สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การจัดจำแนกความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA

ทัดดาว กาญจนปทุม

ธนากร กานต์โกเมศ

ปว.
ท384ก
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83979
วัน,เดือน,ปี 23 ต.ค. 2551

b 11983222
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Molecular Diversity of *Beauveria bassiana* by Random Amplified Polymorphic DNA

Tatdow Kanjanapatum

Thanakorn Kankomate

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science Biotechnology Program

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจัดจำแนกความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA

นักศึกษา ทัดดาว กาญจนปทุม รหัสนักศึกษา 47050126

ธนากร กานต์โกเมศ รหัสนักศึกษา 47050128

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การจัดจำแนกความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA

นักศึกษา ทัดดาว กาญจนปทุม รหัสนักศึกษา 47050126

ธนากร กานต์โกเมศ รหัสนักศึกษา 47050128

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

เชื้อรา *Beauveria bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ได้นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการศึกษารูปร่างสปอร์ ลักษณะของโคโลนี และระยะเวลาการเกิดสปอร์ ซึ่งทำการศึกษาที่สภาวะอุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยที่สปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* มีลักษณะกลมรี เกิดการสร้างสปอร์ภายใน 3-4 วัน โคโลนีมีสีขาว การศึกษาความหลากหลายทางโมเลกุลด้วยเทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เมื่อนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท โดยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 UPGMA สามารถจัดจำแนกความหลากหลายทั้ง 5 ไอโซเลท ได้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยที่ไอโซเลท Bb 004 มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลทอื่นๆ น้อยที่สุด และการทดสอบประสิทธิภาพต่อการเกิดโรคในหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่าไอโซเลท Bb 004 มีประสิทธิภาพต่อการเกิดโรคในหนอนใยผักมากที่สุด และความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Molecular Diversity of *Beauveria bassiana* by Random Amplified Polymorphic DNA

Name Miss Tatdow Kanjanapatum

Mr. Thanakorn Kankomate

Program Biotechnology

Department Applied Biology

Academic Year 2007

Special Project Advisor Asst. Prof. Dr. Supattar Poeaim

ABSTRACT

The 5 isolates of *Beauveria bassiana* fungus are studied in their morphology which study about shape of spore, colony and period of generating spore. In this study, we experiment with PDA at 25, 30 degree celcius and room temperature. The spore of *B. bassiana* has ellipse shape, it is generated in 3-4 days and the color of colony is white. The technique that use to study the genetics biodiversity is Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The NTSYS-pc program version 2.0 UPGMA can separate this 5 isolates to 2 groups that Bb 004 isolate is the less similar with another. In the efficiency test in *Plutella xylostella* from 5 isolates of *B. bassiana*, the most efficiency infection is Bb 004 and proper intensity is 1×10^{7} spores per millilitre.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้ความรู้ในด้านต่างๆ และให้คำปรึกษาที่ดีมาโดยตลอดระยะเวลาการศึกษาค้นคว้าวิจัย และการเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไขให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ตลอดทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ที่คอยแนะนำและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเทคนิคต่างๆในระดับโมเลกุลที่ใช้ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ตลอดทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวาลย์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับแมลง ตลอดทั้งคำปรึกษาและแนะนำเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหนอนใยผัก

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยกำจัดศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ และ รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง อาจารย์คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่กรุณาให้เชื้อ *B. bassiana* เพื่อมาศึกษาในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณนางสาวสุวิชา ฮั้งตระกูล นักศึกษาปริญญาโทที่คอยให้คำแนะนำและช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ รวมทั้งสอนเทคนิคบางอย่างที่ใช้ในการปฏิบัติโครงงานครั้งนี้ ตลอดทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ตลอดทั้งเพื่อนๆ และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

นางสาวทัดดาว กาญจนปทุม

นายธนากร กานต์โกเมศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง	4
2.1.1 ลักษณะของเชื้อรา	4
2.1.2 ลักษณะของแมลงอาศัย	4
2.1.3 สภาพสิ่งแวดล้อม	5
2.1.4 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราในแมลง	5
2.2 เชื้อรา *Beauveria bassiana*	7
2.3 หนอนใยผัก	9
2.3.1 ความสำคัญและลักษณะการเข้าทำลาย	9
2.3.2 ลักษณะที่สำคัญ	9
2.3.3 การแพร่กระจายและฤดูกาลระบาด	10
2.3.4 ศัตรูธรรมชาติ	10
2.3.5 การป้องกันและกำจัด	11
2.4 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย	11
2.4.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	12
2.4.2 เทคนิค RAPD-PCR	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.4.3 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	15
2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	20
2.5.1 แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์	20
2.5.2 วิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยพิสัย	20
2.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล	20
2.6.1 แผนภูมิต้นไม้และคำศัพท์ต่างๆ ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล	21
2.6.2 หลักพื้นฐานในการสร้างแผนภูมิต้นไม้	23
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	26
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	29
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	29
3.2 สารเคมี	29
3.3 อุปกรณ์	30
3.4 วิธีการทดลอง	31
3.4.1 การคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติ	31
3.4.2 การทำสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อ	32
3.4.3 การทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิต่างๆ	32
3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายระดับโมเลกุลโดยเทคนิค RAPD	33
3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. bassiana* ที่ก่อให้เกิดโรคต่อหนอนใยผัก	38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	41
4.1 การคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติ	41
4.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ที่อุณหภูมิต่างๆ	42
4.3 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิต่างๆ	46
4.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายระดับโมเลกุลโดยเทคนิค RAPD	51
4.5 การคัดเลือกเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เหมาะสมต่อการเกิดโรคในหนอนใยผัก	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.6 การคัดเลือกความเข้มข้นสารละลายสปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* ที่เหมาะสม	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	57
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก ก	61
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	65
ภาคผนวก ง	66
ภาคผนวก จ	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด	16
2.2	แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้	18
3.1	แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RAPD	37
3.2	แสดงปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ PCR แต่ละขั้นตอน	37
4.1	แหล่งที่มาของเชื้อรา *B. bassiana* ที่คัดแยกจากธรรมชาติ	41
4.2	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	43
4.3	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	44
4.4	ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิห้อง	45
4.5	แสดงจำนวนหนอนใยผักที่เกิดโรคและไม่เกิดโรคจากเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท	55
4.6	ค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดโรคจากเชื้อ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ คือ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 เป็นระยะเวลา 7 วัน	55
ง-1	แสดงค่าความคล้ายคลึงกันของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ	66
จ-1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อ *B. bassiana*	67
จ-2	ค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดโรคจากเชื้อรา *B. bassiana* ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ คือ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	วงจรชีวิตของเชื้อราสาเหตุของโรคแมลง	6
2.2	แสดงเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana*	8
2.3	แสดงลักษณะของหนอนใยผัก	10
2.4	แสดงหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	13
2.5	แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD	15
2.6	แสดงหลักการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	19
2.7	รูปแสดงส่วนประกอบต่างๆ และคำที่ใช้เรียกส่วนนั้นๆ ของแผนภูมิต้นไม้	21
2.8	รูปแสดงแผนภูมิต้นไม้แบบยังไม่ได้ตรึงราก (unrooted tree; รูป a) และที่ตรึงราก (rooted tree; รูป b, c และ d) เมื่อตรึงรากที่ตำแหน่ง i, ii และ iii ตามลำดับ	22
2.9	รูปแสดงตำแหน่งไดโคโตมี่และโพลี่โตมี่บนแผนภูมิต้นไม้	22
2.10	รูปแสดงตำแหน่งของบรรพบุรุษและรุ่นลูกหลานบนแผนภูมิต้นไม้	23
2.11	รูปแสดงการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากข้อมูลลักษณะทางโมเลกุลและตามวิธีวิเคราะห์เชิงมัธยัสถ์แผนภูมิที่หนึ่งจะถูกเลือกเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	24
2.12	รูปแสดงการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบสอดคล้องรวมกัน	24
2.13	รูปแสดงการตรึงรากให้กับแผนภูมิต้นไม้ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม	25
3.1	แสดงการทำสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค Cross-Hatch Streak	32
3.2	แสดงการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ	38
3.3	แสดงจานอาหารเลี้ยงเชื้อตัวอย่างที่ใช้การคัดเลือกเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท	39
3.4	แสดงการคัดเลือกความเข้มข้นสารละลายสปอร์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อการเกิดโรคในหนอนใยผัก	40
4.1	แสดงลักษณะแมลงที่เกิดโรคจากเชื้อรา *B. bassiana* ในธรรมชาติ (A) ลักษณะโคโลนี (B) และสปอร์ (C) ของไอโซเลท IA 001	42
4.2	แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 004	46
4.3	แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 010	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.4	แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 011	47
4.5	แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 012	47
4.6	แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B)ของไอโซเลท Bb 013	48
4.7	แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	49
4.8	แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	49
4.9	แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง	50
4.10	แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-09 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative	51
4.11	แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative	52
4.12	แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative	53
4.13	แสดงแผนภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc 2.0 UPGM	54
4.14	แสดงหนอนใยผักก่อนการเกิดโรคและหลังการเกิดโรค	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัญหาสำคัญของเกษตรกรในหลายประเทศ เช่น ไทย สหรัฐอเมริกา แอฟริกา อิตาลี และอื่นๆ พบว่าพืชผลทางการเกษตรอันได้แก่ ข้าว มะเขือเทศ มะนาว และกาแฟนั้นได้รับความเสียหายอย่างมากจากการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชต่างๆตลอดฤดูกาลเพาะปลูก และประเทศไทยเองเป็นประเทศเกษตรกรรม การเพาะปลูกส่วนใหญ่มุ่งเน้นการเพิ่มผลผลิตทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณ ซึ่งการที่โรคพืชและแมลงศัตรูพืชมีการระบาดนั้น จะก่อให้เกิดความเสียหายแก่เกษตรกรผู้ปลูกโดยอาจเริ่มตั้งแต่เพาะปลูกจนกระทั่งหลังการเก็บเกี่ยว ทำให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศเสียหายเป็นจำนวนมาก วิธีการที่ง่ายและได้ผลเร็วก็คือการใช้สารเคมี เนื่องจากมีข้อดีคือ ออกฤทธิ์เร็ว มีประสิทธิภาพที่แน่นอน เห็นผลชัดเจนและใช้ได้อย่างสะดวก อย่างไรก็ตามข้อเสียของการใช้สารเคมีก็คือ ต้องใช้อย่างต่อเนื่องเป็นประจำทำให้ค่าใช้จ่ายสูง และเมื่อใช้ไประยะหนึ่งศัตรูพืชอาจพัฒนาต้านทานต่อสารเคมี ทำให้ต้องใช้สารเคมีในอัตราเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เกิดปัญหาการปนเปื้อนและตกค้างของสารเคมีในผลิตผลทางการเกษตร ปัจจัยดังกล่าวล้วนสนับสนุนให้มีการค้นคว้าวิจัยการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (biocontrol) ทั้งการใช้ปรสิต (parasite) และเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลง (entomopathogenic fungi) ซึ่งมีรายงานว่า *Beauveria bassiana* เป็นเชื้อราสาเหตุของโรคแมลงที่มีการแพร่กระจายมากที่สุด และสามารถนำมาใช้ได้ดีกับแมลงศัตรูพืชหลากหลายชนิด โดยช่วยเสริมประสิทธิภาพในการทำลายให้สูงขึ้น และไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นและสิ่งแวดล้อม

การวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา (morphological characters) ได้แก่ ลักษณะและการเรียงตัวของสปอร์ สี รูปร่าง การรวมกลุ่มของเส้นใย และลักษณะของผิวหน้าของโคโลนี ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมาก แต่เนื่องจากลักษณะดังกล่าวสามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมต่างๆได้ง่าย ส่งผลให้การจำแนกเชื้อราในบางครั้งให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำ ใช้ระยะเวลานาน และอาจต้องใช้ผู้มีประสบการณ์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาใช้ในการวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจงกับแมลงแต่ละชนิดมากยิ่งขึ้น และอาจนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์ใหม่ๆ ซึ่งเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *B.bassiana* เช่น เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) โดยที่ Wang และคณะ (2002) ทำการศึกษาทางด้านโมเลกุลของเชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ผสมด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค RAPD ผลปรากฏเป็นแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งเกิดขึ้นจากนิวเคลียสของสายพันธุ์ผสม Castrillo และคณะ (2003) ทำการศึกษาลำดับเบสที่มีลักษณะเฉพาะตัว (SCAR) ของ *B. bassiana* ด้วยเทคนิค RAPD ซึ่งแสดงความแตกต่างของเชื้อราจากแปลงปลูกผักได้

เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphim (RFLP) และเทคนิค Amplified Fragment Length Polymorphic (AFLP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ Aquino de Muro และคณะ (2003) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *B. bassiana* และแสดงแถบข้อมูลแถบดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RFLP ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ผลจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ให้ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน

