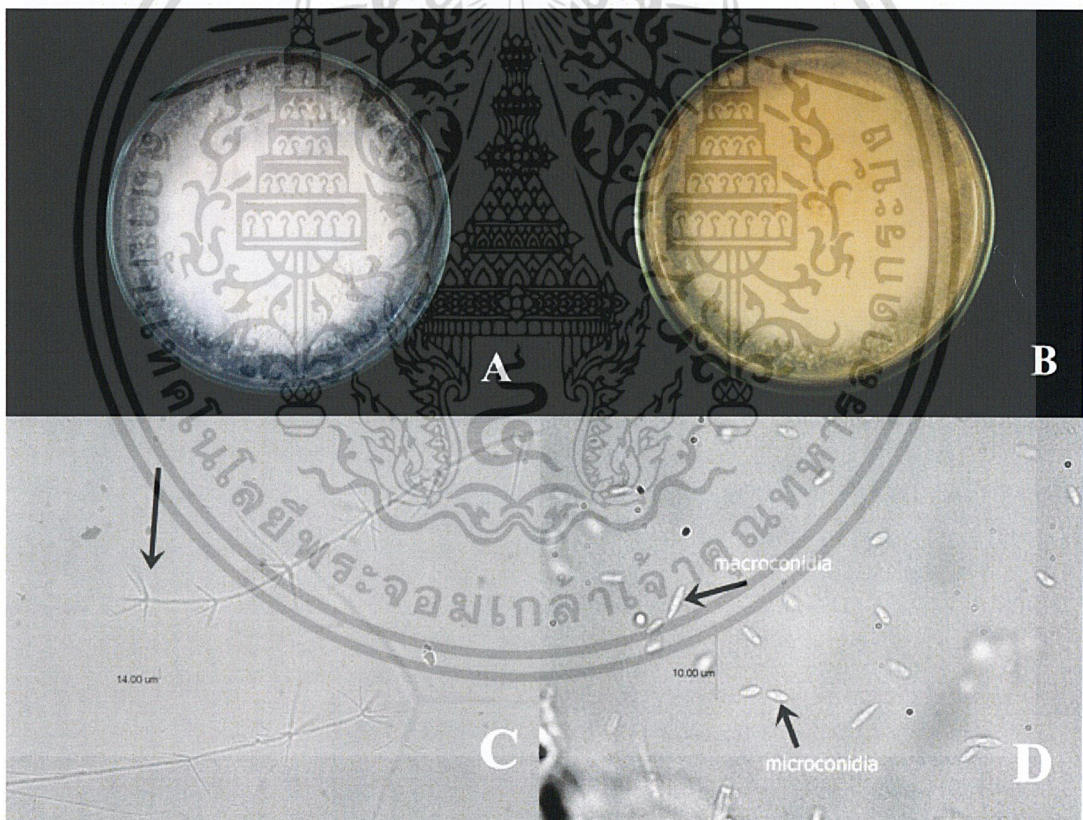
กลุ่มที่ 3 เชื้อราในกลุ่มนี้มีลักษณะโคโลนีมีสีขาว มีลักษณะฟูคล้ายสำลี แผ่เป็นวง มีการสร้างหยดน้ำสีเหลืองอ่อนบนเส้นใย โคนิเดียมีสีขาว เมื่อสังเกตด้านหลังจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองอ่อน พบรอยเป็นวงๆ สีของอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน เมื่อคุณลักษณะเส้นใยและโคนิเดียได้กลิ้งจุลทรรศน์พบ conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-4 conidiophore และพบโคนิเดียมี 2 ขนาดคือ ขนาดใหญ่และขนาดเล็ก โดยโคนิเดียขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายแคบคล้ายเข็มและโคนิเดียขนาดเล็กมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวท้ายมน และพบว่าลักษณะของโคนิเดียจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับกลุ่มที่ 1 เชื้อราที่อยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต I (ภาพที่ 4.7 A-D) ซึ่งมีขนาดความกว้างต่อความยาวของโคนิเดียประมาณ  $1.41 \pm 0.05 \times 4.43 \pm 0.39$  ไมโครเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 และเมื่อทำการวัดอัตราการเจริญในระยะเวลา 1 เดือน จะได้ค่าเฉลี่ยโคโลนีของไอโซเลต I เท่ากับ  $56.17 \pm 2.43$  มิลลิเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2

กลุ่มที่ 4 โคโลนีมีสีขาว มีลักษณะฟูแผ่เป็นวง มีการสร้างหยดน้ำใสบนเส้นใย โคนิเดียมีสีเทาปนม่วง เมื่อสังเกตด้านหลังจานเพาะเลี้ยงเชื้อจะมีสีเทา ไม่พบรอยพับย่น สีของอาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง เมื่อคุณลักษณะเส้นใยและโคนิเดียได้กลิ้งจุลทรรศน์พบ conidiophore แยกออกจาก hyphae และที่ปลาย conidiophore พบ phialide ประมาณ 3-5 phialide พบโคนิเดียมีลักษณะหัวกว้างท้ายแคบคล้ายรูปไข่ขนาดเล็ก เชื้อราที่อยู่ในไอโซเลตนี้มีจำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต J (ภาพที่ 4.9 A-D) ซึ่งมีขนาดความกว้างต่อความยาวของโคนิเดียประมาณ  $1.71 \pm 0.04 \times 2.77 \pm 0.04$  ไมโครเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.1 และเมื่อทำการวัดอัตราการเจริญในระยะเวลา 1 เดือน จะได้ค่าเฉลี่ยโคโลนีของไอโซเลต J เท่ากับ  $86.03 \pm 0.38$  มิลลิเมตร ดังรายละเอียดในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

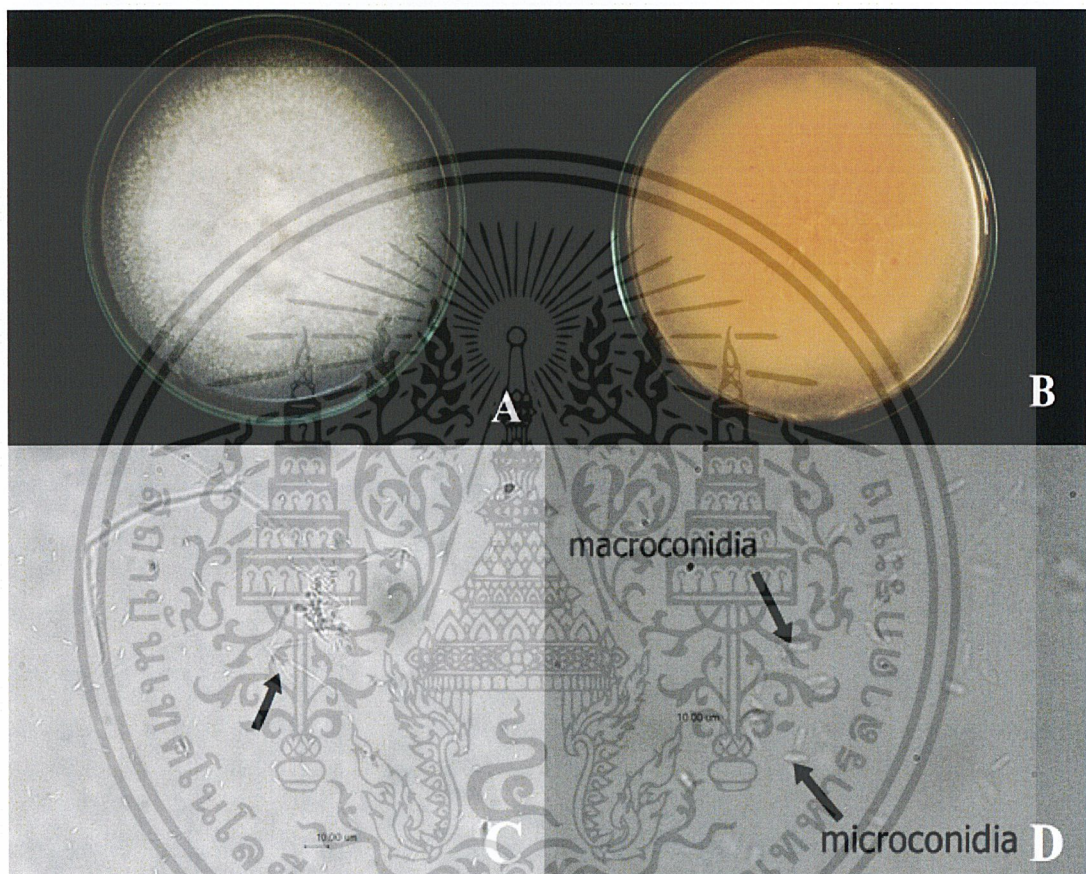


ภาพที่ 4.1 แสดงรูปร่างผลึก; A: ลักษณะผลึกของไอโซเลต A, B และ C; B: ลักษณะผลึกของไอโซเลต H