ปัจจุบันมีการผลิตเชื้อรา *B. bassiana* ทำเป็นการค้าในรูปของสารกำจัดแมลงที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial insecticide) โดยเริ่มตั้งแต่การเพิ่มปริมาณของเชื้อ *B. bassiana* ด้วยกระบวนการหมัก และผลิตให้อยู่ในรูปที่สามารถทนต่อแสงอุลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) อุณหภูมิสูง ตลอดจนความชื้นในพื้นที่นั้นๆ ซึ่งมีผลิตภัณฑ์อีกมากมายที่มีส่วนผสมของเชื้อรา *B. bassiana* ที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อม และส่งเสริมสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค (ที่มา:http://pmc09.doae.go.th/site/home/index.php)

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *B. bassiana* โดยศึกษาจากรูปร่างของสปอร์และวัดการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ
2. ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *B. bassiana* โดยเทคนิค RAPD
3. ทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*)

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. การคัดแยกเชื้อรา *B. bassiana* จากธรรมชาติให้บริสุทธิ์
2. การวิเคราะห์ความหลากหลายในระดับโมเลกุลของเชื้อรา *B. bassiana* โดยใช้เทคนิค Random Amplified Polymorphic DNA
3. การทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *B. bassiana* ที่มีต่อหนอนใยผักในห้องปฏิบัติการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. คัดแยกและทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* จากแหล่งธรรมชาติ

2. ทราบถึงประสิทธิภาพการควบคุมของเชื้อรา *B. bassiana* ต่อหนอนใยผักในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ในแปลงเพาะปลูกทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง (entomopathogenic fungi)

เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในการควบคุมประชากรของแมลงศัตรูพืช โดยปกติเชื้อราโรคแมลงมักเกิดขึ้นเองในธรรมชาติเป็นประจำและไม่รุนแรง ซึ่งการระบาดของเชื้อราโรคแมลงอาจเกิดขึ้นเป็นครั้งคราว และทำลายประชากรแมลงอย่างกว้างขวาง โดยเชื้อราที่ก่อโรคจะมีความเป็นอยู่แบบปรสิตอาศัยอยู่ภายในลำตัวของสัตว์อาศัย และใช้เนื้อเยื่อภายในร่างกายเพื่อดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ ซึ่งถือเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี การศึกษาการระบาดของเชื้อราโรคแมลงในธรรมชาตินั้นเป็นเรื่องยาก เนื่องจากการระบาดจะเกิดขึ้นได้เมื่อมีเชื้อรา แมลงอาศัย และสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีความซับซ้อนและมีปฏิกิริยาร่วมกัน (interaction) นอกจากนี้ยังมีการผันแปรตามธรรมชาติตลอดเวลาดังนี้ (มลิวัลย์, 2544)

2.1.1 ลักษณะของเชื้อรา

2.1.1.1 การแพร่กระจาย (distribution) ปกติสปอร์จะมีการแพร่กระจายโดยอาศัยลม ฝน และอื่นๆ สภาพแวดล้อมบางอย่าง เช่น รังสีอุลตราไวโอเลตจากแสงแดด และความแห้งอาจทำลายสปอร์ของเชื้อราได้ อากัปกิริยาของแมลง เช่น การไต่ขึ้นไปเกาะบนที่สูงของตั๊กแตนที่เป็นโรคจากเชื้อ *Entomophthoral grylli* ซึ่งมีส่วนสนับสนุนในการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้ เป็นต้น

2.1.1.2 ความคงชีวิตของเชื้อรา เชื้อราส่วนใหญ่มีชีวิตได้นานในรูปของ conidia, spore, sclerotia, chlamydospore หรือ resting spore อยู่ได้ทั้งภายในและภายนอกตัวแมลงอาศัย

2.1.1.3 ปริมาณเชื้อรา เชื้อราในธรรมชาติมักจะไม่ทราบปริมาณที่แน่นอน แต่ต้องมีมากพอแก่การติดโรค

2.1.1.4 ความรุนแรงของเชื้อรา เชื้อราที่มีประสิทธิภาพทำให้เกิดโรคต้องมีความรุนแรง ซึ่งจะแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ (species) และชนิด (strain) เนื่องมาจากพันธุกรรมของเชื้อรา

2.1.2 ลักษณะของแมลงอาศัย

2.1.2.1 ความหนาแน่นของประชากรแมลง โดยปกติการระบาดของเชื้อราโรคแมลงขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของประชากรชนิดไม่สมบูรณ์ (Imperfect density dependence) ตัวอย่างเช่น จะพบว่ามีหนอนที่เป็นโรคราดายทั่วไปในท้องที่ที่มีประชากรแมลงอยู่ในระดับต่ำ เช่น เชื้อรา *Nomuraea rileyi* ทำลาย *Trichoplusiani* ในไร่ถั่วลิสง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 ความอ่อนแอต่อโรคของแมลงอาศัย แตกต่างกันในด้านพันธุกรรม วัย และสรีระ เช่น ผิว ลำตัวแมลง หรือความอ่อนแอที่เกิดจากอาหาร และอื่นๆ

2.1.3 สภาพสิ่งแวดล้อม

สิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะบรรยากาศรอบๆที่พอเหมาะในการงอก และการเจริญของเชื้อราจะช่วยให้เกิดการระบาดดีขึ้น อีกทั้งสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีชีวิต เช่น อุณหภูมิ ความชื้น กระแสลม ฝน แสงสว่าง เป็นต้น และสิ่งแวดล้อมที่มีชีวิตที่แวดล้อมในวงจรนั้น เช่น แมลงห้ำ แมลงเบียน แมลงอื่นๆ รวมทั้งพืชต่างๆ ด้วย

2.1.4 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราในแมลง เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคแมลงจะเกิดขึ้นโดยอาศัยความสัมพันธ์ที่เหมาะสมของเชื้อรา กับแมลงอาศัย การเจริญเติบโตของเชื้อราในแมลงอาศัย และการแพร่ระบาดของเชื้อในกลุ่มประชากรของแมลงอาศัย ซึ่งเชื้อราโรคแมลงมีหลายสกุล เช่น *Entomophthora* sp., *Verticillium* sp., *Beauveria* sp., *Hirsutella* sp., *Metarhizium* sp., *Cordyceps* sp., *Culicinoyces* sp. และ *Paecilomyces* sp. โดยเชื้อราชนิดนี้สามารถที่จะทำลายโดยการแทงเข้าทางผิว (cuticle) ของแมลง มีการนำเชื้อรา *B. bassiana, M. anisopliae* และ *Nomuraea rileyi* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) หลากหลายสายพันธุ์มาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช (biopesticide agents) ในเชิงพาณิชย์ เช่น เชื้อรา *B. bassiana* ที่สามารถทำลายด้วงหนอนกระทู้ผัก (*Spodoptera litura*) มด (*Cylas formicarius*) และ ด้วง *Dendrolimus punctatus*, เชื้อรา *Erynia sp.* ทำลายหนอนผีเสื้อ *Crocidolomia binotalis* เชื้อรา *Entomophaga grylli* ทำลายตั๊กแตนเกือบทุกชนิด เชื้อรา *Zoopthora radicans* ทำลายเพลี้ยอ่อน (Aphids) เชื้อรา *Zoophthora radicans* ทำลายหนอนใยผัก เชื้อรา *N. rileyi* ทำลายหนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้ผัก หนอนกระทู้หอม และหนอนผีเสื้อเกือบทุกชนิด เชื้อรา *Trialeurodes vaporariorum* ทำลายแมลงหวี่ขาว (Whitefly) เชื้อรา *Hirsutella* sp. ทำลายหนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย และตัวแก่ของ *Stenocranus bakeri* เชื้อรา *Paecilomyces sp.* ทำลายหนอนใยผัก เชื้อรา *Verticillium sp.* ทำลายเพลี้ยอ่อนข้าวโพด เพลี้ยไฟ (Thrips) แมลงหวี่ขาว และแมลงอื่นๆ อีกหลาย ชนิด เป็นต้น (Hajek และ Leger, 1994)

นอกจากนี้เชื้อราบางชนิดจะสร้างสารเมตาโบไลท์ (toxic metabolite) ที่มีฤทธิ์รุนแรงและใช้ฆ่าแมลงได้ เช่น destruxin จากเชื้อ *Metarhizium sp.*, hissutellin จากเชื้อ *Hirsutella sp.* และ beauvericin จากเชื้อ *Beauveria sp.* (Robert, 1996; Boucias และ Pendland, 1998) โดยสารพิษเหล่านี้จะยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตาย โดยแมลงที่ตายจะมีลักษณะแข็ง และมีเส้นใยของเชื้อราเจริญอยู่เต็มลำตัว ลักษณะอาการของแมลงที่ถูกเชื้อราเข้าทำลายจะแสดงอาการเป็นโรค คือ เบื่ออาหาร กินน้อยลง อ่อนเพลีย และไม่เคลื่อนไหว สีของผนังแมลงมักเปลี่ยนไป จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรากฏจุดสีดำบนบริเวณที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย พบเส้นใยและผงสีขาวของสปอร์ปกคลุมตัวแมลงที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย โดยวงจรชีวิตของเชื้อราทำลายแมลง แสดงดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 วงจรชีวิตของเชื้อราสาเหตุของโรคแมลง

ที่มา : http://nakhonpathom.doae.go.th/muang/2007/pathogens4.html

โดยการเข้าทำลายแมลงเริ่มจาก เชื้อราระยะที่เป็นสปอร์เมื่อตกไปบนผิวของแมลงอาศัยจะเข้าสู่ลำตัวโดยตรงทางผิวหนังของแมลง และมีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างทางชีวเคมีเพื่อให้สามารถติดแน่นอยู่กับผิวของแมลง เมื่อความชื้นเหมาะสม สปอร์จะงอกแทงผ่านผนังลำตัวเข้าไปภายในช่องว่างของตัวแมลงอาศัย โดยเฉพาะบริเวณผนังลำตัวที่มีความอ่อนบางจะสามารถแทงทะลุได้ง่าย เช่น รอยต่อระหว่างข้อปล้อง หรือข้อต่อของรยางค์ต่างๆ เส้นใยจะเข้าสู่เนื้อเยื่อของแมลง โดยอาศัยน้ำย่อยต่างๆ คือ ไลเปส (lipase) โพรทีเนส (proteinase) และไคทีเนส (chitinase) หลังจากนั้นเชื้อราจะงอกเข้าสู่ช่องว่างของแมลง เมื่อสภาพความชื้นในช่องว่างของตัวแมลงเหมาะสมก็จะเจริญเติบโตสร้างเส้นใยมากมายแพร่กระจายไปทั่วตัวแมลงอย่างรวดเร็ว ตัวอย่างเช่น กลุ่ม Mastigomycotina และ Zygomycotina แมลงอาศัยจะตายภายหลังที่เส้นใยเจริญเติบโตอัดแน่นทั่วตัวแมลง ทำให้แมลงขาดอากาศหรืออดตาย นอกจากนี้ในกลุ่ม Ascomycotina และ Deuteromycotina แมลงตายเนื่องจากสารพิษที่เชื้อราปล่อยออกมาในช่วงเริ่มต้นของการเข้าทำลาย จากนั้นจะสร้างเส้นใยบนซากแมลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Saprophyticcally) ในขณะที่เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโต จะดูดน้ำและสารอาหารจากแมลงอาศัย ทำให้ซากแมลงแห้ง จากนั้นเส้นใยจะเจริญออกมานอกตัวแมลงอาศัย ปกติแมลงจะเกาะติดกับต้นพืชหรือถูกทำให้ยึดติดโดยขบวนการเกิดโรค และจะสร้างสปอร์ขึ้นปกคลุมผนังลำตัวด้านนอกของแมลง ซึ่งสปอร์ค่อยๆถูกปลดปล่อยหรือฟุ้งกระจายอย่างรวดเร็วเข้าสู่วงจรการเข้าทำลาย หรือติดไปกับตัวเบียนขณะมาเกาะกินศัตรูพืช ทำให้เชื้อราติดไปกับศัตรูพืช เชื้อราจึงสามารถขยายพันธุ์ต่อไปได้ โดยทั่วไปเชื้อรานี้มีเหยื่ออาศัยหลากหลายทั้งแมลงและอาร์โธพอดอื่นๆ แต่บางสายพันธุ์ของบางชนิดมีความแตกต่างกันมากในเรื่องของความเฉพาะเจาะจง เชื้อราหลายสายพันธุ์ทำลายเหยื่อที่เป็นแหล่งที่อยู่อาศัยเพียงไม่กี่ชนิดที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น

(ที่มา : http://nakhonpathom.doae.go.th/muang/2007/pathogens4.html)

2.2 เชื้อรา *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana เป็นเชื้อราที่พบทั่วไปในดิน และกินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร (saprophyte) สามารถเข้าทำลายแมลงได้หลากหลายชนิดทั้งตัวอ่อนและตัวแก่ นอกจากหนอนไหมแล้ว ยังมีแมลงศัตรูที่สำคัญอื่นๆ เช่น แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน ตั๊กแตน ปลวก ด้วงงวงมันเทศ (Colorado potato beetle) ด้วงถั่วเม็กซิกัน (Mexican bean beetle) ด้วงญี่ปุ่น (Japanese beetle) มดคันไฟ (lygus bug) แมลงที่กัดกินข้าว (chinch bug) หนอนเจาะฝักข้าวโพด (European corn borer) ผีเสื้อคอร์ดลิ่ง (codling mots) และผีเสื้อ Douglas fir tussock เป็นต้น เชื้อรานี้มีสายพันธุ์ต่างๆ ที่ผันแปรได้มากมาย ทั้งในการเกิดพิษ การเกิดโรค และขนาดของสิ่งให้อาศัย