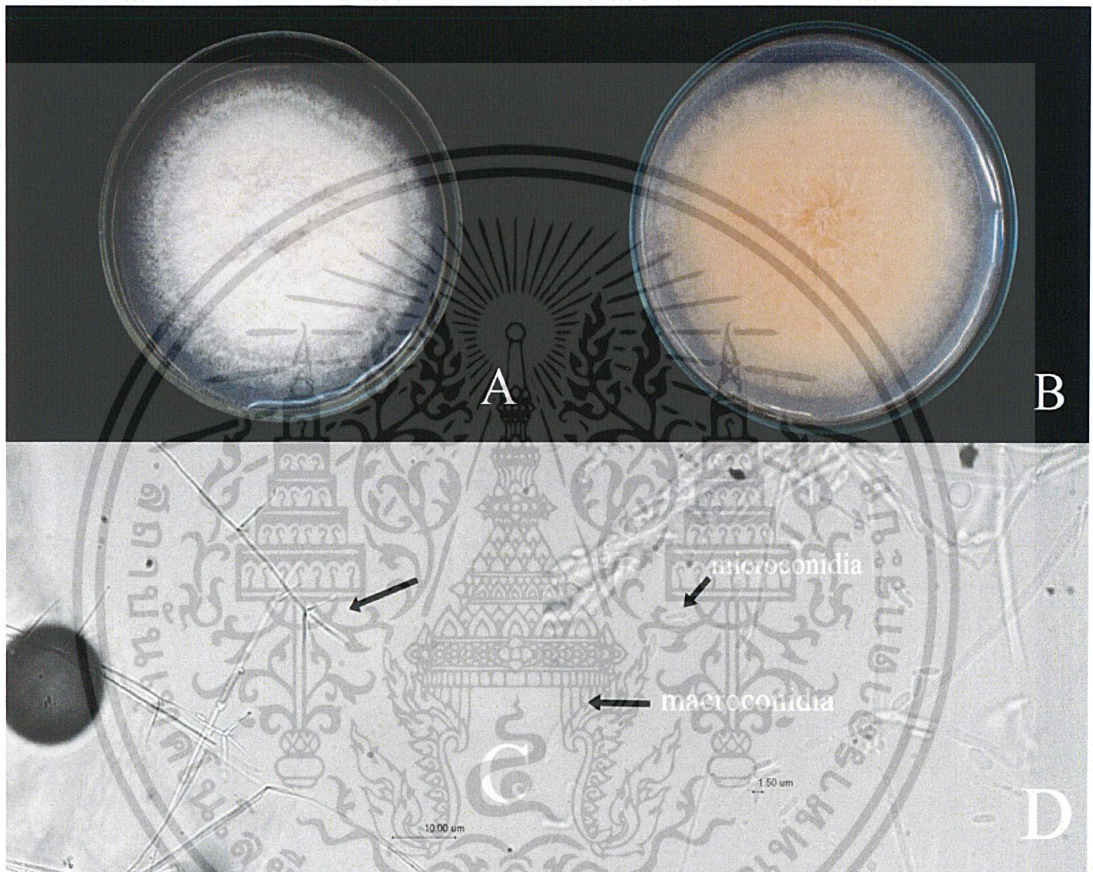
ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต A; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



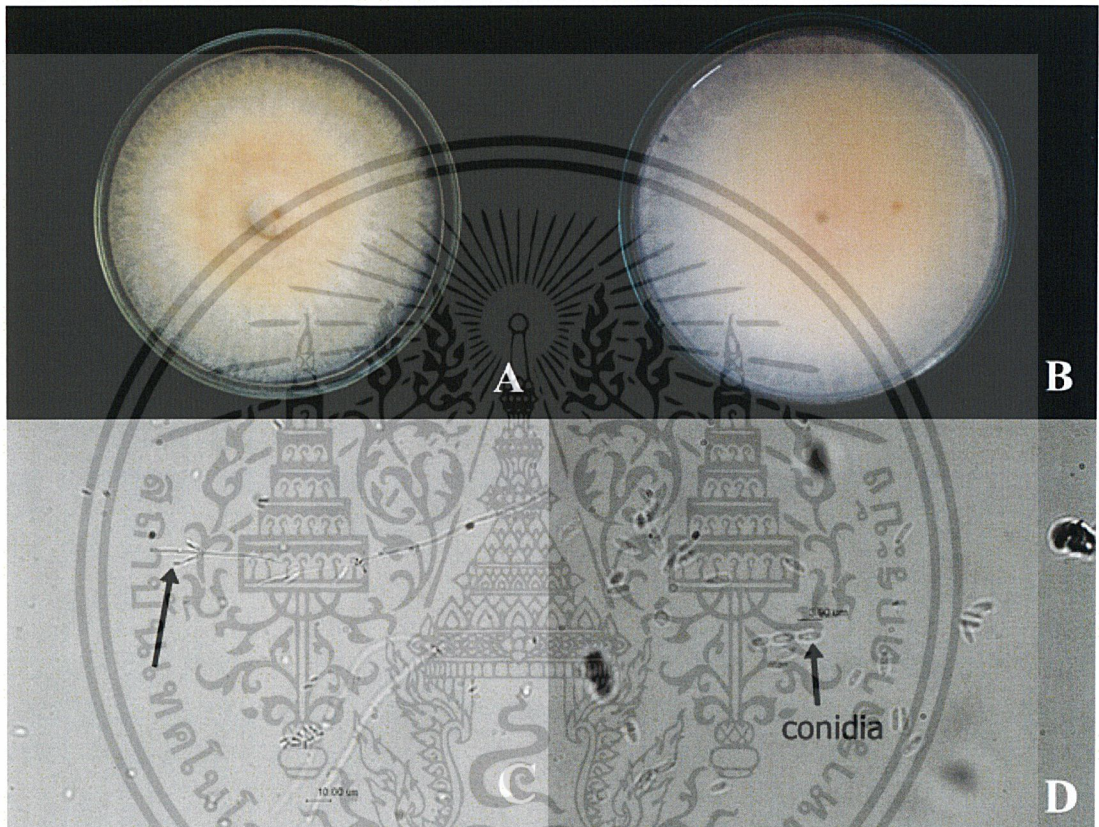
ภาพที่ 4.3 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต B; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



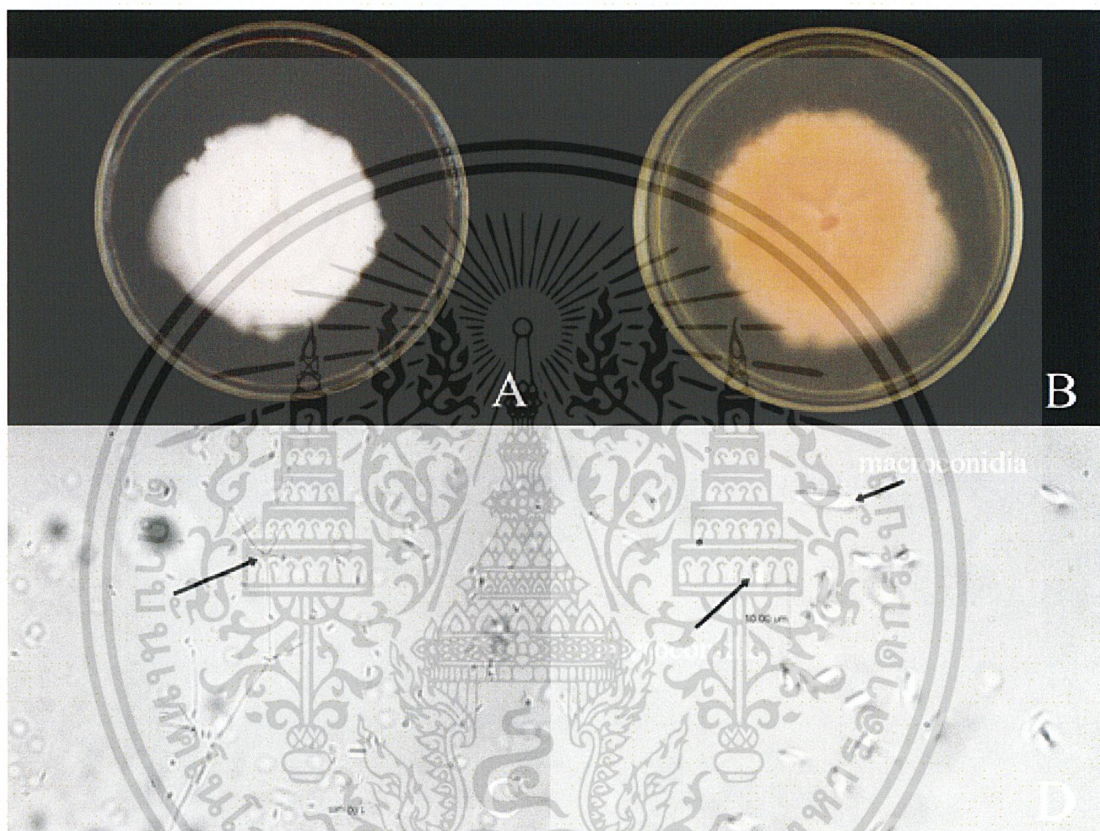
ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต C; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนินเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