เชื้อรา *B. bassiana* สร้างสปอร์ที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม ก้านชูสปอร์ตั้งขึ้นเป็นก้านยาวเรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน กลุ่มของสปอร์อยู่กันเป็นสาขามารวมกันคล้ายรูปจาน เส้นใยรูปทรงกระบอก สีใส มีผนังกั้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5-2.0 ไมครอน แสดงดังรูปที่ 2.2 โคโลนีเรียบเป็นฝุ่นคล้ายแป้งหรือฝุ่นชอล์ก ผิวหน้าแดก สปอร์ที่อยู่ในระยะที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในช่วงวงจรชีวิตของเชื้อรา เป็นสปอร์ที่สามารถต้านทานต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงได้ โดยโคนิเดีย (conidia) จะเข้าไปเพาะเชื้อโดยตรงที่ด้านนอกของผิวหนังแมลง เมื่อสภาพแวดล้อมมีความชื้น และอุณหภูมิเหมาะสมจะเกิดการงอกของโคนิเดียที่รวมเข้ากับผนังคิวติเคิล (cuticle) ของแมลง เส้นใยที่เจริญเติบโตมาจากสปอร์จะผลิตเอนไซม์ออกมาทำลายผนังลำตัวของแมลง ทำให้เส้นใยแทงผ่านผนังลำตัวของแมลงเข้าไปเจริญเติบโตอยู่ในลำตัวของแมลง และจะผลิตสารพิษที่เรียกว่า บิวเวอริซิน ที่ไปทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแมลงอ่อนแอลง และเมื่อแมลงตายจะมีการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ชื่อโอโอสปอริน (oosporein) ที่จะไปสนับสนุนเชื้อรานี้ให้แข่งขันจนเอาชนะพวกแบคทีเรียที่อยู่บริเวณลำไส้ของแมลง จนในที่สุดภายในลำตัวของแมลงทั้งหมดจะเต็มไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มวลเส้นใย (fungi mass) ของเชื้อรา เมื่อสภาวะเหมาะสมเชื้อราจะเจริญเติบโตจนทั่วส่วนที่อ่อนกว่าของร่างกายแมลง โดยทำการสร้างลักษณะดอกไม้บานสีขาว (white bloom) ปรากฏให้เห็น และต้องมีความชื้นสัมพัทธ์ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่าจึงจะทำให้เจริญเติบโตออกนอกร่างกายแมลงได้ เส้นใยที่อยู่ภายนอกนั้นจะผลิตโคนิเดียที่แก่ตัวลง และจะถูกปล่อยออกสู่สภาพแวดล้อมเพื่อทำให้วงจรชีวิตของมันเป็นไปอย่างสมบูรณ์ (Marh, 1997)

รูปที่ 2.2 แสดงเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา *Beauveria bassiana*

ที่มา : http://www.homestead.com/ipmofalaska/files/beauveria.jpg

เชื้อ *B. bassiana* มีการผลิตทำเป็นการค้าในรูปของสารกำจัดแมลงที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial insecticide) เริ่มตั้งแต่ทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อ *B. bassiana* ด้วยกระบวนการหมัก และผลิตเชื้อให้อยู่ในรูปที่สามารถทนต่อแสงอุลตราไวโอเล็ต อุณหภูมิสูง ตลอดจนความชื้นที่พบได้ทั่วไปในพื้นที่นั้น ซึ่งก็มีผลิตภัณฑ์อีกมากมายที่มีส่วนผสมของเชื้อรา *B. bassiana* ที่สามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมี เพื่อเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังส่งเสริมสุขภาพของเกษตรกรและผู้บริโภค (ที่มา : http://pmc09.doae.go.th/site/home/index.php)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) (www.plantpro.doae.go.th)

หนอนใยผักเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า หนอนใยหรือตัวจรวด มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Plutella xylostella* จัดอยู่ในวงศ์ Yponomeutidae และอันดับ Lepidoptera สามารถเข้าทำลายพืชผักได้หลากหลายชนิด เช่น กวางตุ้ง กะหล่ำดอก กะหล่ำปลี คะน้า บร็อคโคลี ผักกาดขาวปลี ผักกาดเขียว และผักกาดหัว

2.3.1 ความสำคัญและลักษณะการเข้าทำลาย

หนอนใยผักเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญ และก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชตระกูลกะหล่ำ มักพบการระบาดได้ทั่วไปตามแหล่งเพาะปลูกผักทั่วโลก แม้ว่าหนอนใยผักมีต้นกำเนิดมาจากเขตร้อน แต่ก็สามารถพบหนอนจำพวกนี้ได้ในเขตหนาวโดยไม่มีการพักตัว สำหรับในประเทศไทยนั้นมักพบการระบาดเป็นประจำตามแหล่งปลูกผักทั่วไป เนื่องจากมีวงจรชีวิตสั้น มีการแพร่พันธุ์และขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว และมีพัฒนาการวางไข่ได้เร็วภายใน 1 วันหลังออกจากระยะดักแด้ก็สามารถวางไข่ได้ทันทีและตลอดชีวิต ประกอบกับสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมและการมีพืชอาหารตลอดปี จึงเป็นสาเหตุให้พบการระบาดของหนอนใยผักตระกูลกะหล่ำอยู่เสมอ ปัจจุบันหนอนใยผักมีการพัฒนาต้านทานต่อสารเคมีได้หลากหลายชนิดและรวดเร็ว จึงเป็นการยากต่อการป้องกันกำจัดด้วยการใช้สารเคมีฉีดพ่นเป็นประจำเพียงอย่างเดียว ดังนั้นจึงต้องใช้หลายวิธีผสมผสานกันจึงจะสามารถลดการระบาดของหนอนใยผักลงได้

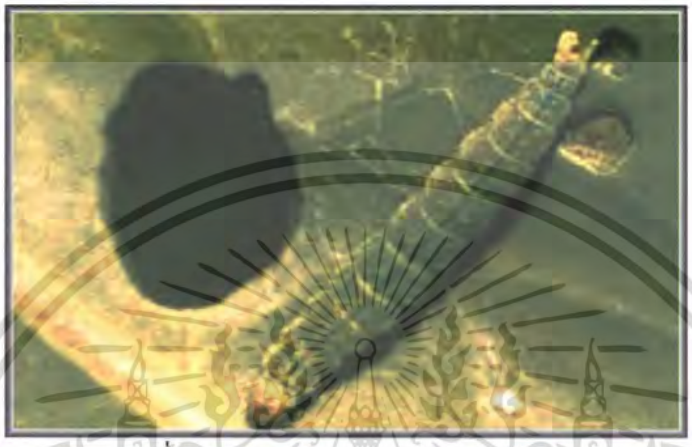
2.3.2 ลักษณะที่สำคัญ

ตัวเต็มวัยของหนอนใยผักเป็นผีเสื้อกลางคืนที่มีขนาดเล็ก เมื่อกางปีกวัดขนาดได้ประมาณ 6-7 มิลลิเมตร มีสีเทา ส่วนหลังมีแถบสีเหลืองส้ม หนวดเป็นแบบเส้นด้าย แต่ละปล้องมีสีดำสลับขาว ตัวเต็มวัยมีอายุประมาณ 5-7 วัน สามารถวางไข่ได้หลายครั้ง มีการพัฒนาการวางไข่ได้อย่างรวดเร็วในระยะแรกของตัวเต็มวัย และมีความสามารถในการวางไข่สูงจึงทำให้หนอนใยผักมีอัตราการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว เพศเมียจะวางไข่เป็นฟองเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่มเล็กๆเรียงติดกันประมาณ 20-80 ฟอง ทั้งบนใบและใต้ใบของพืช โดยตัวเต็มวัยเพศเมียตัวหนึ่งๆ สามารถวางไข่ได้ระหว่าง 47-407 ฟอง ไข่มีลักษณะค่อนข้างแบนและยาวรี มีสีเหลืองอ่อนเป็นมัน และจะเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อใกล้ฟักออกเป็นตัวหนอน ระยะไข่ประมาณ 3-4 วัน

หนอนเมื่อฟักออกมาจากไข่ในระยะแรกจะอาศัยกัดกินอยู่ในใบ หลังจากนั้นจะออกมากัดกินภายนอกทำให้ผักเป็นรูพรุน ตัวหนอนมีลักษณะลำตัวยาว หัวและท้ายแหลม ส่วนท้ายมีปุ่มยื่นออกเป็น 2 แฉก ตัวหนอนมีสีเขียวอ่อน เทาอ่อน หรือเขียวปนเหลือง แสดงดังรูปที่ 2.3 เมื่อถูกตัวจะดิ้นอย่างรุนแรงและทิ้งตัวลงดินโดยการชักใย หนอนเมื่อโตเต็มที่จะมีขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 เซนติเมตร มี 4 วัย และจะเข้าดักแด้ตามใบพืชโดยมีใยปกคลุม ดักแด้ของหนอนใยผักในระยะแรกจะมีสีเขียว และเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเทาเมื่อใกล้เป็นตัวเต็มวัยที่มีขนาด 1 เซนติเมตร



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของหนอนใยผัก

(ที่มา : http://plantpro.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/agrotis/xylostella1.html)

การเจริญเติบโตของหนอนใยผักมักพบมีอายุแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เช่น ในเขตเกษตรที่สูงเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ หนอนใยผักมีวงจรชีวิต 17-18 วัน ในช่วงเดือนเมษายน ถึงพฤษภาคม และ 29 วันในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม โดยมี 17 ช่วงอายุขัยต่อปี ส่วนในที่ราบทั่วไป เช่น จังหวัดนครปฐม พบหนอนใยผักมีวงจรชีวิต 14 - 18 วัน มี 25 ช่วงอายุขัยต่อปี จึงมักพบหนอนใยผักระบาดรวดเร็วและรุนแรงเสมอในเขตที่ราบทั่วไป

2.3.3 การแพร่กระจายและฤดูกาลระบาด

ในประเทศไทยมักพบการระบาดทั่วทุกภาคที่มีการปลูกผักตระกูลกะหล่ำ ตามแหล่งปลูกเพื่อการค้า หนอนใยผักมักเริ่มระบาดมากในฤดูหนาว และจะเพิ่มความรุนแรงขึ้นเรื่อยๆ จนมีการระบาดมากในช่วงท้ายของฤดูหนาวต่อฤดูแล้ง ซึ่งเป็นระยะที่มีการเพาะปลูกผักกันมาก ในฤดูฝนพบระบาดบ้างแต่ไม่รุนแรง

2.3.4 ศัตรูธรรมชาติ

หนอนใยผักมีศัตรูธรรมชาติหลากหลายชนิดคอยควบคุมอยู่ จากการศึกษาพบแตนเบียน 4 ชนิด ได้แก่ แตนเบียนไข่ *Trichogramma confusum* Viggiani (Hymenoptera : Trichogrammatidae) พบทำลายไข่หนอนใยผัก ที่ปลูกบริเวณเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ในเขตที่ราบภาคกลางพบแตนเบียนไข่ *Trichogrammatoidae bactrae* Nagaraja (Hymenoptera : Trichogrammatidae) นอกจากนี้ยังพบ *Cotesia plutellae* (Hymenoptera : Braconidae) ทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอนของหนอนใยผักตลอดทั้งปีในเขตเกษตรที่ราบและที่ราบสูง สำหรับแตนเบียนดักแด้ที่พบได้แก่ *Thyraeella collaris* (Grav) (Hymenoptera : Ichneumonidae) พบทำลายเฉพาะในเขตเกษตรที่สูงเท่านั้น

2.3.5 การป้องกันและกำจัด

1. กับดักกาวเหนียวสีเหลือง 80 กับดักต่อไร่ สามารถลดการใช้สารเคมีได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

2. การใช้โรงเรือนตาข่ายไนล่อน หรือรู้จักกันทั่วไปว่าผักกางมุ้ง พบว่าสามารถป้องกันแมลงศัตรูพวกหนอนผีเสื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (พบด้วงหมัดผัก เพลี้ยอ่อนบ้างเล็กน้อย) ทั้งนี้โรงเรือนตาข่ายไนล่อนต้องปิดอย่างมิดชิด เพื่อป้องกันแมลงที่อาจเล็ดลอดเข้าไป