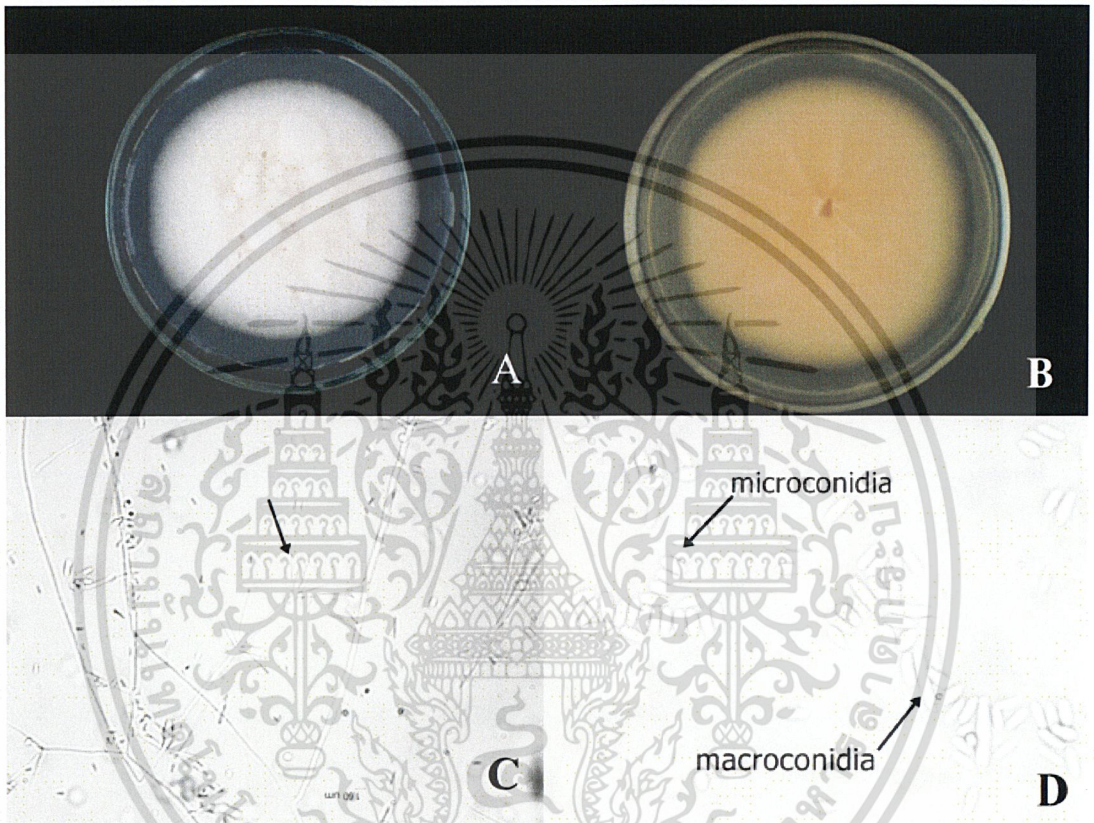
ภาพที่ 4.5 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต D; A: ลักษณะโคโคนีดด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโคนีดด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



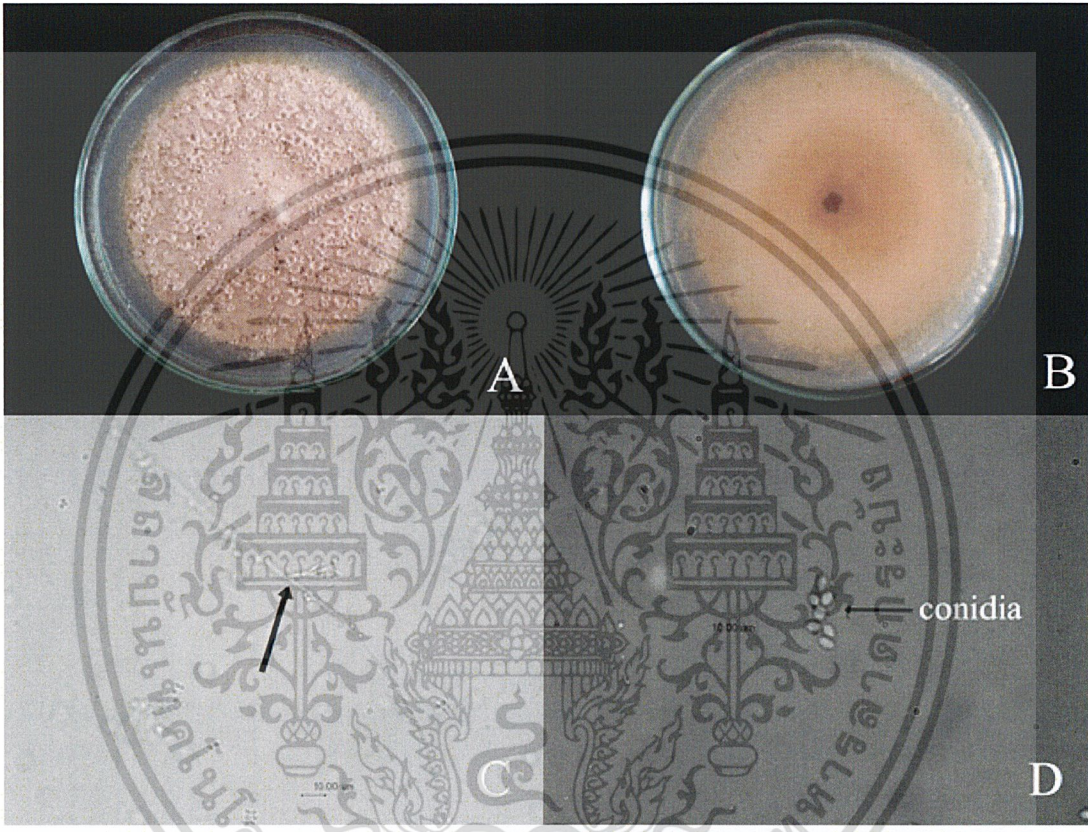
ภาพที่ 4.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต H; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



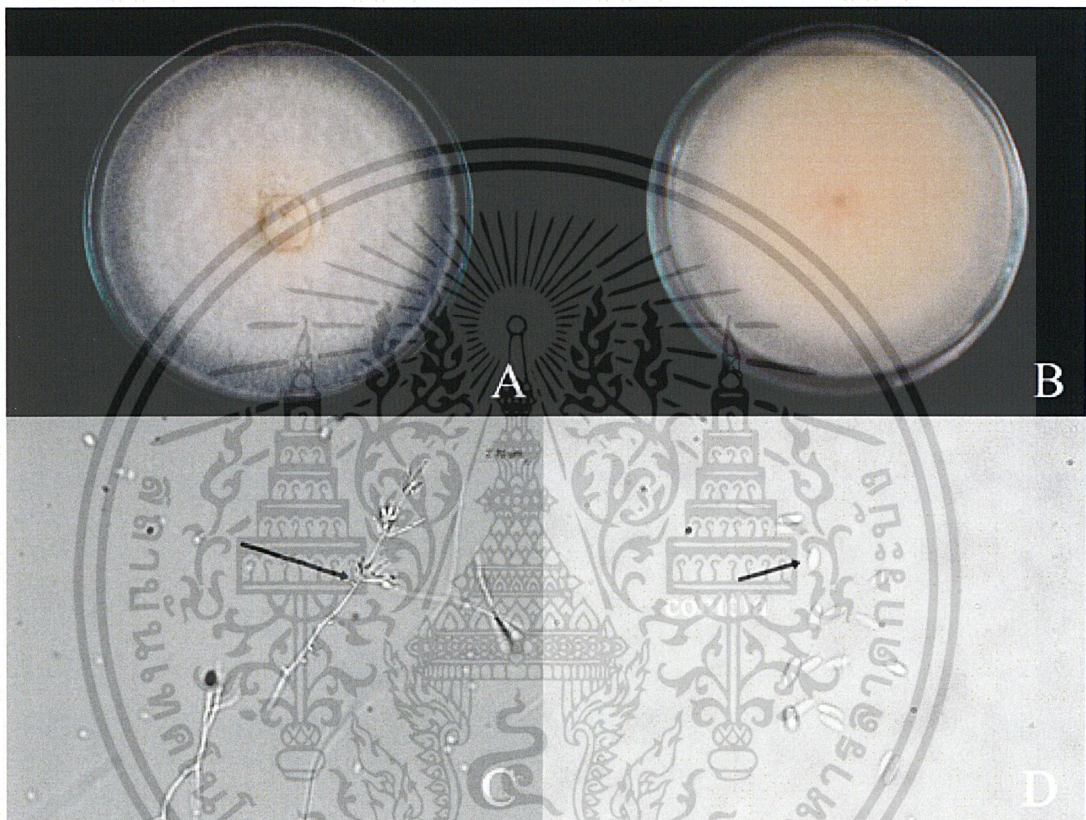
ภาพที่ 4.7 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต I; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต J; A: ลักษณะโคโลนีด้านหน้างานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะโคโลนีด้านหลังงานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนิเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลต K; A: ลักษณะโคโลนีด้านบนจานเพาะเชื้อ; B: ลักษณะ โคโลนีด้านล่างจานเพาะเชื้อ; C: ลักษณะเส้นใย; D: ลักษณะโคนีเดีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุดของความกว้างและความยาวของ โคนิเดียของแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	ความกว้างของโคนิเดีย (ไมโครเมตร)				ความยาวของโคนิเดีย (ไมโครเมตร)			
	เฉลี่ย	± S.E.	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	± S.E.	ต่ำสุด	สูงสุด
A	1.49	0.03	1.20	1.80	4.25	1.98	3.50	6.80
B	1.43	0.03	1.20	1.60	4.27	0.10	3.80	5.40
C	1.78	0.04	1.50	2.20	4.42	0.08	3.70	4.90
D	1.47	0.05	1.20	2.10	3.95	0.07	3.50	4.80
H	1.76	0.09	1.40	3.10	4.67	0.12	3.60	6.10
I	1.41	0.05	1.20	1.90	4.43	0.36	3.30	9.90
J	1.71	0.04	1.40	2.00	2.77	0.04	2.40	3.20
K	1.47	0.04	1.20	1.70	3.89	0.07	3.30	4.50

S.E. หมายถึง ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโคโคนีของเชื้อราแต่ละไอโซเลต

ไอโซเลต	เส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร) $\pm$ S.E.								$\bar{x} \pm$ S.E.
	วันที่ 2	วันที่ 6	วันที่ 10	วันที่ 14	วันที่ 18	วันที่ 22	วันที่ 26	วันที่ 30	
A	15.59 $\pm$ 0.55	27.89 $\pm$ 0.70	36.94 $\pm$ 2.21	44.84 $\pm$ 3.62	50.91 $\pm$ 2.64	64.78 $\pm$ 2.76	74.59 $\pm$ 2.54	81.09 $\pm$ 1.24	84.45 $\pm$ 0.85
B	13.86 $\pm$ 1.87	27.41 $\pm$ 3.73	51.89 $\pm$ 2.36	62.89 $\pm$ 1.65	71.23 $\pm$ 0.76	79.13 $\pm$ 1.02	76.54 $\pm$ 0.85	-	76.71 $\pm$ 1.82
C	9.24 $\pm$ 0.23	25.49 $\pm$ 0.70	43.25 $\pm$ 0.59	51.89 $\pm$ 1.10	59.05 $\pm$ 0.96	65.96 $\pm$ 2.00	71.80 $\pm$ 1.54	-	68.83 $\pm$ 1.45
D	6.92 $\pm$ 0.64	23.60 $\pm$ 0.45	29.25 $\pm$ 0.51	51.86 $\pm$ 0.90	66.62 $\pm$ 1.27	77.38 $\pm$ 1.45	-	-	86.04 $\pm$ 1.09
H	11.08 $\pm$ 0.22	25.49 $\pm$ 1.33	38.76 $\pm$ 3.12	43.95 $\pm$ 4.70	50.33 $\pm$ 6.24	56.28 $\pm$ 4.22	57.44 $\pm$ 3.27	62.63 $\pm$ 5.27	62.63 $\pm$ 5.27
I	9.80 $\pm$ 1.03	23.04 $\pm$ 0.82	24.20 $\pm$ 1.30	38.94 $\pm$ 1.34	44.42 $\pm$ 1.48	49.54 $\pm$ 1.47	56.17 $\pm$ 2.43	-	56.17 $\pm$ 2.43
J	10.54 $\pm$ 0.97	26.13 $\pm$ 0.94	41.73 $\pm$ 1.80	57.04 $\pm$ 2.67	74.05 $\pm$ 2.06	83.61 $\pm$ 0.69	-	-	86.03 $\pm$ 0.38
K	10.39 $\pm$ 0.58	22.54 $\pm$ 0.60	36.69 $\pm$ 0.89	52.09 $\pm$ 0.77	65.04 $\pm$ 0.85	80.55 $\pm$ 0.46	84.02 $\pm$ 0.49	-	84.02 $\pm$ 0.49

- หมายถึง ไม่ได้มีการจดบันทึก

$\bar{x}$  หมายถึง ค่าเฉลี่ย

S.E. หมายถึง ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard Error)

จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง 8 ไอโซเลตนั้น สามารถนำมาสรุปลักษณะโดยรวมได้ ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 สรุปผลลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	ลักษณะโคโลนีในงานเพาะเชื้อที่มีอาหาร PDA		ลักษณะโคนินเดีย	ไอโซเลต
	ด้านหน้า	ด้านหลัง		
1	เส้นใยสีขาวฟู แผ่เป็นวง โคนินเดียมี สีขาวและมีหยดน้ำใส บนเส้นใย	มีสีเหลืองอ่อน อาหารไม่เปลี่ยนสี มีรอยพับย่น	conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-5 conidiophore โคนินเดียมี 2 ขนาด คือขนาดใหญ่และขนาด เล็ก และพบผลึก	A, B, C, H
2	เส้นใยสีขาวฟู แผ่เป็นวง โคนินเดียใน ช่วงแรกมีสีขาวและ เมื่อแก่จะเป็นสีเหลือง อ่อน	มีสีเหลืองอ่อน อาหารไม่เปลี่ยนสี	conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-6 conidiophore มีลักษณะเป็น รูปคนโท และพบโคนินเดียขนาด เดียว	D, K
3	เส้นใยสีขาว ฟูคล้าย สำลี โคนินเดียมีสีขาว และมีหยดน้ำสีเหลือง อ่อนบนเส้นใย	มีสีเหลืองอ่อน อาหารเปลี่ยนสีเป็น สีเหลืองอ่อน เห็นเป็นวงๆ	conidiophore แยกออกจาก hyphae ณ จุดเดียวกัน ประมาณ 3-4 conidiophore และพบ โคนินเดียมี 2 ขนาดคือ ขนาดใหญ่ และขนาดเล็ก	I
4	เส้นใยสีขาวฟู แผ่เป็นวง โคนินเดียมีสี น้ำตาลและมีหยดน้ำ ใสบนเส้นใย	มีสีเทา อาหารไม่เปลี่ยนสี	พบ conidiophore แยกออกจาก hyphae และที่ปลาย conidiophore พบ phialide 3-5 phialide พบ โคนินเดียมีลักษณะ หัวกว้างปลายแคบคล้าย รูปไข่ขนาดเล็ก	J

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.3 ลักษณะของไอโซเลต A, B, C และ H มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราสกุล *Lecanicillium* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Sukarno และคณะ (2009) ที่พบว่าเชื้อราสกุลนี้ conidiophores แยกออกจาก hypae จุดเดียวกัน มีโคนิเดีย 2 ขนาดคือ โคนิเดียขนาดใหญ่ มีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่มีฐานปลายแหลม และ โคนิเดียขนาดเล็กมีลักษณะเป็นทรงกระบอกหัวทำยมน และพบผลึกที่มีลักษณะแวววาว ส่วนลักษณะของไอโซเลต I นั้น แม้ว่ามีลักษณะคล้ายกับเชื้อราสกุล *Lecanicillium* แต่ไม่พบผลึกที่มีลักษณะแวว และอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง ซึ่งไม่ตรงกับลักษณะของเชื้อราสกุล *Lecanicillium* จึงทำให้ไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้ ลักษณะของไอโซเลต D และ K มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราสกุล *Isaria* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Meyer และคณะ (2008) ที่พบว่าเชื้อราสกุลนี้มีลักษณะของโคนิเดียยาวถึงสี่เท่าอัน สีสอาหารได้จากเพาะเชื้อมีลักษณะเรียบ และมีสีเหลืองอ่อน phialide มีอันเดียว ที่ปลายจะเป็น โคนิเดีย ลักษณะของโคนิเดียจะติดกันเป็นสายยาวเป็นจำนวนมาก และลักษณะของไอโซเลต J มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราสกุล *Paecilomyces* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Samson (1974) ที่พบว่าลักษณะของเชื้อราสกุลนี้มีเส้นใยสีเหลืองอมน้ำตาล ถึงสีน้ำตาลซีด conidiophores มีอันเดียว ตั้งตรง ประกอบด้วย phialide 2-5 phialide มีรูปร่างคนโท ส่วน โคนิเดียมีลักษณะต่อกันเป็นสาย รูปไข่ขนาดเล็ก

ดังนั้นสามารถบ่งชี้สกุลได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 สกุล *Lecanicillium* ได้แก่ ไอโซเลต A, B, C และ H กลุ่มที่ 2 สกุล *Isaria* ได้แก่ ไอโซเลต D และ K และกลุ่มที่ 3 สกุล *Paecilomyces* ได้แก่ ไอโซเลต J ดังตารางที่ 4.4 แต่สำหรับไอโซเลต I ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับสกุล *Lecanicillium* แต่ไม่พบผลึกและการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร จึงควรมีข้อมูลในการบ่งชี้สายพันธุ์มากขึ้น