3. การควบคุมหนอนใยผักโดยวิธีแตนเบียนไข่ โดยทดลองปล่อยแตนเบียนไข่ในอัตรา 60,000 ตัวต่อไร่ ทุกๆ 10 วัน พบว่าสามารถควบคุมการระบาดของหนอนใยผักให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่าระดับการทำลาย แต่หากมีการระบาดของแมลงศัตรูชนิดอื่นร่วมด้วย เช่น หนอนกระทู้หอม ด้วงหมัดผัก หนอนเจาะยอดกะหล่ำ ควรพิจารณาการใช้ร่วมกับวิธีอื่น เช่น การใช้เชื้อไวรัส NPV ควบคุมการระบาดของหนอนกระทู้หอม การใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมการระบาดของด้วงหมัดผัก และบางครั้งอาจใช้สารเคมีหากมีการระบาดของหนอนเจาะยอดกะหล่ำ เป็นต้น ซึ่งจะมีการศึกษาพัฒนาเพื่อหารูปแบบที่เหมาะสมต่อไป

4. การใช้สารเคมี หากพบหนอนใยผักระบาดให้ทำการพ่นด้วย อะบาเม็กติน (เวอร์ทิเม็ค 1.8 เปอร์เซ็นต์ EC) แบคทีเรีย (Bt.) ไดอะเฟนไทยูเรอน (โปโล 25 เปอร์เซ็นต์ SC) คลอร์ฟีนาเพอร์ (แรมเพจ 10 เปอร์เซ็นต์ SC) ฟิโปรนิล (แอสเซนด์ 5 เปอร์เซ็นต์ SC) เป็นต้น โดยแนะนำให้มีการฉีดพ่นสลับกันพบว่าให้ผลดีในการป้องกันกำจัดหนอนใยผัก

2.4 เทคนิคที่ใช้ในงานวิจัย

ปัจจุบันการวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) ได้แก่ ลักษณะและการเรียงตัวของสปอร์ สี รูปร่าง การรวมกลุ่มของเส้นใย และลักษณะของผิวหน้า แต่เนื่องจากลักษณะทางด้านสัณฐานวิทยาของเชื้อราส่วนใหญ่ สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามสภาพแวดล้อมต่างๆได้ง่าย ส่งผลให้การจำแนกเชื้อราในบางครั้งให้ผลที่ไม่ถูกต้องแม่นยำ ใช้ระยะเวลานาน และต้องใช้ผู้มีประสบการณ์ จึงมีการนำเทคนิคในระดับโมเลกุลมาใช้เนื่องจากมีข้อดีคือ สามารถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ชัดเจน ใช้ระยะเวลาไม่นาน และไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก การจำแนกดังกล่าวทำให้ทราบถึง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ใหม่ๆ และนำมาใช้ได้อย่างจำเพาะเจาะจงกับแมลงแต่ละชนิดมากยิ่งขึ้น ซึ่งเทคนิคที่ใช้อาศัยหลักการพื้นฐานของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยมีรายละเอียดดังนี้

2.4.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) (อมรา, 2546)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า เทคนิคพีซีอาร์ เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้น และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะ แห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิคพีซีอาร์คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานและใช้เวลาน้อย จนปัจจุบันมีการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆด้าน และได้รับการยอมรับว่า เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานทางด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) และการสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น

ปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้

1. Template เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยทำการแยกดีเอ็นเอสายคู่ให้กลายเป็นสายเดี่ยว

2. Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ซึ่งมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ทำหน้าที่เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3. DNA polymerase เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูงใช้เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์ ปัจจุบันนิยมใช้ Taq DNA polymerase เพราะสามารถทนความร้อนในช่วงที่ดีเอ็นเอสายคู่คลายเกลียวเป็นสายเดี่ยว

4. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (Deoxynucleotides : dNTPs) มี 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ

5. PCR buffer เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยาให้เหมาะสม เช่น pH และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม (Mg^{2+}) อยู่ด้วย

เทคนิคพีซีอาร์ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายของดีเอ็นเอต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและการศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบส แต่เทคนิคพีซีอาร์สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สาย

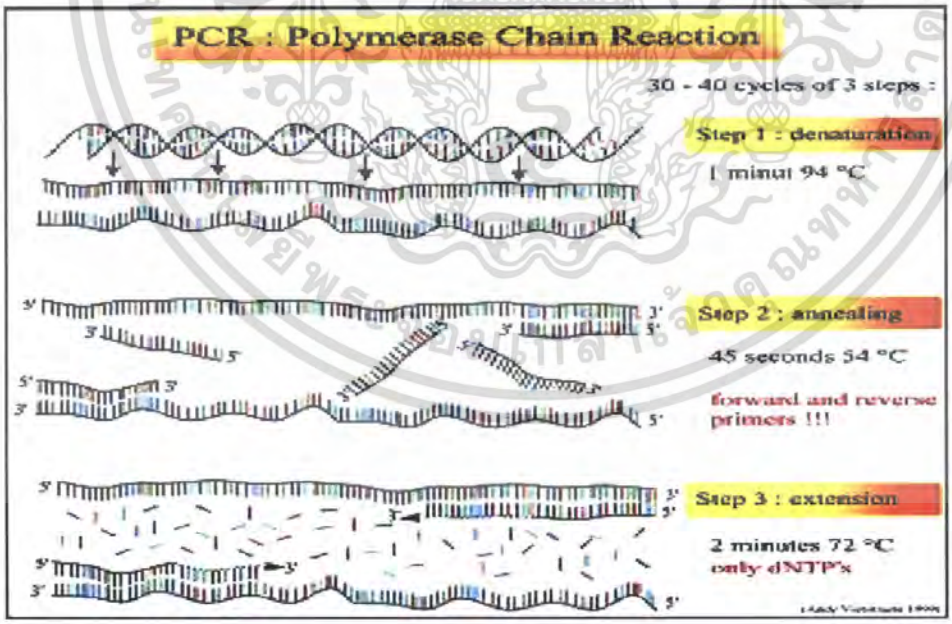
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พร้อมกัน โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) 1 คู่ ปฏิกิริยาพีซีอาร์มีทั้งหมด 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน โดยหลักการของเทคนิคพีซีอาร์แบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 92-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่า annealing เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิและจัดให้ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ (ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 13-14 เบส) ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบที่จับคู่กัน ซึ่งนิยมใช้อุณหภูมิในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนที่ 3 เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ DNA polymerase ที่ใช้ควรจะคงคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกิริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 แสดงหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ที่มา : http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_4.php

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณนับเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ซึ่งผลที่ได้มีการเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณดีเอ็นเอจากเดิมสองสายเป็นสี่สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มีจำนวนรอบมากขึ้น อัตราการเพิ่มปริมาณจะเป็นทวีคูณ คือ 2^n โดยที่ n เท่ากับจำนวนรอบของการสังเคราะห์

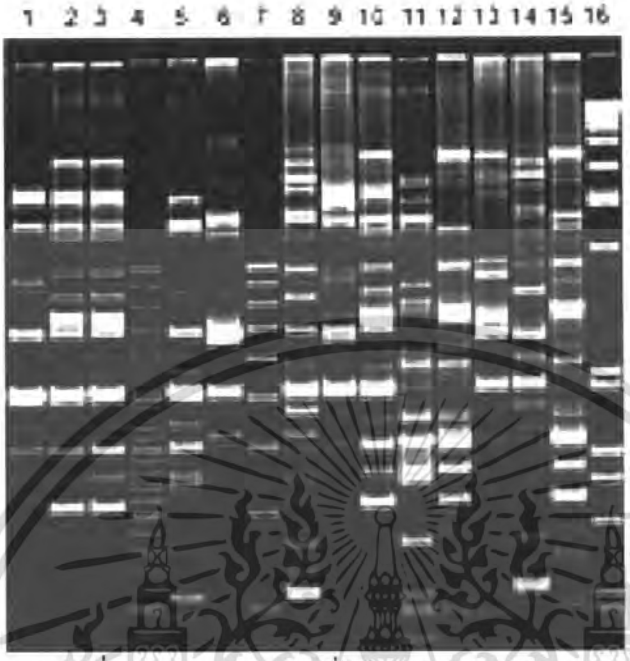
การใช้เทคนิค PCR มีข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่ต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาจำกัด ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 - 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิค PCR นั้น ได้แก่ การพิจารณาหาไพเมอร์ที่เหมาะสม การทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอจากการถ่ายหลอด และการดูดสารละลายโดยการปิเปต

ผลผลิตที่ได้มาเมื่อแยกขนาดโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนและแตกต่างกัน ข้อมูลเหล่านี้จะนำมาวิเคราะห์เพื่อดูความสัมพันธ์ที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งที่ต้องการศึกษาต่อไป

2.4.2 เทคนิค RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction)

เทคนิค RAPD เป็นเทคนิคที่นำมาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่ไม่ทราบลำดับเบสบริเวณใดๆ โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียว ขนาดสั้นๆ ประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ ไพรเมอร์นี้จะจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายบริเวณต่างๆกันแบบสุ่ม โดยไม่คำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่เกาะกับเส้นแม่พิมพ์ เพราะฉะนั้นในขั้นตอน annealing จึงต้องใช้อุณหภูมิค่อนข้างต่ำ เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถเกาะได้โดยสุ่มมากที่สุด แต่เนื่องจากทิศทางการเกาะของไพรเมอร์ไม่แน่นอน การที่เอนไซม์จะนำนิวคลีโอไทด์มาต่อกับไพรเมอร์ให้ได้ดีเอ็นเอเส้นใหม่เฉพาะทิศทางปลาย 3' ของไพรเมอร์เท่านั้น โดยทิศทางที่ไพรเมอร์เข้าเกาะกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละเส้นจะต้องอยู่ในลักษณะตรงกันข้ามแบบชี้ปลาย 3' เข้าหากัน จึงจะสามารถเกิดดีเอ็นเอเส้นใหม่ได้ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดสั้นจึงสามารถเข้าเกาะได้หลายตำแหน่ง โดยทิศทางการเกาะอาจทำให้เกิดดีเอ็นเอเส้นใหม่ได้คือ ถ้าไพรเมอร์จับดีเอ็นเอบริเวณใกล้ๆในทิศทางเข้าหากันแล้วเกิดปฏิกิริยาในการทำ PCR ขึ้น ก็จะได้ผลผลิตออกมา แต่ถ้าไพรเมอร์จับกับในลักษณะที่อยู่ห่างไกลกันก็จะไม่สร้างผลผลิตออกมา ด้วยเหตุนี้เทคนิค RAPD จึงสามารถสร้างผลผลิตดีเอ็นเอได้หลายชิ้น แต่โอกาสที่จะได้ดีเอ็นเอสายสั้นเป็นไปได้มากกว่าสายยาว โดยปรกติขนาดของชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตจะอยู่ในช่วง 300-1,500 คู่เบส ซึ่งสามารถตรวจผลบนเจลอะกาโรสได้โดยการย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แสดงดังรูปที่ 2.5 เทคนิคดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น การวินิจฉัยโรค หรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ (http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique11_RAPD.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD

ที่มา : http://www.elchrom.com/public/index.php?article=113

2.4.3 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (สุรินทร์, 2543)

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้ในการแยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกต่างๆ ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้าซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิด ปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในตัวกลาง โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลางแล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซิสหลายชนิดทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวกลาง เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจลเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) สตาร์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์เจล (star gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก็คือ อิเล็กโทรโฟรีซิสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั้นเอง

การแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต โดยอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.1 ขนาดและโครงสร้างรูป (comformation) ของดีเอ็นเอ เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอขนาดเล็ก (จำนวนฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลของขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ซึ่งดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย แสดงดังรูปที่ 2.6 เช่น เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆอยู่ในรูปที่เรียกว่า ซุปเปอร์คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

2.4.3.2 ความเข้มข้นของอะกาโรส (Agarose concentration) ขณะที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็สูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือ เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆขนาดรูพรุนจะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด

ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (%)	ขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (กิโลเบส)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	7-0.5
0.9	6-0.4
1.2	0-0.8
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

ที่มา : สุรินทร์, 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4.3.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า โดยปกติแล้วอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5-5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้จะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะ ความต่างศักย์ต่ำๆอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่มีขนาดใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์ต่อเซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มาก ทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่มีขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆเพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก เพราะฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนที่ผ่านแผ่นอะกาโรสเจล โดยอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะ อัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะเปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 องศาเซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่าร้อยละ 0.5 มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่มในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

2.4.3.4 ชนิดของบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงดังตารางที่ 2.2 ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการทดลองที่ใช้ TBE buffer ซึ่งสามารถทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง (50-100 โวลต์) ในระยะเวลาสั้น แต่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงขึ้นจะลดประสิทธิภาพการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงจะมีผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเจลได้ดีขึ้น แต่อาจมีผลให้เกิดแถบ (band) ดีเอ็นเอเป็นรูปตัวยู นอกจากนี้ยังจะทำให้ความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ในกรณีที่มีความร้อนสูงเกิดขึ้นอาจทำให้เจลละลายได้ และมีผลให้ช่องว่างภายในเจลเปลี่ยนแปลงไป ปกติแล้วจะไม่ใช้ความต่างศักย์สูงเกิน 125 โวลต์ในเจลขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83979