ตารางที่ 4.4 แสดงสกุลของเชื้อราในแต่ละไอโซเลต

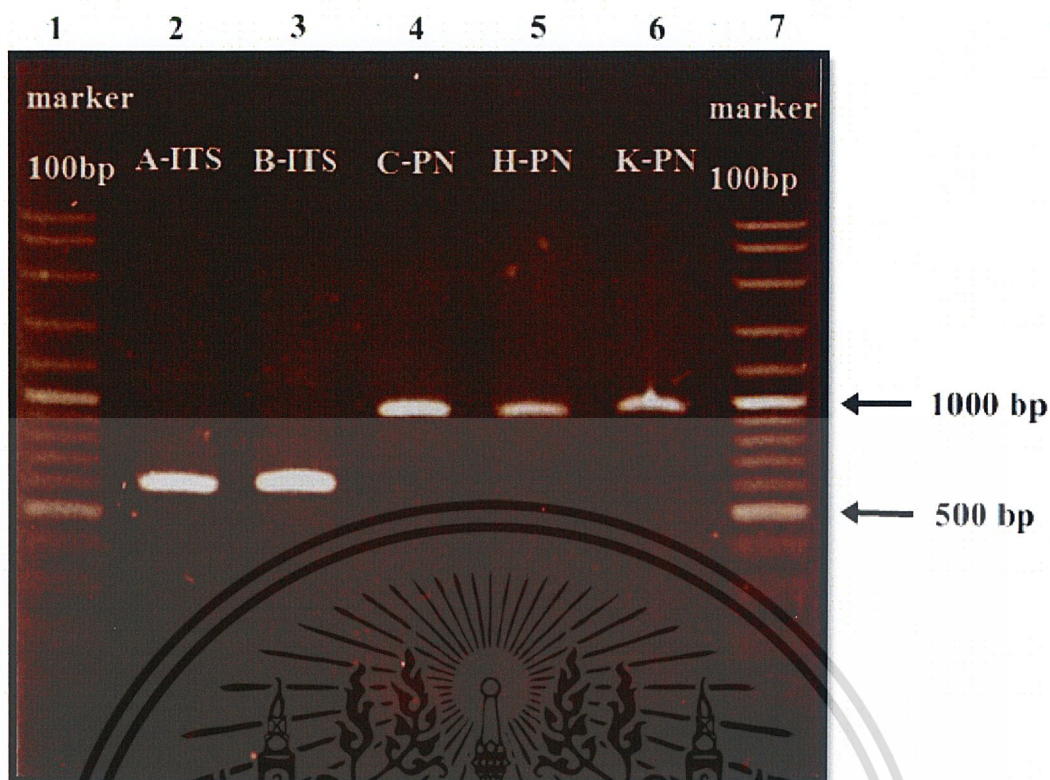
ไอโซเลต	สกุลของเชื้อรา
A	<i>Lecanicillium</i> sp.
B	<i>Lecanicillium</i> sp.
C	<i>Lecanicillium</i> sp.
D	<i>Isaria</i> sp.
H	<i>Lecanicillium</i> sp.
I	ไม่สามารถบ่งชี้สกุลได้
J	<i>Paecilomyces</i> sp.
K	<i>Isaria</i> sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

### 4.2.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดจากเชื้อราทั้ง 8 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 หรือ PN3/PN16 พบว่าไอโซเลต A และ B สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ที่อุณหภูมิ annealing 55 องศาเซลเซียส ส่วนไอโซเลต C, H และ K สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้โดยใช้ไพรเมอร์ PN3/PN16 ที่อุณหภูมิ annealing แตกต่างกัน คือ 46, 46 และ 54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ไอโซเลต D, I และ J ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้ด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ และเมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไอโซเลต A, B, C, H และ K มาตรวจสอบขนาดโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นของอะกาโรสเจลร้อยละ 1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาดช่วง 100 คู่เบส พบว่าไอโซเลต A และ B มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 550 คู่เบส ส่วน C, H และ K มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 960 คู่เบส (ภาพที่ 4.10) ซึ่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไม่สามารถแยกกลุ่มของเชื้อราแต่ละไอโซเลตได้ Park และ Kim (2010) ทำการศึกษาเชื้อรา *Lecanicillium* spp. 7 สายพันธุ์ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันตั้งแต่ 497-517 คู่เบส พบว่าขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้



ภาพที่ 4.10 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แถวที่ 1 และ 7: ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาดช่วง 100 คู่เบส; แถวที่ 2: ไอโซเลต A โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4; แถวที่ 3: ไอโซเลต B โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4; แถวที่ 4: ไอโซเลต C โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16; แถวที่ 5: ไอโซเลต H โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16; แถวที่ 6: ไอโซเลต K โดยใช้คู่ไพรเมอร์ PN3/PN16

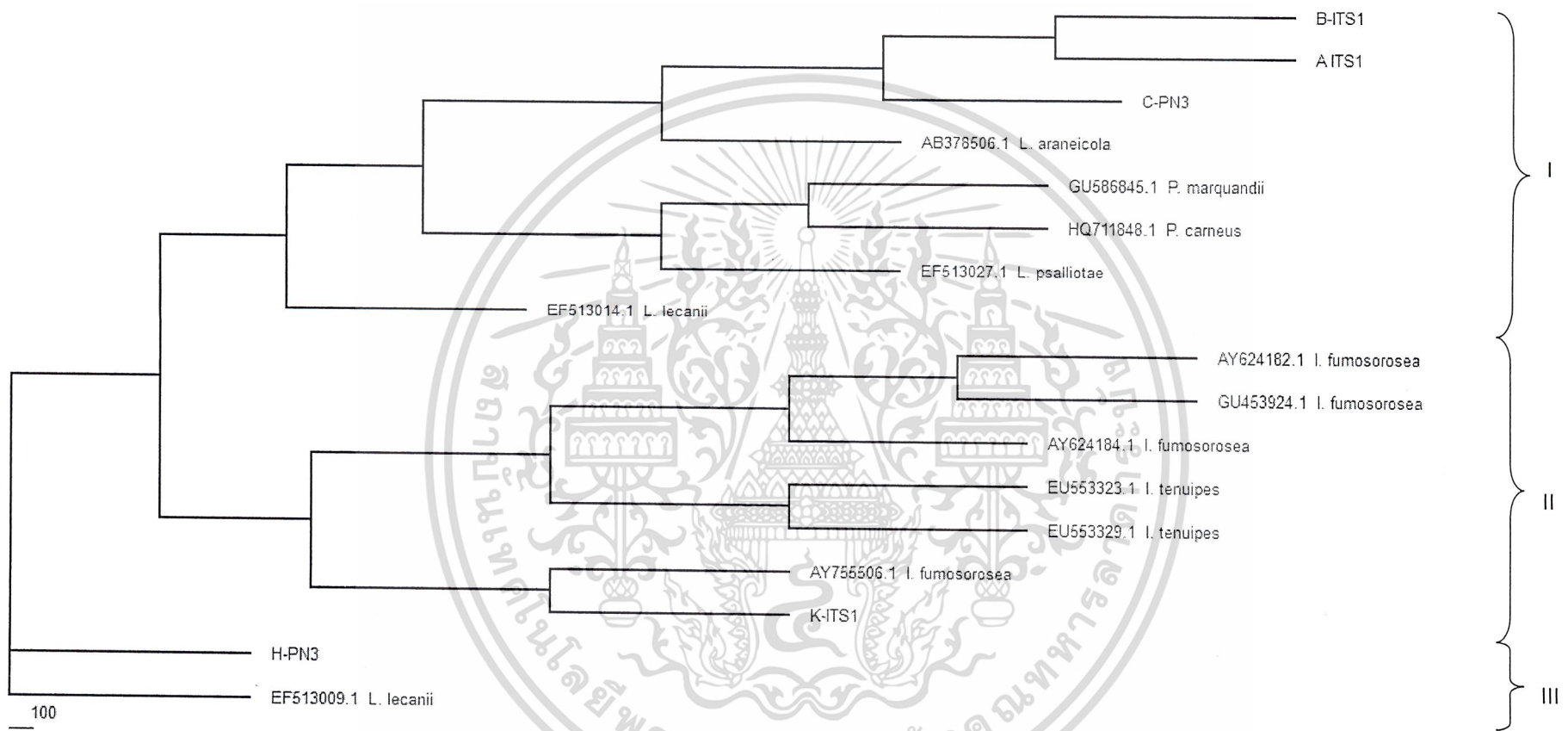
#### 4.2.2 ผลการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างทั้งหมด 5 ไอโซเลตที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 หลังจากทำการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องและทำการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เท่ากันทุกไอโซเลตแล้วจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของทุกไอโซเลตเหลือประมาณ 510 คู่เบส และนำไป BLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า A, B และ C มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Lecanicillium araneicola* โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 96, 95 และ 92 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต H มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Lecanicillium psalliotae* โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99 และไอโซเลต K มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Isaria fumosorosea* โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 99

สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตแบบ multiple alignment และการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มาใช้

เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อราภายในสกุล *Lecanicillium* 4 ตัวอย่าง เชื้อราภายในสกุล *Isaria* 6 ตัวอย่าง และเชื้อราภายในสกุล *Paecilomyces* อีก 2 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1 และแผนภูมิเชิงวิวัฒนาการ (ภาพที่ 4.11) สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 มีไอโซเลต A, B และ C ซึ่งอยู่ในสกุล *Lecanicillium* กลุ่ม 2 มีไอโซเลต K ซึ่งอยู่ในสกุล *Isaria* และกลุ่ม 3 มีไอโซเลต H ซึ่งอยู่ในสกุล *Lecanicillium* พบว่า กลุ่ม 1 และกลุ่ม 3 อยู่ในสกุลเดียวกันคือสกุล *Lecanicillium* แต่ที่แยกออกจากกันอาจเป็นเพราะเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไอโซเลต H มีผลึกขนาดใหญ่กว่าของไอโซเลต A, B และ C ทั้งนี้ไม่สามารถที่จะสรุปได้อย่างแน่ชัดว่าเป็นสปีชีส์ที่ต่างกัน เนื่องจากผลการทดลองมีข้อมูลไม่เพียงพอต่อการแยกสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Lecanicillium* เพราะขาดข้อมูลหลายๆอย่างที่จำเป็นในการบ่งชี้สปีชีส์หรือสายพันธุ์ เช่น ความยาวของ phialide ขนาดของผลึกและลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นๆที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เช่น ไมโทคอนเดรีย และบนไรโบโซมตำแหน่งอื่น ข้อมูลเหล่านี้จะทำให้เราสามารถแยกสปีชีส์ของแต่ละไอโซเลตได้

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่แยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาลทั้ง 10 ไอโซเลต ในตอนเก็บตัวอย่างลักษณะของเชื้อราที่ปกคลุมบนตัวแมลงมีลักษณะเป็นสีขาวเหมือนกันทั้ง 10 ไอโซเลต ซึ่งน่าจะเป็นเชื้อราสายพันธุ์เดียวกัน แต่เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงแตกต่างกันได้ถึง 4 กลุ่ม และเมื่อนำมาศึกษาโดยเทคนิคทางโมเลกุล โดยศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าเป็นเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่แตกต่างกันถึง 3 กลุ่ม ซึ่งการที่แยกเชื้อราจากแมลงชนิดเดียวกัน และบริเวณเดียวกัน จะต้องได้เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงที่คล้ายคลึง



ภาพที่ 4.11 แสดงแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการบริเวณตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา 5 ไอโซเลต (ไอโซเลต A, B, C, H และ K) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank

## บทที่ 5

### สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

จุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้เพื่อจำแนกสายพันธุ์เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคในแมลงจำนวนทั้งหมด 10 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โดยนำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเพาะเลี้ยงได้เพียง 8 ไอโซเลต และไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้อีก 2 ไอโซเลตคือ F และ G นำทั้ง 8 ไอโซเลตมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 สกุล คือ สกุล *Lecanicillium* ได้แก่ ไอโซเลต A, B, C และ H สกุล *Isaria* ได้แก่ ไอโซเลต D และ K และสกุล *Paecilomyces* มีไอโซเลต J เพียงไอโซเลตเดียว จากนั้นนำศึกษาดเวยเทคนิคระดับโมเลกุลบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 หรือ PN3/PN16 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพียง 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต A, B, C, H และ K ส่วนไอโซเลต D, I และ J ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ได้ ไอโซเลต A, B และ K ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS1/ITS4 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ 550 คู่เบส ส่วนไอโซเลต C และ H เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ PN3/PN16 จึงมีขนาดของดีเอ็นเอ 960 คู่เบส นำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าไอโซเลต A, B และ C เป็นเชื้อรา *Lecanicillium araneicola* ไอโซเลต H เป็นเชื้อรา *Lecanicillium psalliotae* และไอโซเลต K เป็นเชื้อรา *Isaria fumosorosea* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และนำมาหาความสัมพันธ์ในแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับเชื้อราจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมดจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อราภายในสกุล *Lecanicillium* 4 ตัวอย่าง เชื้อราภายในสกุล *Isaria* 6 ตัวอย่าง และเชื้อราภายในสกุล *Paecilomyces* อีก 2 ตัวอย่าง สามารถแบ่งเชื้อราออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม 1 มีไอโซเลต A, B และ C ซึ่งอยู่ในสกุล *Lecanicillium* กลุ่ม 2 มีไอโซเลต K ซึ่งอยู่ในสกุล *Isaria* และกลุ่ม 3 มีไอโซเลต H ซึ่งอยู่ในสกุล *Lecanicillium* พบว่ากลุ่ม 1 และกลุ่ม 3 อยู่ในสกุลเดียวกันคือ *Lecanicillium* แต่อาจมีสปีชีส์ต่างกัน

โดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยานั้น ควรมีการศึกษาความยาวของ phialide ขนาดของผลึก เพิ่มเติม รวมทั้งการศึกษาในระดับโมเลกุล ควรศึกษาในตำแหน่งและเทคนิคอื่นๆ ควบคู่กัน เพื่อการบ่งชี้สายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- ดวงกมล ทองอร่าม, วุฒิพงศ์ มหาคำ และศกาทวูช นามดี. 2548. การจำแนกพืชสกุล *Caulokaempferia* K. Larsen (วงศ์ขิง) โดยการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากข้อมูลทางชีววิทยาระดับ โมเลกุล. วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีที่ 10 ฉบับที่ 1: หน้า 5-12.
- นฤมล ตั้งธีระสุนันท์. 2552. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วินันท์คำ หิมะมาน, กิตติมา ด้วงแคะ, จันจิรา อายะวงษ์, กฤษณา พงษ์พานิชและ จิรพรรณ โสภี. 2551. การสำรวจเบื้องต้นของความหลากหลายของราทำลายแมลงและแมงมุมในระบบนิเวศป่าดิบชื้นห้วยและป่าเต็งรัง เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเชียงดาว จ.เชียงใหม่. สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.
- ศุวิชา อึ้งตระกูล. 2552. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Beauveria* ที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงด้วยเทคนิคทางโมเลกุล. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- อภิญา วงษ์แก้ว ศิวาลัย สิริมังครรัตน์ วีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์ และ Nigel Hywel-jones. 2545. ความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อราที่ทำลายแมลงในเขตอุทยานแห่งชาติน้ำหนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.
- Aung, O.M., Soyong, K. and Hyde, K.D. 2008. Diversity of entomopathogenic fungi in rainforest of Chiang Mai Province, Thailand. *Fungal Diversity* 30: 15 -22.
- Cooke, M.C. 1892. Vegetable wasp and plant worms. Society for promoting Christian knowledge: London.
- Evans, H.C. 1982. Entomogenous fungi in tropical forest ecosystems and appraisal. *Ecological Entomology* 7: 47-60.
- Fargues, J., Bon, M.-C., Manguin, S. and Couteaudier, Y. 2002. Genetic variability among *Paecilomyces fumosoroseus* isolates from various geographical and host insect origins based on the rDNA-ITS regions. *Mycological Research* 106 (9): 1066-1074.
- Farrag, R.M., Mokhtar, M.M. and Abulhamd, A. 2009. Phylogenetic analyses of *Verticillium fungicola* varieties based on molecular and secondary metabolite profile. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 3(2): 880-890.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น คือทั้งหมดยุติให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Gaitan, A., Valderrama, A.M., Saldarriaga, G., Velez, P. and Bustillo, A. 2002. Genetic variability of *Beauveria bassiana* associated with the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei* and other insect. *Mycological Research* 106 (11): 1307-1314.
- Hsieh, L.S., Tzean, S.S. and Wu, W.T. 1997. The genus *Akanthomyces* on spiders from Taiwan. *Mycological* 89 (2): 319-324.
- Hunter, D.M., Milner, R.J., Scanlan, J.C. and Spurgin, P.A. 1999. Aerial treatment of the migratory locust, *Locustamigratoria* (L.) (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Crop Protection* 18: 699-704.
- Hunter, D.M., Milner, R.J. and Spurgin, P.A. 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetesterminifera* (Orthoptera: Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Bulletin of Entomological Research* 91: 93-99.
- Hywel-Jones, N. 1995a. *Cordyceps sphecocephala* and a *Hymenostilbe* sp. Infecting wasp and bee in Thailand. *Mycological Research* 99 (2): 154-158.
- Hywel-Jones, N. 1995b. *Hymenostilbe vertricosa* sp. nov. a pathogen of cockroaches in Thailand. *Mycological Research* 99 (10): 1201-1204.
- Hywel-Jones, N. 1997. *Torrubiella petchii*, a new species of scale insect pathogen from Thailand. *Mycological Research* 101 (2): 143-145.
- Inglis, P.W. and Tigano, M.S. 2006. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp. (Ascomycota) isolates using rDNA-ITS Sequences. *Genetics and Molecular Biology* 29 (1): 132-136.
- Kouvelis, V.N., Sialakoum, A. and Tupa, M.A. 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species. *Mycological Research* 112: 829 – 844.
- Luangsa-ard, J.J., Hywel-Jones, N.L. and Samson, R.A. 2005. On the relationships of *Paecilomyces* sect. *Isarioidea* species. *Mycological Research* 109: 581-589.
- Luangsa-ard, J.J., Tسانathai, K., Mongkolsamrit, S. and Hywel-Jones, N. 2009. Atlas of Invertebrate Pathogenic Fungi of Thailand Volume 1-2. Thailand: Pathumthani.
- Lomer, C.J., Prior, C. and Kooyman, C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshopper 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 grasshopper. *Annual Review Entomology* 46: 667-702.