ตารางที่ 2.2 แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้

บัฟเฟอร์	สารละลายเข้มข้นต่อลิตร (Stock solution)	องค์ประกอบของสารละลายเข้มข้น
Tris-acetate (TAE)	40 mM Tris-acetate 2 mM EDTA	50X : 242 g Tris-base 57.1 ml. glacial acetic acid 200 ml. 0.5 M EDTA (pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	89 mM Tris-phosphate 2 mM EDTA	10X : 108 g Tris-base 15.5 ml of 86% Phosphoric acid (1.679 mg/ml) 40 ml. 0.5 M
Tris-borate (TBE)	89 mM Tris-borate 89 mM Boric acid 2 mM EDTA	5X : 54 g Tris-base 27.5 g. boric acid 20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

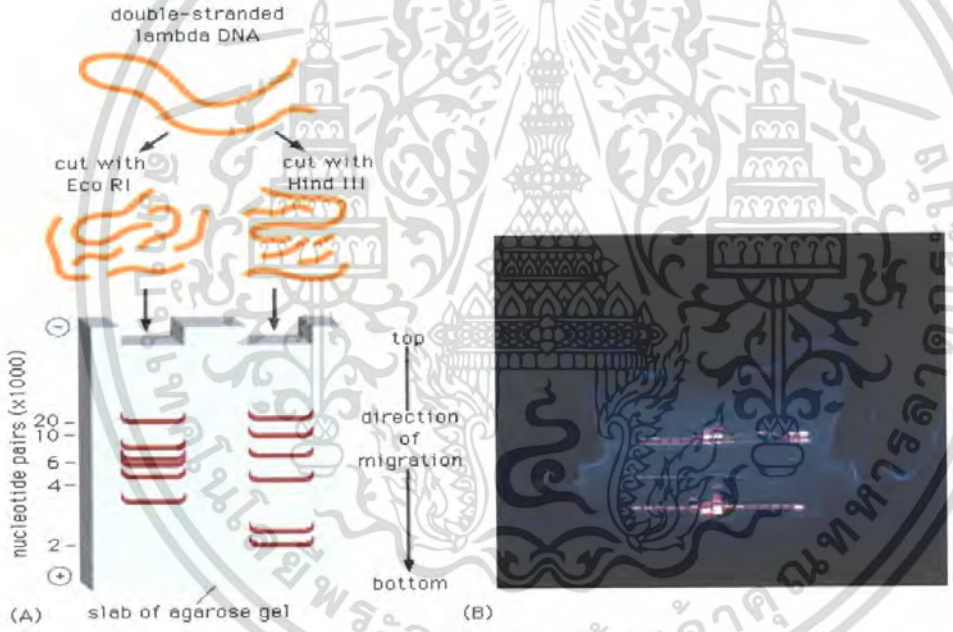
ที่มา : สุรินทร์, 2543

2.4.3.5 การติดตามการเคลื่อนที่ของโมเลกุล DNA ดีเอ็นเอไม่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นในขณะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจึงจำเป็นต้องใช้สารสำหรับบอกถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ โดยจะมีการผสมตัวอย่างของดีเอ็นเอกับสารละลายสีย้อมสำหรับการหยอดดีเอ็นเอที่เรียกว่า โหลดดิงไค (loading dye) ลงในช่องเจลในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอมีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจล ไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โดยโมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมเรียกว่า แทรก-กิงไค (tracking dry) จะใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ได้แก่ โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) มีสีม่วงจะเคลื่อนที่ในเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ได้อัตราเร็วใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ส่วนไซลีนไซยานอล (Xylene cyanol) จะมีสีฟ้า และมีขนาดใหญ่กว่า และเคลื่อนที่ได้ในอัตราเร็วใกล้เคียงกับดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยทั่วไปพลาสมิดดีเอ็นเอจะแยกจากกันได้ดี เมื่อโบรโมฟีนอลบูลเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 40-70 เซนติเมตร

2.4.3.6 การย้อมดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในเจลซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะต้องย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ส่วนใหญ่จะใช้เอธิเดียมโบรไมด์ โดยสารประกอบดีเอ็นเอและเอธิเดียมโบร์ไมด์จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

306 นาโนเมตร การดูดกลืนคลื่นแสงนี้ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของพลังงาน และปล่อยแสงสีส้มที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เอธิเดียมโบรไมด์นั้นสามารถนำมาย้อมดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็วและให้ผลที่ดี แต่สารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้โดยเฉพาะถ้าหายใจสูดเข้าปอดโดยตรง โดยทั่วไปจึงนิยมซื้อในรูปของสารละลายเข้มข้น (10 มิลลิกรัม) เมื่อต้องการใช้งานจะเจือจางลงเหลือความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เวลาในการย้อมเจลที่มีดีเอ็นเอประมาณ 5-10 นาที ตามด้วยล้างเจล ประมาณ 10 นาที ในน้ำเปล่า ในปัจจุบันการพัฒนาสีย้อมดีเอ็นเอที่มีความปลอดภัยสูง และขายเป็นการค้าให้เลือกใช้หลายชนิด เช่น สตาร์เจล (star gel) แต่ราคาอาจจะสูงกว่าเอธิเดียมโบรไมด์



รูปที่ 2.6 หลักการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ที่มา : http://www.thirarat.com/moodle/mod/resource/view.php?id=39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

2.5.1 แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD)

แผนการทดลองแบบนี้เป็นแบบที่ง่ายที่สุด ซึ่งใช้ได้ดีเมื่อหน่วยทดลองที่ใช้ในการทดลองมีความสม่ำเสมอกันหรือเหมือนกัน สามารถใช้กับการทดลองที่มีสิ่งทดลองจำนวนมากๆได้ และแต่ละสิ่งทดลองไม่จำเป็นต้องใช้จำนวนหน่วยทดลองเท่ากัน หรือจำนวนซ้ำเท่ากัน ทั้งนี้การกำหนดสิ่งทดลองให้แก่หน่วยทดลองไม่มีข้อจำกัดหรือเงื่อนไขใดๆ ในการสุ่มทั้งสิ้น จึงเรียกว่าเป็นการสุ่มแบบสมบูรณ์ และความน่าจะเป็นในการที่หน่วยทดลองได้รับสิ่งทดลองใดๆ ซึ่งวิธีแสดงดังภาคผนวก จ.

2.5.2 วิธีเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวอย่างด้วยพิสัย (Duncan's New Multiple Range Procedure)

วิธีของดันแคนวิธีนี้ เป็นวิธีการเปรียบเทียบเชิงซ้อน ที่มีวิธีการทดสอบคล้ายๆกับวิธีการของ SNK แต่ต่างกันที่ค่าพิสัยของวิธีการนี้จะได้มาจากตารางของดันแคน ไม่ได้นำมาจากตาราง Upper Studentized Range จึงทำให้ได้ค่านัยสำคัญที่ไม่เหมือนกันแต่ยังคำนึงถึงช่วงห่าง (Steps) เหมือนกัน ซึ่งสูตรของดันแคนแทนค่าพิสัยจากตารางดันแคนเป็น q' ซึ่งขั้นตอนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของดันแคนมีขั้นตอนการทดสอบดังแสดงในภาคผนวก จ.

2.6 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (เจษฎา, 2547)

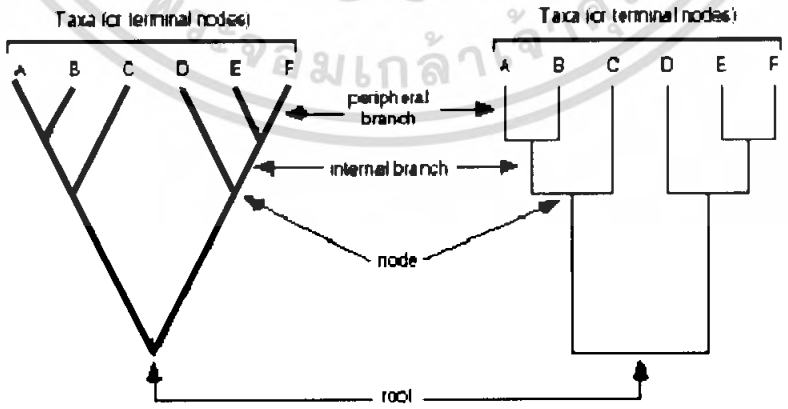
ในการศึกษาลักษณะต่างๆ ของสิ่งมีชีวิตนั้น นักระบบวิทยาสามารถจะเลือกใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characters) หรือลักษณะระดับโมเลกุล (molecular characters) ก็ได้ในการสร้างความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการขึ้นมาใหม่ เพียงแต่ว่าลักษณะดังกล่าวควรเป็นค่าเดี่ยวๆ (discrete) ไม่ใช่ค่าต่อเนื่อง (continuous) ถึงจะเหมาะสมที่จะนำมาศึกษา สำหรับลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้น มีข้อดีที่ง่ายต่อการศึกษา ค่าใช้จ่ายไม่สูง มีสภาวะลักษณะ (character states) หลายสภาวะ (state) ที่เหมาะสมต่อการลดปัญหาวิวัฒนาการแบบเข้าหากัน และช่วยให้เราเข้าใจได้ว่าวิวัฒนาการของรูปร่างลักษณะนั้นๆ เกิดขึ้นได้อย่างไร สำหรับจุดบอดของการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยานั้นได้แก่ ความลำบากในการที่จะแยกโฮโมโลจี (homology) ออกจากอะนาโลจี (analogy) สิ่งมีชีวิตบางชนิดที่วิวัฒนาการแยกจากกันมานาน อาจจะเหลือลักษณะที่ร่วมกันอยู่น้อยมาก การแสดงออกของลักษณะต่างๆ อาจจะได้รับผลกระทบมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกก็ได้ และปัญหาที่เกิดจากลักษณะที่เป็นค่าต่อเนื่อง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการศึกษาลักษณะระดับโมเลกุลนั้น เราสามารถที่จะศึกษาได้ทั้งโปรตีน (protein) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ของสิ่งมีชีวิต โดยที่ในปัจจุบันนี้ใช้เป็นวิธีหลักในการศึกษา เนื่องจากข้อได้เปรียบของลักษณะทางโมเลกุลอันได้แก่ การที่หลักฐานระดับโมเลกุลทำให้เราสามารถวัดลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ได้โดยตรง ไม่มีผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมภายนอก ดีเอ็นเอ (DNA) มีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต และ ลำดับดีเอ็นเอคู่สม (homologous sequences) ก็มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ดีเอ็นเอมีเพียงสี่แบบแตกต่างกัน โดยเป็นลักษณะที่เป็นค่าเดี่ยวๆ อย่างแท้จริง และบริเวณต่างๆ ในจีโนม (genome) ของสิ่งมีชีวิตมีอัตราวิวัฒนาการ (rate of evolution) ที่ต่างกันไป ซึ่งทำให้เราสามารถเลือกบริเวณนั้นมาใช้ตอบปัญหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลที่มีความแตกต่างกันได้ สำหรับข้อเสียเดียวของลักษณะระดับโมเลกุลก็คือ ค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ซึ่งสามารถอธิบายความหลากหลายและลักษณะความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลโดยใช้แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) ได้ดังนี้

2.6.1 แผนภูมิต้นไม้และคำศัพท์ต่างๆ ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุล

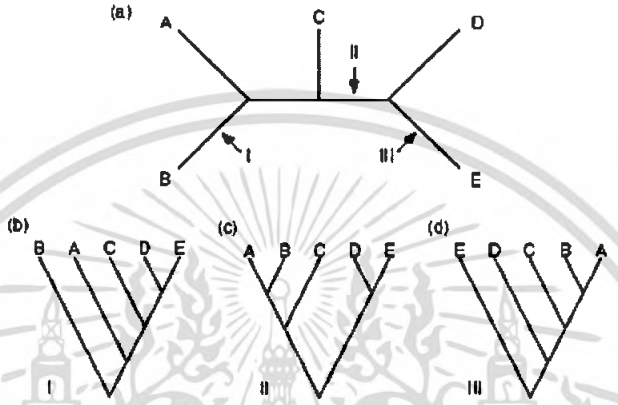
นักระบบวิทยา นิยมที่จะแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยวิธีการแสดงแผนภูมิการแตกกิ่งก้านสาขา ที่เรียกว่า แผนภูมิต้นไม้ (หรือเรียกว่าแผนภูมิเคลโดแกรม) แผนภูมิต้นไม้นี้จะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นกิ่ง (branches) และส่วนที่เป็นปม (nodes) มีบริเวณที่เป็นกิ่งภายใน (internal branches) ซึ่งจะเป็นกิ่งที่เชื่อมต่อกับกิ่งอื่นๆ ที่ปมภายใน (internal nodes) และมีบริเวณที่เป็นกิ่งริมด้านนอก (peripheral branches) ซึ่งจะเป็นกิ่งที่เชื่อมระหว่างปมภายในกับปมปลาย (terminal nodes) (หรือ ยอด (tips)) ซึ่งเป็นตำแหน่งของชนิดของสิ่งมีชีวิต (นิยมเรียกว่า แท็กซ่า (taxa)) แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 รูปแสดงส่วนประกอบต่างๆ และคำที่ใช้เรียกส่วนนั้นๆ ของแผนภูมิต้นไม้