เอกสาร และ grasshopper. อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Martin, K.J. and Rygiewicz, P.T. 2005. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BioMed Central Microbiology* 5: 28.
- Meyer, J.M., Hoy, M.A. and Boucias, D.G. 2008. Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 96–102.
- Milner, R.J. 1997. Insect pathogens how effective are they against soil insect pests? In: Allsopp, P.G., Rogers, D.J., Robetson, L.N. (Eds.), *Soil Invertebrates in 1997*. In: *Proceedings of the Third Brisbane Workshop on Soil Invertebrates*. Bureau of Sugar Experiment Station. Brisbane Paddington, Australia, pp. 63-67.
- Milner, R.J. and Pereire, R.M. 2000. Microbial control of urban pests cockroaches, ants and termites. In: Lacey, L.A., Kaya, H.K. (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrates Pathology*. Kluwer Academic Publisher, Boston, pp. 721-740.
- Park, H. and Kim, K. 2010. Selection of *Lecanicillium* Strains with High Virulence against Developmental Stages of *Bemisia tabaci*. *Mycobiology* 38(3): 210-214.
- Samson, R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Centralalbureau voor Schimmelcultures in Baarn. p. 106-113.
- Samson, R.A., Evans, H.C. and Latge, J.-P. 1988. *Atlas of entomopathogenic fungi*. Springer-Verlag: Utrecht.
- Sukarno, N., Kurihara, Y., Ilyas, M., Manguwardoyo, W., Yuniarti, E., Sjamsuridzal, W., Park, J.-Y., Saraswati, R., Inaba, S., Widyastuti, Y., Ando, K. and Harayama, S. 2009. *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience* 50: 369–379.
- Zare, R. and Gams, W., 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research*, 112: 811-824.
- [Online]. Available: <http://www.biotech.or.th/TH/images/stories/IU/document/8/5.pdf> (23 ตุลาคม 2553)
- [Online]. Available: <http://www.biotech.or.th/TH/images/stories/IU/document/8/6.pdf> (23 ตุลาคม 2553)
- [Online]. Available: <http://fmel.ifas.ufl.edu/buzz/images/pcr.jpg> (23 ตุลาคม 2553)
- [Online]. Available: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot\\_rdna.png](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Eucaryot_rdna.png) (23 ตุลาคม 2553)
- [Online]. Available: <http://www.dnp.go.th/foremic/fmo/insectfungi.htm> (23 ตุลาคม 2553)
- [Online]. Available: <http://www.vcharkarn.com/varticle/368> (14 มีนาคม 2554)
- [Online]. Available: <http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISCELLANEOUS/nov01.htm> (22 มีนาคม 2554) การค้า
- [Online]. Available: <http://www.neemproducts.com/paecilomyces.htm> (22 มีนาคม 2554) ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available: [http://www.runetwork.de/html/en/index.html?article\\_id=4503](http://www.runetwork.de/html/en/index.html?article_id=4503) (22 มีนาคม 2554)

[Online].Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> (19 เมษายน 2554)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ส่วนประกอบใน 1000 มิลลิลิตร

มันฝรั่ง	200.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
วุ้น	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่น้ำกลั่นลงไป 800 -1000 มิลลิลิตร นำไปต้มประมาณหนึ่งชั่วโมงหรือจนกว่ามันฝรั่งสุก แล้วนำมากรองเพื่อเอาเศษมันฝรั่งออก จากนั้นจึงใส่ D (+) glucose 20 กรัม และใส่วุ้น โดยทำการละลายวุ้นในน้ำกลั่นก่อนเพื่อไม่ให้วุ้นเป็นก้อน เมื่อวุ้นละลายจนหมดแล้วจึงใส่ลงไป ในน้ำมันฝรั่ง ต้มให้เดือดอีกครั้ง ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB)

ส่วนประกอบใน 1000 มิลลิลิตร

มันฝรั่ง	200.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งมันฝรั่ง 200 กรัม นำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่น้ำกลั่นลงไป 800-1000 มิลลิลิตร นำไปต้มประมาณหนึ่งชั่วโมงหรือจนกว่ามันฝรั่งสุก แล้วนำมากรองเพื่อเอาเศษมันฝรั่งออก จากนั้นจึงใส่ D (+) glucose 20 กรัม และนำไปต้มให้เดือดอีกครั้ง ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

#### สารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10 เท่า

ส่วนประกอบใน 500 มิลลิลิตร

Tris base	108.0	กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร
Boric acid	55.0	กรัมต่อ 500 มิลลิลิตร

ชั่ง Tris base 108 กรัม และชั่ง Boric acid 55 กรัม ละลายสารที่ชั่งทั้ง 2 ในสารละลาย EDTA ที่มี pH เท่ากับ 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลาย EDTA ที่มี pH เท่ากับ 8 เข้มข้น 0.5 M ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ช่วยในการละลาย โดยสามารถให้ความร้อนได้เล็กน้อย ปรับให้ได้ pH เท่ากับ 8 และปรับปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

การเตรียมเอซีเดียมโบรไมด์

นำสารละลาย เอซีเดียมโบรไมด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้ และนำสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ภาชนะแล้วทำการผสมให้เข้ากัน และเก็บให้พ้นแสง

การเตรียมไพรมอร์

สารละลายไพรมอร์เริ่มต้นมีความเข้มข้น A นาโนโมลต่อมิลลิลิตร (หรือ A พิโคโมลต่อไมโครลิตร) ต้องการเตรียมไพรมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จำนวนจากสูตร

$$\begin{aligned} N_1 V_1 &= N_2 V_2 \\ (A) V_1 &= (20) (50) \\ V_1 &= \frac{(20)(50)}{A} \text{ ไมโครลิตร} \end{aligned}$$

ดังนั้นต้องดูดสารละลายไพรมอร์เริ่มต้นมา  $\frac{(20)(50)}{A}$  ไมโครลิตร และเติมน้ำปราศจากไอออน

ปริมาตร  $50 - \left[ \frac{(20)(50)}{A} \right]$  ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ข

### การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

#### เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (Electrophoresis)

เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร, w/v) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า วางลงบนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า เทสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า ให้ท่วมผิวหน้าอะกาโรสเจล แล้วจึงจุดสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมปริมาตร 1 ไมโครลิตร และนำปราศจากไอออน 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงหยอดลงในหลุมอะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ปล่อยกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปบวก โดยใช้ความต่างศักย์ (voltage) คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 25 นาที หรือจนกระทั่งสังเกตเห็นสีย้อมเคลื่อนที่ไปประมาณร้อยละ 80 ของความยาวของเจล นำอะกาโรสเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ออกโดยการนำอะกาโรสเจลแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบการเรืองแสงของดีเอ็นเอภายใต้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

#### การวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density; OD)

วัดค่าการดูดกลืนแสงหรือค่า OD ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เพื่อตรวจสอบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำการเจือจาง 100 เท่า (dilution factor เท่ากับ 100) ด้วยการดูดน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 495 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติมสารละลายดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ โดยดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.65-2.00 นำค่าความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้

จากค่ามาตรฐาน ถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตรได้เท่ากับ 1 แสดงว่ามีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั่นคือ

ค่า OD เท่ากับ 1 มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค่า OD เท่ากับ A มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอ  $A \times 50$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร --- (1)

ในการวัดค่า OD นี้ ได้นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจาง 100 เท่า ดังนั้นค่า dilution factor เท่ากับ 100 ต้องนำไปคูณกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่คำนวณได้ (1) เพื่อให้ได้ค่าปริมาณดีเอ็นเอจริงทั้งหมด นั่นคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\begin{aligned} \text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด} &= A \times 50 \times 100 \text{ (dilution factor)} \\ &= B \text{ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร --- (2)} \end{aligned}$$

เมื่อ  $A =$  ค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร

$B =$  ความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

เมื่อทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอทั้งหมดแล้ว จึงนำมาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ในเทคนิคพีซีอาร์ในหน่วยไมโครลิตร โดยต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม (1000 นาโนกรัม) มีวิธีการคำนวณดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ = 1 มิลลิลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ B ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ = 1000 ไมโครลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ =  $1000 / B$  ไมโครลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม ต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอ =  $C$  ไมโครลิตร --- (3)

ดังนั้น หากต้องการปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการทำเทคนิคพีซีอาร์ โดยถ้าวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ได้เท่ากับ  $A$  และคำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอได้เท่ากับ  $B$  ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะต้องคูณสารละลายดีเอ็นเอเท่ากับ  $C$  ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### โปรแกรม BioEdit

โปรแกรม BioEdit (biological sequence editor) ถูกพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1997 โดย Tom Hall ซึ่งขณะนั้นศึกษาอยู่ในแผนกจุลชีววิทยา ในมหาวิทยาลัย North Carolina State ของประเทศสหรัฐอเมริกา โปรแกรม BioEdit ใช้คำสั่งภาษาซี เป็นพื้นฐานหลักในการทำงาน โดยออกแบบมาให้สามารถทำงานกับระบบปฏิบัติการวินโดวส์ตั้งแต่เวอร์ชัน 95/98/Me/NT/2000 และ XP ได้เป็นอย่างดีโดยกำหนดความต้องการขั้นต่ำของโปรแกรมที่แนะนำอยู่ที่หน่วยประมวลผล CPU ตั้งแต่รุ่น Pentium ขึ้นไป หน่วยความจำอย่างต่ำ 32 เมกกะไบต์ พื้นที่ว่างประมาณ 30-40 เมกกะไบต์