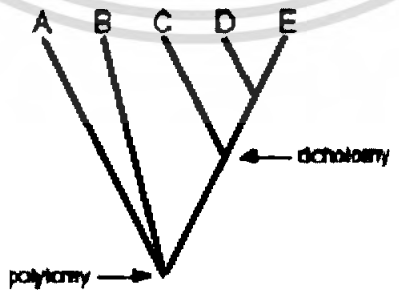
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลนั้น โดยมากจะเสนอในรูปแผนภูมิต้นไม้แบบตรึงรากแล้ว (rooted trees) คือ มีปมใดปมหนึ่งที่ถูกกำหนดให้เป็นราก (root) แม้ว่าในความเป็นจริงแล้ว วิธีการคำนวณส่วนใหญ่ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้จะเริ่มจากการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบไม่ได้ถูกตรึงราก (unrooted trees) ขึ้นมาก่อนก็ตาม แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 รูปแสดงแผนภูมิต้นไม้แบบยังไม่ได้ตรึงราก (unrooted tree; รูป a) และที่ตรึงราก (rooted tree; รูป b, c และ d) เมื่อตรึงรากที่ตำแหน่ง i, ii และ iii ตามลำดับ

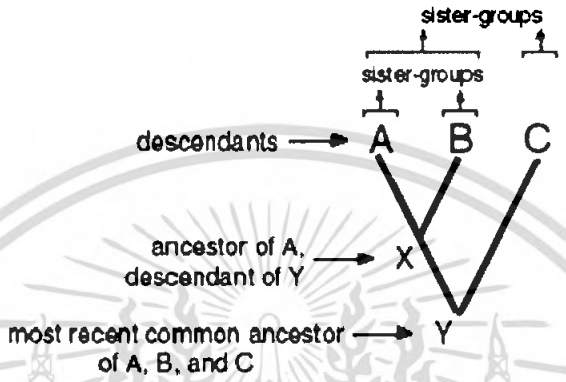
นอกจากนี้บนแผนภูมิต้นไม้ยังมีตำแหน่งที่เป็นไดโคโตมี่ (dichotomy, bifurcation) ซึ่งก็เป็นส่วนปมภายในที่เชื่อมโยงกิ่งสามกิ่ง และมีตำแหน่งที่เป็นโพลีโตมี่ (polytomy, mutifurcation) ซึ่งเป็นบริเวณปมที่เชื่อมโยงกิ่งมากกว่าสามกิ่ง แผนภูมิต้นไม้แบบที่ไม่มีบริเวณโพลีโตมี่อยู่เลย ถือได้ว่าเป็นแผนภูมิที่ได้แก้ปมเรียบร้อยแล้ว (fully resolved trees, strictly bifurcating) แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 รูปแสดงตำแหน่งไดโคโตมี่ (dichotomy) และโพลี่โตมี่ (polytomy) บนแผนภูมิต้นไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บนแผนภูมิต้นไม้แบบตรึงรากแล้วนั้น ปมที่ปรากฏอยู่ก่อนปมอื่นๆ จะเรียกว่าเป็นบรรพบุรุษ (ancestor) ขณะที่ปมอื่นนั้นจะเป็นรุ่นลูกหลาน (descendant) และ เมื่อปมสองปมหรือมากกว่านั้น มีบรรพบุรุษเดียวกัน เราจะเรียกทั้งสองปมว่า เป็นพี่น้อง (sisters) หรือเป็นกลุ่มพี่กลุ่มน้อง (sister groups) กัน แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 รูปแสดงตำแหน่งของบรรพบุรุษ (ancestor) และ รุ่นลูกหลาน (descendant) บนแผนภูมิต้นไม้

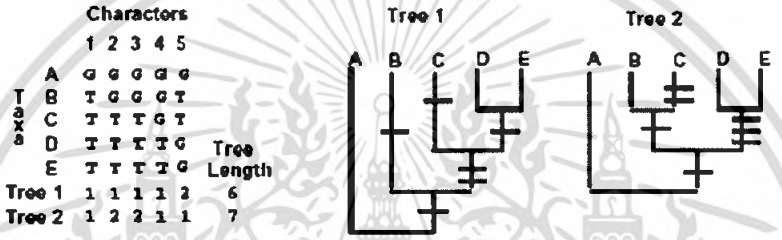
2.6.2 หลักพื้นฐานในการสร้างแผนภูมิต้นไม้

กระบวนการสร้างแผนภูมิต้นไม้ มีหลักคร่าวๆ ดังต่อไปนี้ คือ การรวบรวมข้อมูลที่เป็นลักษณะร่วมกันของสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจจะศึกษา กำหนดสภาวะลักษณะดั้งเดิมให้เป็นเลขศูนย์ ให้ภาวะที่พัฒนาแล้วเป็นเลขอื่นๆ สร้างตารางเมทริกซ์ระหว่างลักษณะกับชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา การสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่เป็นไปได้ให้มากที่สุดที่จะทำได้โดยการวิเคราะห์ทางคลาดิสติกส์ และเลือกแผนภูมิต้นไม้ที่ดีที่สุดคือเป็นแผนภูมิต้นไม้ที่มัธยัสถ์ที่สุด (the most parsimonious trees) หรือ มีลำดับขั้นวิวัฒนาการน้อยขั้นที่สุด (fewest evolutionary steps) ส่วนกระบวนการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากข้อมูลลักษณะทางโมเลกุลนั้น จะเป็นดังนี้คือ เก็บรวบรวมข้อมูลระดับโมเลกุล ซึ่งก็คือความแตกต่างระหว่างลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ จัดเรียง (align) ลำดับดีเอ็นเอจากตัวอย่างสิ่งมีชีวิตต่างๆ ซึ่งจะได้ออกมาในรูปตารางเมทริกซ์ของลำดับดีเอ็นเอ เลือกหาตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีความหมายทางวิวัฒนาการ ซึ่งก็คือ ตำแหน่งยีนคู่สม (homologous gene) ที่วิวัฒนาการมาด้วยกัน แล้วจึงทำการวิเคราะห์เชิงมัธยัสถ์ (pasimony analysis)

วิธีวิเคราะห์แบบมัธยัสถ์ (parsimony methods) เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยให้เราเลือกสมมติฐานทางวิวัฒนาการ (แผนภูมิต้นไม้) จากหลายสมมติฐานได้ โดยที่เมื่อเราพิจารณาโดยใช้กฎเกณฑ์ของวิธีมัธยัสถ์แล้ว เลือกเอาเคลโดแกรมที่มีจำนวนของการเปลี่ยนแปลงลักษณะ

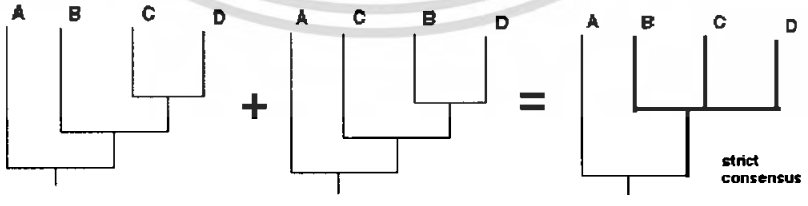
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(character changes) บนแผนภูมิต้นไม้อยู่น้อยที่สุด ซึ่งก็จะทำให้ได้ค่าความสอดคล้องกันของข้อมูล (congruence) มีค่าสูงสุด ขณะที่ค่าโฮโมเพลซี่ (จำนวนขั้นที่ต้องเพิ่มขึ้น) มีค่าต่ำสุด เพราะฉะนั้น ในทางปฏิบัติแล้ว เมื่อเราจะศึกษาลักษณะหนึ่งๆ ของสิ่งมีชีวิต เช่น ลำดับสายดีเอ็นเอที่นำมาจัดเรียงแล้ว วิธีวิเคราะห์แบบมัธยัสถ์จะกำหนดหาความลงตัว (fit) หรือจำนวนขั้นวิวัฒนาการ (evolutionary steps) ของลักษณะแต่ละลักษณะบนแผนภูมิต้นไม้ที่ได้ โดยที่ผลรวมทั้งหมดของการเปลี่ยนแปลงของลักษณะบนแผนภูมิต้นไม้ เรียกว่าเป็น ความยาวของต้นไม้ (tree length) ขณะที่จำนวนของการเปลี่ยนแปลงบนเฉพาะส่วนกิ่งของแผนภูมิ เรียกว่า ความยาวกิ่ง (branch lengths) แสดงดังรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.11 รูปแสดงการสร้างแผนภูมิต้นไม้จากข้อมูลลักษณะทางโมเลกุล (molecular data) และตามวิธีวิเคราะห์เชิงมัธยัสถ์ (parsimony analysis) แผนภูมิที่หนึ่งจะถูกเลือกเป็นแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อวิเคราะห์ตารางเมทริกส์ขนาดใหญ่ ซึ่งมักจะได้แผนภูมิต้นไม้ที่มัธยัสถ์ที่สุดแล้ว (most parsimonious trees, MPTs) มากกว่าหนึ่งแผนภูมิ แผนภูมิเหล่านี้จะต้องถูกนำไปใช้อ้างอิงอย่างเท่าเทียมกัน การสร้างแผนภูมิสรุปอย่างเช่น แผนภูมิต้นไม้แบบสอดคล้องรวมกัน (consensus tree) แสดงดังรูปที่ 2.12 ก็เป็นหนทางหนึ่งที่เราจะแสดงแผนภูมิที่มัธยัสถ์ที่สุดแล้ว (MPTs) ทุกแผนภูมิในเวลาเดียวกันได้

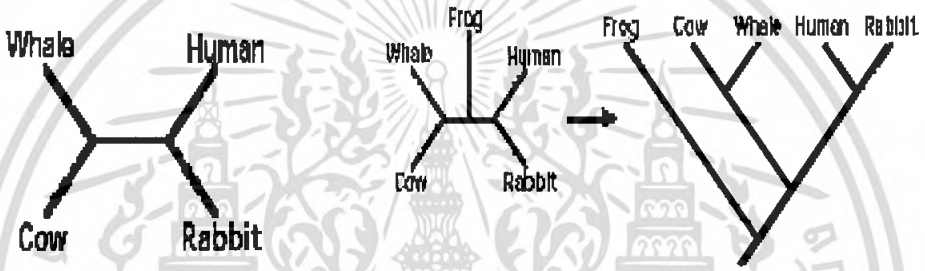


รูปที่ 2.12 รูปแสดงการสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบสอดคล้องรวมกัน (consensus tree)

ในความเป็นจริงแล้ว วิธีการคำนวณความสัมพันธ์ทางวิวัฒนการในระดับโมเลกุลนั้น จะสร้างแผนภูมิต้นไม้แบบที่ยังไม่ได้ถูกตรึงราก (unrooted trees) ขึ้นมาก่อน หลังจากนั้น แผนภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้นไม้ที่มัธยัสถ์ที่สุด (MPTs) จะถูกตรึงราก (rooted) เพื่อกำหนดทิศทาง (polarity) ของลักษณะและกำหนดเคลด การตรึงรากของแผนภูมินั้นนิยมทำโดยอาศัยการวิเคราะห์ด้วยสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup analysis) ซึ่งทำได้โดยการหาสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มที่ไม่เพียงแต่จะต้องเป็นชนิดที่แตกต่างจากสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม (ingroups) ให้มากที่สุดแล้ว แต่ยังจะต้องเหมือนกับบรรพบุรุษของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนั้นให้มากที่สุดด้วย แล้วนำสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มนี้มาวิเคราะห์รวมเข้ากับเคลโดแกรมที่ยังไม่ได้ตรึงราก และทำการวิเคราะห์ใหม่อีกครั้ง จากนั้นค่อยสร้างแผนภูมิต้นไม้ที่ตรึงรากแล้ว โดยการดึงเอาปม (node) ที่ต่อเชื่อมระหว่างสิ่งมีชีวิตในกลุ่มและสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม ให้ลงมาเป็นรากของแผนภูมิ แสดงดังรูปที่ 2.13



รูปที่ 2.13 รูปแสดงการตรึงราก (rooting) ให้กับแผนภูมิต้นไม้ โดยอาศัยสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม

นอกจากนี้แล้ว ในการสร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในระดับโมเลกุลนั้น ยังมีค่าทางสถิติหลายๆ แบบ เพื่อใช้สนับสนุนลักษณะและแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างขึ้น ซึ่งบอกความลงตัวของข้อมูลที่มีต่อแผนภูมิต้นไม้ที่สร้างขึ้น ค่าทางสถิติเหล่านี้ได้แก่ ค่า CI (consistency index), ค่า RI (rotention index), decay index, bootstrap, jackknife ฯลฯ ในทางปฏิบัติแล้ว เนื่องจากขนาดของตารางแมททริกซ์ข้อมูลลักษณะทางอณู มักมีขนาดใหญ่มาก นักระบบวิทยาจึงต้องอาศัยเครื่องคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการ โดยจะมีอยู่ 4 ขั้นตอนในการวิเคราะห์ คือ การเตรียมตารางเมทริกซ์ข้อมูล (data matrix preparation), การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence alignment), การคำนวณเชิงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนการ (phylogenetic computation) และ การวิเคราะห์และพิมพ์เคลโดแกรม (cladogram analysis and printing) ซึ่งการเลือกใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ใดในการวิเคราะห์ จะต้องพิจารณาถึงระบบปฏิบัติการ (operating system) ของเครื่องคอมพิวเตอร์ที่มีใช้อยู่, ความเร็วของโปรแกรม, ความง่ายในการใช้ และ ราคา ยกตัวอย่างเช่น Phylip เป็นชุดโปรแกรมที่ใช้ในการคำนวณความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ทำงานบนเครื่อง PC ซึ่งสามารถหามาใช้ได้โดยไม่ต้องซื้อ แต่ใช้งานได้ไม่ง่ายนัก ขณะที่โปรแกรม PAUP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นโปรแกรมที่ใช้งานได้ง่าย เพราะทำงานได้ดีบนระบบปฏิบัติการของเครื่องแม็คอินทอช แต่ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการซื้อโปรแกรม สำหรับข้อมูลของโปรแกรมต่างๆ