นอกจากคุณสมบัติเด่นของตัวซอฟต์แวร์ที่เป็น freeware (สามารถดาวน์โหลดมาใช้งานได้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย) ที่มีวิธีการใช้ไม่ยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังมีลักษณะของส่วนติดกับผู้ใช้แบบ graphic interface ทำให้โปรแกรมง่ายต่อการใช้งานแล้ว โปรแกรม BioEdit ยังได้รวบรวมความสามารถและแอปพลิเคชันต่างๆ ที่ช่วยในการศึกษาวิเคราะห์ทั้งด้านนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ และ โปรตีนซึ่งเป็นประโยชน์กับนักชีววิทยาเอาไว้เป็นจำนวนมากซึ่งในที่นี้จะยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

- โปรแกรม BioEdit สามารถรองรับ interput file ที่นำมาศึกษาได้หลายรูปแบบ (format) เช่น fasta phylip genbank เป็นต้น
- มีคุณสมบัติ multiple document interface คือ สามารถเปิดหน้าต่างการทำงานขึ้นมาด้วยกันได้เป็นจำนวนมากที่สุดถึง 20 หน้าต่างการทำงาน และสามารถทำงานกับจำนวนนิวคลีโอไทด์มากกว่า 20000 คู่เบสในคราวเดียว
- โปรแกรมมีความยืดหยุ่นสูงในการศึกษาด้านลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) การเปรียบเทียบดีเอ็นเอ (alignment) ยกตัวอย่างเช่น Select/Slide, Geab/Drag, Edit Mode ซึ่งทำให้สะดวกในการตัดแปลงแก้ไขผลของการทำงาน Manual หรือ Computational sequence alignment
- ในการศึกษาการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โปรแกรม BioEdit ก็มีเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ในแง่ของ comparative analysis และ multual information analysis
- ในการศึกษาการวิเคราะห์โปรตีน โปรแกรมสามารถช่วยวิเคราะห์ได้ทั้งการหาส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) คุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีน
- โปรแกรม BioEdit ยังได้รวบรวมแอปพลิเคชันต่างๆ ที่นิยมใช้ทางด้านชีวสารสนเทศ ซึ่งสามารถเชื่อมการทำงานผ่าน graphic interface ของโปรแกรม BioEdit ได้โดยอัตโนมัติ เช่น ClustalW ซึ่งช่วยในการศึกษาด้าน Computational sequence alignment หรือ PHYLIP application ซึ่งช่วยในการศึกษาด้านแผนภูมิวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ผู้ใช้สามารถกำหนดการเชื่อมต่อกับแอปพลิเคชันอื่นๆ ที่ต้องการ โดยกำหนดพารามิเตอร์ที่มีอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ความสามารถในการเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ทางด้านชีวสารสนเทศ (World Wide Web bookmark) ผ่านอินเทอร์เน็ตซึ่งผู้ใช้สามารถกำหนดได้

### การใช้งานทั่วไปของ BioEdit

หน้าต่างการทำงานพื้นฐาน หรือเรียกว่า basic BioEdit alignment document window ซึ่งไม่ว่าจะเป็น แบบอักษร (font) สีของพื้นหลัง (background color) สีตัวอักษร (residues color) และชื่อของนิววินโดว์ (title window) ผู้ใช้สามารถทำการเปลี่ยนแปลงรูปแบบให้เหมาะสมตามการใช้งานได้

ยกตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงทางคุณสมบัติ โดยผู้ใช้จะสังเกตได้ว่าเมื่อนำเมาส์ไปชี้ที่ตำแหน่งอักษรตัวใดตัวหนึ่งในลำดับนิวคลีโอไทด์ จะปรากฏกรอบข้อความสีเหลืองซึ่งจะมีรายละเอียดของชื่อลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่ง (position) ระบุอยู่ซึ่งสร้างความสะดวกเมื่อทำการศึกษาในด้านต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผู้ใช้สามารถกำหนดขยกลีฟกึ่งขึ้นดังกล่าวได้โดยเลือกเข้าไปที่คำสั่ง sequence position by mouse arrow เป็นต้น

ในส่วนของฟังก์ชันชุดคำสั่งที่เกี่ยวข้องกับการทำ manual alignment ประกอบไปด้วย

Select/ Slide mode: เป็นโหมดที่ผู้ใช้สามารถเลือกการทำงานกับจำนวนข้อมูล (residues) ได้ครั้งละหลายๆ ใช้ลักษณะของ box selection โดยใช้ left click ของ mouse เป็นตัวกำหนดค่า default ที่โปรแกรมกำหนดไว้ การเคลื่อนที่ของช่วงข้อมูล (residues box) จะสามารถไปแทนที่ unlock gap ที่อยู่รอบๆ box กรณีมีอยู่ได้ วิธีแก้ไขคือให้กด shift key ค้างเอาไว้ ขณะทำการเคลื่อนย้ายข้อมูล หรือใช้ speed button เป็นตัวกำหนด ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อ speed button และ tool bar ในลำดับต่อไป ส่วนในกรณีที่ผู้ใช้ต้องการเลือกช่วงข้อมูลที่ไม่ได้อยู่ติดกันให้ใช้วิธีการกด Ctrl key ค้างเอาไว้ระหว่างทำการเลือกช่วงข้อมูลต่างๆ

Edit mode: การใช้งานในโหมดนี้ ผู้ใช้สามารถเลื่อนเคอร์เซอร์ที่เกิดการคลิกซ้าย ไปยังบริเวณใดก็ได้ในช่วงใดก็ได้ในช่วงข้อมูลที่สนใจ และสามารถทำการเปลี่ยนแปลงแก้ไข โดยประกอบไปด้วย 2 โหมดย่อยคือ insert และ overwrite

Grab/ Drag mode: สามารถเลือกที่ speed button ที่ปุ่ม G/D ได้เป็นโหมดที่ผู้ใช้สามารถเลือกการเคลื่อนที่ข้อมูล (residue) ครั้งละ 1 ตัวเท่านั้นเช่นกันสามารถใช้ shift key ในการเลือกให้ช่วงข้อมูลที่อยู่ด้านหลังตัวที่เลือกเคลื่อนที่ไปพร้อมๆ กัน ได้

### โปรแกรม PHYLIP

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบันนี้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก ในแง่ของ Phylogenetic tree building method ซึ่งในที่นี้จะยกตัวอย่างเครื่องมือชีวสารสนเทศซึ่งเป็นที่นิยมมากคือ PHYLIP Package ด้วยความสามารถของโปรแกรมที่ดาวน์โหลดมาใช้สามารถปรับแต่งค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ตามต้องการ ทำให้รับรองการศึกษาในด้านการศึกษาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree analysis) ทุกรูปแบบ

## 1. รายละเอียดของโปรแกรม

โปรแกรม PHYLIP เป็นลักษณะของโปรแกรมที่ใช้งานได้โดยไม่เสียค่าบริการถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein ซึ่งขณะนั้นศึกษาอยู่ในคณะ Genome Science ที่ Washington University ส่วนเวอร์ชันที่นำมายกตัวอย่างนี้คือ 3.6 alpha อัปเดตเมื่อ 29/07/02 สนับสนุนการทำงานในระบบปฏิบัติการ Window 3.x/9x/Me/NT/XP, DOS, PowerMac and 68k Macintosh systems

โปรแกรม PHYLIP ประกอบไปด้วย Phylogenetic analysis method มากมาย เช่น Distance matrix, Pasimony method อีกทั้งยังมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงานอีกด้วย แต่เนื่องจากโปรแกรม PHYLIP ถูกออกแบบมาให้ทำงานในลักษณะของ DOS โหมด อีกทั้งรายละเอียดที่กำหนดยังมีเป็นจำนวนมาก เช่น ต้องทำการเปลี่ยนชื่อไฟล์ที่จะนำมาใช้กับแอปพลิเคชันของ PHYLIP เป็นชื่อ infile ทุกครั้งทำให้ผู้เริ่มต้นใช้อาจเกิดความไม่คุ้นเคยได้

2. เนื่องจากตัวอย่างจะนำหลักการของ Phylogenetic tree construction ด้วยวิธี distance matrix method มาอธิบายจึงขอทำความเข้าใจในส่วนของขั้นตอนสำคัญซึ่งมีดังต่อไปนี้

2.1 การทำการเปรียบเทียบจัดเรียงลำดับ (alignment) ของข้อมูลทั้งหมดด้วยโปรแกรมอื่นๆ เช่น ClustalW, ClustalX เป็นต้น

2.2 การเลือก substitution model ที่เหมาะสมกับข้อมูล ซึ่งในตัวอย่างจะเลือก Distance matrix method

2.3 ขั้นตอนของ tree construction โดยอาศัยแอปพลิเคชันของ PHYLIP Tree evaluation เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการปรับแต่งแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม tree viewer/ editor เช่น TreeView32

2.4 เพื่อให้สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการสมบูรณ์แบบ จำเป็นต้องอาศัยโปรแกรมอื่นๆ มาทำหน้าที่ดังกล่าว (association tools) ซึ่งในตัวอย่างนี้จะประกอบด้วย

- ClustalX: ใช้ในการทำการจัดเรียงลำดับข้อมูลเริ่มต้นที่เป็นเวอร์ชันที่สามารถทำงานบนระบบปฏิบัติการ Windows ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่มีค่าใช้จ่ายที่ <http://www.igbmc.ustrasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>

- TreeView32: เป็นโปรแกรม Tree Viewer/editor สามารถดาวน์โหลดได้โดยไม่มีค่าใช้จ่ายที่ <http://taxanomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้