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cravanzola และคณะ (1997) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. brongniartii* 28 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากดักแด้ของแมลงบุก (*Melolontha melolontha*) 22 ไอโซเลท จากดักแด้ของแมลงบุก (*Melolontha hippocastani*) 5 ไอโซเลท บริเวณต่างๆ แถบยุโรป และอีก 1 ไอโซเลท จากดักแด้ของแมลงนูน (*Holotrichia serrata*) ประเทศอินเดีย โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ซึ่งไพรเมอร์ทั้ง 16 ชนิดที่ใช้คือ OPM-01, OPM-02, OPM-03, OPM-04, OPM-05, OPM-06, OPM-07, OPM-08, OPM-09, OPM-10, OPM-11, OPM-12, OPM-13, OPM-14, OPM-16 และ OPM-18 พบว่า สายพันธุ์ที่มาจากเมือง Valle d' Aosta ประเทศอิตาลี มีความรุนแรงต่อการก่อให้เกิดโรคในแมลงบุกได้ดี และใช้เครื่องหมายทางโมเลกุลประเมินผลความแตกต่างทางพันธุกรรม และจัดจำแนกวิวัฒนาการทางสายพันธุ์ของเชื้อรา *B. brongniartii* พบว่า แต่ละไอโซเลทมีความใกล้ชิดกันทางวิวัฒนาการ โดยแต่ละกลุ่มที่จำแนกนั้นไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาหรือสัตว์ที่เป็นแหล่งอาศัย

Berretta และคณะ (1998) ใช้เทคนิค RAPD ร่วมกับ dNTP ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ทั้ง 4 สี เมื่อมีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเข้ากันได้อย่างสมบูรณ์ ในการจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 18 ไอโซเลท จากประเทศอาร์เจนตินาและบราซิล โดยไพรเมอร์ที่ใช้ทั้ง 12 ชนิดคือ IDT. 10-1, IDT. 10-3, IDT. T010, OPO-2, OPO-3, OPO-4, OPO-5, OPO-7, OPO-10, OPO-11, OPO-12 และ OPO-14 ซึ่งการใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และโพลีอะคริลาไมด์ อิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 18 ไอโซเลทได้ และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่มาหรือสัตว์ที่เป็นแหล่งอาศัย โดยเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลท 3, 5, 10 และ 16 มีความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มที่ 1 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และมีความสามารถต่อการทำให้เกิดโรคในแมลงเจาะต้นอ้อย (*Diatraea saccharalis*)

Neuveglise และคณะ (1997) นำบริเวณ 28S rDNA มาใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของ *B. brongniartii* โดยบริเวณ ITS (internal transcribed spacers) มีไพรเมอร์หลากหลายชนิดที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ และให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ส่วนไพรเมอร์ที่นิยมใช้คือ ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4

Wang และคณะ (2002) ทำการศึกษาทางด้านโมเลกุลของเชื้อรา *Beauveria bassiana* ที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง โดยทำการศึกษาที่บริเวณ 28S rDNA ซึ่งนำมาใช้เป็นเครื่องหมายทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุล ที่ให้ความแตกต่างกันของสายพันธุ์ผสมในเชื้อรา *B. bassiana* คือสายพันธุ์ Bb 123 และ Bb 151 โดยใช้เทคนิค PCR และ เทคนิค RAPD-PCR ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR คือ ไพรเมอร์ I21 และ I22 เทคนิค RAPD-PCR ไพรเมอร์ที่ใช้ได้แก่ OPA-03, OPA-08, OPA-11, OPA-13, OPB-07, OPE-01 และ OPE-04 ซึ่งไพรเมอร์ OPA-03 ให้ความแตกต่างมากที่สุด และเทคนิค RAPD-PCR ที่ใช้วิเคราะห์แต่ละตัวอย่างจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ (double band) ที่เกิดขึ้นจากนิวเคลียสของสายพันธุ์ผสม ซึ่งเป็นแถบที่เกิดขึ้นจากสายพันธุ์ Bb 123 และ Bb 151 และผลวิเคราะห์ความสามารถของสายพันธุ์ผสมที่ก่อให้เกิดโรคในหนอนผีเสื้อ (*Galleria mellonella*) แสดงถึงการไม่ทำงานร่วมกันของสายพันธุ์ผสมที่ทำให้หนอนผีเสื้อเกิดโรคได้ ซึ่งตรงข้ามกับสายพันธุ์เดี่ยวของ Bb 123 ที่ก่อให้เกิดโรคในหนอนผีเสื้อได้ การศึกษานี้แสดงถึงความสำเร็จของสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทำให้หนอนผีเสื้อเกิดโรค โดยขึ้นอยู่กับวิธีการในการเพาะเลี้ยงในหนอนผีเสื้อทดลอง ซึ่งมี 2 วิธี คือ การฉีดพ่นสารละลายสปอร์และแช่ในสารละลายสปอร์ ซึ่งสายพันธ์ผสมนี้สามารถเจริญได้ในอาหารแข็งได้เช่นเดียวกับสายพันธุ์เดี่ยวปกติ แทนที่จะเจริญได้ทั้งในหนอนผีเสื้อและในหลอดอาหารทดลอง และความเร็วในการเจริญของสายพันธุ์เดี่ยวสามารถติดตามผลได้จากการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA และการเจริญของสายพันธุ์ผสมนั้นขึ้นอยู่กับอัตราส่วนสารละลายสปอร์ที่ใช้ของสายพันธุ์ Bb 123 และ Bb 151

Castrillo และคณะ (2003) ทำการศึกษาลักษณะเฉพาะทางเครื่องหมายโมเลกุลบนลำดับเบสที่มีลักษณะเฉพาะตัวด้วยเทคนิค RAPD ร่วมกับเทคนิคการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เจือจาง ในการคัดเลือกและตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ GHA ที่ได้จากแปลงเพาะปลูกผัก และไพรเมอร์ทั้ง 3 ที่ใช้ในเทคนิค RAPD นี้คือ OPA-14 F/R_{445}, OPA-15 F/R_{441}, OPB-9 F/R_{677} มีความสามารถสูงที่จับกับสายดีเอ็นเอที่มีขนาดเพียง 100 พิโกกรัม ของเชื้อ *B. bassiana* สายพันธุ์ GHA ซึ่งเทคนิคที่ใช้ในการทดลองนี้แสดงถึงความแตกต่างของเชื้อราจากแปลงปลูกผักได้

De Muro และคณะ (2003) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ของประเทศเคนย่า และประเทศอื่นๆ ทั้งหมด 50 ไอโซเลท และศึกษาความสัมพันธ์ชนิดของแมลงที่เกิดโรคจากราชนิดนี้กับแหล่งที่มาจากประเทศต่างๆ โดยใช้เทคนิค ITS-RFLP และเทคนิค AFLP ซึ่งผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค ITS-RFLP ที่ได้ แสดงข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกัน แต่ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP ให้ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่หลากหลาย โดยที่แบ่งกลุ่มความคล้ายคลึงกันตามลักษณะของขนาดแถบดีเอ็นเอที่เท่ากัน และชนิดของแมลงที่เกิดโรคจากเชื้อรา *B. bassiana* ไม่มีความสัมพันธ์กันกับแหล่งที่มาจากประเทศต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rehner และคณะ (2006) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของการแพร่กระจายของเชื้อรา *B. bassiana s.l.* จากทวีปแอฟริกาและอเมริกาที่ก่อให้เกิดโรคในด้วงเจาะเมล็ดกาแฟ (*Hypothenemus hampei*) โดยทำการศึกษาจาก 2 บริเวณในอาร์ดีเอ็นเอคือ บริเวณ *EFutr* และ *Bloc* พบว่าไอโซเลทส่วนใหญ่ทั้งจากทวีปอเมริกา และทวีปแอฟริกาต่างมีจุดกำเนิด หรือแหล่งที่มาเดียวกัน แม้ว่าความสัมพันธ์ของเชื้อจากทั้งสองทวีปยังไม่สามารถอธิบายได้ แต่สิ่งที่สนับสนุนคือการพบว่ายีนทั้งสองนั้นเหมือนกันทั้งในทวีปอเมริกาและแอฟริกา และความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบได้จากรูปแบบดีเอ็นเอบริเวณ *EFutr* และ *Bloc* ที่สอดคล้องกัน อาจเกิดมาจากการแยกจากกันของกลุ่มตัวอย่างก่อนที่จะมีการค้าขายกาแฟทั่วโลก เนื่องจากเชื้อที่มาจากทวีปอเมริกาสามารถอยู่ในแมลงอาศัยได้หลายชนิด

Estrada และคณะ (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางวิวัฒนาการทางสายพันธุ์ของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้งหมด 11 ไอโซเลท โดยใช้เทคนิค PCR ที่บริเวณ Inter-microsatellite (ISSR) จากการใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสซ้ำๆ กัน และไพรเมอร์ 873 ISSR ที่มีลำดับเบส $(GACA)_4$ ให้ผลจากการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้เด่นชัดที่สุด เมื่อนำค่าวิเคราะห์มาสร้างแผนภูมิเดลโดแกรม สามารถแบ่งกลุ่มไอโซเลทได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่มาจากแถบแคริบเบียนทั้งหมดและจากประเทศอื่น โดยที่ไอโซเลททั้ง 2 กลุ่ม มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลทจากประเทศคิวบามีความจำเพาะต่อการเกิดโรคในหนอนผีเสื้อเจาะลำต้นอ้อยมากกว่าไอโซเลทอื่นๆ ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อรา *Beauveria bassiana* 5 ไอโซเลทได้มาจาก

Bb 004	จาก รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่ทราบชนิดของแมลงที่เป็นแหล่งอาศัย
Bb 010	จากศูนย์วิจัยกำจัดศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ โดยคัดแยกจากแมลงดำหนามมะพร้าว
Bb 011	จากศูนย์วิจัยกำจัดศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ โดยคัดแยกจากแมลงค่อมทอง
Bb 012	จากศูนย์วิจัยกำจัดศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ โดยคัดแยกจากแมลงปลวกศูนย์
Bb 013	จากศูนย์วิจัยกำจัดศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ โดยคัดแยกจากแมลงงวงอ้อย

3.2 สารเคมี

3.2.1 Potato Dextose Agar (PDA)

3.2.2 Potato Dextose Broth (PDB)

3.2.3 Dichloran-Glyceral Agar (DG 18)

3.2.4 Water agar (WA)

3.2.5 Distilled water

3.2.6 Chloramphenical

3.2.7 Cyclohexamide

3.2.8 DNA extraction (E-Z KIT)

3.2.9 Primer

3.2.10 dNTP

3.2.11 Taq DNA polymerase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.12 Dye

3.2.13 Ethidium bromide

3.2.14 Agarose gel 1%

3.2.15 Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1)

3.2.16 Isopropanol

3.2.17 Ethanol 80 %

3.2.18 Ethanol 95 %

3.2.19 Liquid nitrogen

3.2.20 0.25M EDTA pH 8.0

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 Flask

3.3.2 Tube

3.3.3 Auto pipette

3.3.4 Tip

3.3.5 Grinder

3.3.6 Cork borer

3.3.7 Vortex

3.3.8 Microcentrifuge

3.3.9 Thermocycler

3.3.10 Electrophoresis

3.3.11 Water bath

3.3.12 Spectrophotometer

3.3.13 UV transmission and Gel document

3.3.14 NTSYS program version 2.0 UPGMA

3.3.15 SPSS program version 14.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติ

3.4.1.1 การคัดแยกเชื้อจากดินในธรรมชาติ

1. นำดินที่ได้จากธรรมชาติมาทำ dilution plate โดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2} และ 10^{-3}

2. ใช้ปิเปตดูดสารละลายดินที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Water agar และ Dichloran-Glyceral Agar (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้ทั่วด้วยเทคนิค Spread plate ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

3. ตรวจดูโคโลนีของเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวฟู และแยกไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

4. นำเชื้อที่แยกได้มาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* เพื่อนำไปทำการทดลองขั้นต่อไป

3.4.1.2 การคัดแยกเชื้อจากแมลงที่เก็บได้ในธรรมชาติ

1. เตรียมสารละลายน้ำกลั่นที่มี Tween 20 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนของ Tween 20 จำนวน 1 หยด ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ใช้หลอดหยดดูดสารละลายน้ำกลั่นที่มี Tween 20 หยดลงบนสไลด์ 1 หยด ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3. นำลูปเขี่ยเชื้อราที่ขึ้นบริเวณข้อต่อของตัวแมลง ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และนำไปเกลี่ยให้ทั่วบนสารละลายที่หยดไว้บนสไลด์ เพื่อทำเป็นสารละลายสปอร์

4. นำลูปที่จุ่มสารละลายสปอร์มาทำ single spore ด้วยวิธี Cross Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของโคโลนีทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน

5. ตรวจลักษณะโคโลนีของเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาว ผิวหน้าโคโลนีมีผงสีขาวคล้ายผงแป้ง และแยกไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน

6. นำเชื้อที่คัดแยกได้มาทำสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาหาลักษณะของสปอร์และเส้นใยของเชื้อ *B. bassiana* และนำมาใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

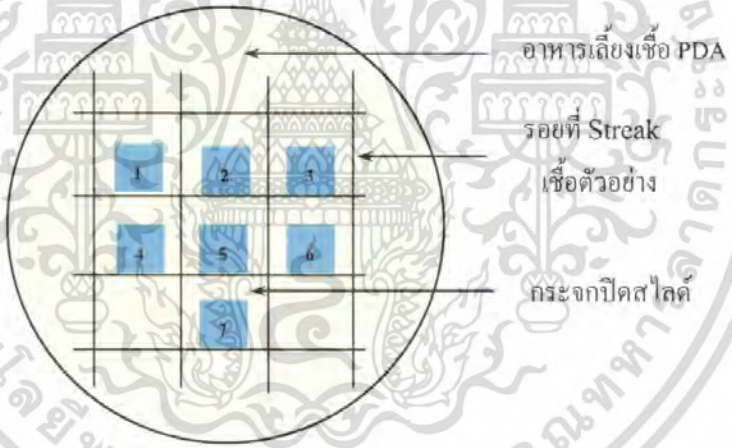
3.4.2 การทำสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อ

1. นำเชื้อตัวอย่างมาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยเทคนิค Cross-Hatch Streak โดยขีดเชื้อตัวอย่างลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ให้มีลักษณะเป็นตารางสี่เหลี่ยม ดังรูปที่ 3.1

2. ปักกระจกปิดสไลด์ 7 แผ่น ต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ ลงตามรอยที่ขีดเชื้อไว้ โดยใช้คีมคีบด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และควรปักกระจกปิดสไลด์ให้เอียงทำมุมกับผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ 45 องศา

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยนำกระจกปิดสไลด์ออกมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในวันที่ 2 ของการเพาะเลี้ยง

4. ส่องสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อศึกษาลักษณะของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อตัวอย่าง และทำการบันทึกภาพถ่ายของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อตัวอย่าง



รูปที่ 3.1 แสดงการทำสไลด์เพาะเลี้ยงเชื้อด้วยเทคนิค Cross-Hatch Streak

3.4.3 การทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลทที่อุณหภูมิต่างๆ

1. นำเชื้อมาทำ Single spore ด้วยวิธี Cross streak เมื่อได้ Single spore แล้ว ทำแยกมาเลี้ยงในจานอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2. ทำการเจาะด้วย cork borer โดยเลือกบริเวณโคโลนีที่มีอายุการเจริญของเชื้อเท่ากัน

3. ใช้ needle นำชิ้นส่วนของเชื้อที่เจาะไว้มาเลี้ยงในอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง อุณหภูมิละ 3 ซ้ำ ทำการบันทึกผลทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทำการบันทึกผลการเจริญของเชื้อราทุกๆ 3 วัน เป็นเวลา 21 วัน โดยสังเกตจาก สี รูปร่าง และระยะเวลาการสร้างสปอร์ ลักษณะและขนาดของก้านชูสปอร์ และลักษณะของโคโลนี

3.4.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายระดับโมเลกุลโดยเทคนิค RAPD

3.4.4.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับสกัดดีเอ็นเอ

1. นำเชื้อมาทำ Single spore ด้วยวิธี Cross streak จากนั้นทำการแยกมาเลี้ยงในอาหาร PDB บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2. ใช้เข็มเกี่ยวตัวอย่างเชื้อราจากขวดอาหาร PDB ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งหลอด

3. นำมาล้างด้วย 0.25 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำมา vortex และ spin down จากนั้นดูดสารละลาย EDTA ทิ้ง และล้างซ้ำอีกครั้ง

4. นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำมา vortex และ spin down จากนั้นดูดน้ำกลั่นทิ้ง และล้างซ้ำอีกครั้ง

5. นำตัวอย่างเชื้อมาใส่ในโกร่งที่แช่เย็น และเติมไนโตรเจนเหลว บดให้เป็นผงละเอียด

3.4.4.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด DNA E-Z KIT

1. เทตัวอย่างที่บดเป็นผงละเอียดแล้ว ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 100-150 มิลลิกรัม

2. เติม Buffer DA ที่อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม Buffer DB ที่อุ่นอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 40 ไมโครลิตร จากนั้น vortex นาน 10 วินาที

3. ทำการบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และย้ายหลอดมาที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

4. เติม Chloroform : Isoamyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำมา vortex นาน 10 วินาที

5. นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ดูดส่วนใสด้านบน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Isopropanol ที่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 วินาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7. ดูดสารละลายทิ้ง และล้าง pellet ด้วยเอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

8. ดูดสารละลายทิ้ง และนำ pellet ของดีเอ็นเอมาทำให้แห้ง โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาละลายใน TE buffer (50-100 ไมโครลิตร)

3.4.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

1. ทำการเจือจางสารละลายดีเอ็นเอ 100 เท่า โดยใช้สารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่น 495 ไมโครลิตร

2. ผสมสารละลายด้วยวิธี finger mix และนำมา spin down

3. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง Biomate 3 V2.100 2K5J34002 โดยมีขั้นตอนการทำงานดังนี้

ก. เปิดสวิตซ์หลังเครื่อง รอการทำงานของเครื่องสักครู่

ข. หน้าจอปรากฏ Biomate Start Menu ให้เลือก DNA (260/280) จะปรากฏคำสั่ง Test setup เพื่อตั้งค่าตามที่ต้องการ

ค. ตั้งค่าการใช้งาน 2 ค่า คือ Wave length 1 เท่ากับ 260 และ Wave length 2 เท่ากับ 260

ง. ตั้งค่า Dilution factor โดยเลือกคำสั่ง More parameter กด Enter เพื่อทำการตั้งค่า

จ. เลือกคำสั่ง Dilution Multiplier กด Enter

ฉ. เลือกคำสั่ง Sample volume กด Enter พิมพ์ปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง กด Enter

ช. เลือกคำสั่ง Dilution volume กด Enter พิมพ์ค่าความเจือจางที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง กด Enter

ซ. กด Enter เพื่อบันทึกค่าที่ตั้งไว้

ฌ. กด ESC ดูค่า Dilution Multiplier เพื่อตรวจสอบความถูกต้อง

ญ. กด ESC เพื่อออกมาสู่หน้า Test setup

ฎ. กด Run test เข้าสู่หน้าจอแสดงข้อมูลที่ใช้ในการวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฏ. วัดค่าการดูดกลืนแสง โดยทำการวัด Blank ก่อนเลือกคำสั่ง Measure Blank

ฐ. วัดค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่าง เลือกคำสั่ง Measure sample

ฑ. เมื่อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงตัวอย่างเสร็จแล้ว กด ESC ออกจนหน้าจอปรากฏ Biomate Start Menu และทำการปิดสวิตซ์เครื่อง

3.4.4.4 การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในเทคนิค RAPD

1. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร มาใช้ในการคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้

ปริมาณดีเอ็นเอ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร × 50 × ค่าความเจือจาง (3.1)

เมื่อ A แทนปริมาณดีเอ็นเอที่คำนวณได้ มีหน่วยเป็นไมโครกรัม/มิลลิลิตร

2. นำค่าปริมาณดีเอ็นเอ A ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ในเทคนิค RAPD ในหน่วยไมโครลิตร โดยต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 1000 นาโนกรัม ซึ่งมีวิธีการคำนวณดังนี้

ต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 1000 นาโนกรัม จากดีเอ็นเอปริมาณ A ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ปริมาณดีเอ็นเอ A ไมโครกรัม/มิลลิลิตร = A× 1000 นาโนกรัม / 1000 ไมโครลิตร

= A นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ดังนั้น ปริมาณดีเอ็นเอ A นาโนกรัม จะมีอยู่ในสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร

ถ้าต้องการใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 1000 นาโนกรัม ในเทคนิค RAPD

ต้องใช้ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ = (1000 × 1)/A

= 1000/A ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.5 การวิเคราะห์ผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร น้ำ 5 ไมโครลิตร และสีย้อม (dye) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำสารละลายผสมมาเติมลงในช่องบนแผ่นเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ข) โดยที่ใส่ลงช่องละ 1 ตัวอย่าง

2. เปิดสวิตซ์ของเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเลือกใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และเลือกขั้วความต่างศักย์ไฟฟ้าจากลบไปบวก เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

3. เมื่อครบเวลา นำแผ่นเจลอะกาโรสมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์เป็นเวลา 10 นาที และนำมาล้างในน้ำกลั่น 20 นาที

4. เมื่อครบเวลา นำแผ่นเจลอะกาโรสมาส่องดูลักษณะแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกผลเป็นภาพถ่าย

3.4.4.6 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD

1. เติม DI water ลงในหลอดทดลองสำหรับทำ PCR ปริมาตรตามที่คำนวณได้ให้ครบ 25 ไมโครลิตร (ลบจำนวนสารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม และสารละลาย Master Mix 7.6 ไมโครกรัม)

2. เตรียมสารละลาย Master Mix โดยนำไป vortex และ spin down จากนั้นแบ่ง Master Mix ใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับทำ PCR ที่เติม DI water แล้ว โดยปริมาตรของ Master Mix เท่ากับ 7.6 ไมโครกรัม ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 3.1 ซึ่งส่วนประกอบของ Master Mix มีดังนี้

- 10×PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
- Mix dNTPs (1.25 mM, Invitrogen)	3.2	ไมโครลิตร
- Primer (20 *p*mol/µl)	1.0	ไมโครลิตร
- $MgCl_2$ (50 mM)	1.2	ไมโครลิตร
- Taq DNA polymerase (Vivatis)	0.2	ไมโครลิตร

3. เติมสารละลายดีเอ็นเอซึ่งได้จากการคำนวณลงในหลอดทดลองเพื่อทำ PCR จากนั้นนำไป vortex และ spin down และนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยทำการตั้งค่าในการทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.2

4. นำสารละลายดีเอ็นเอหลังจากการทำปฏิกิริยา RAPD ไปวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำการบันทึกผลภาพถ่ายของแถบดีเอ็นเอ เพื่อนำไปวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ RAPD

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5' ⟶ 3'	% GC
OPA-20	5' >GTT GCG ATC C< 3'	60
OPAM-03	5' >CTT CCC TGT G< 3'	60
OPAM-12	5' >TCT CAC CGT C< 3'	60
OPB-14	5' >TCC GCT CTG G< 3'	70
OPB-18	5' >CCA CAG CAG T< 3'	60
OPC-04	5' >CCG CAT CTA C< 3'	60
OPC-09	5' >CTC ACC GTC C< 3'	70
OPE-07	5' >AGA TGC AGC C< 3'	60
OPG-13	5' >CCA CAC TAC C< 3'	60

ตารางที่ 3.2 แสดงปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ PCR แต่ละขั้นตอน

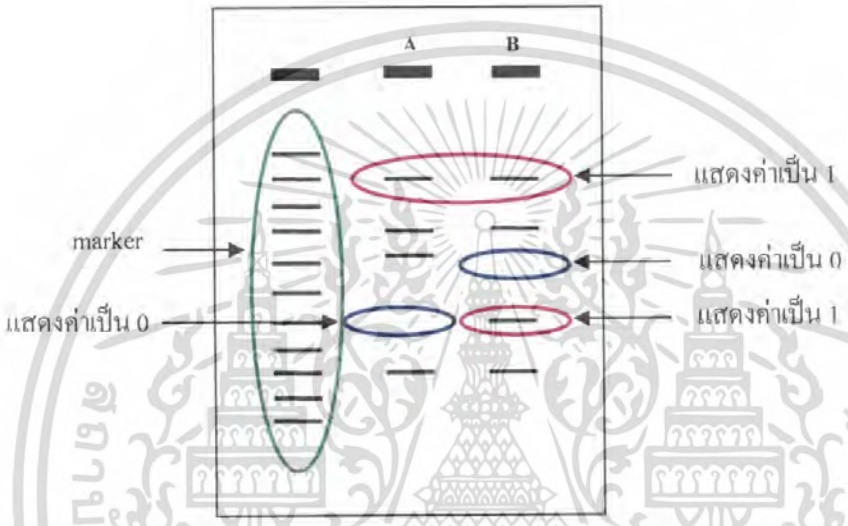
ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอน	อุณหภูมิและเวลา	จำนวนรอบซ้ำ
Initiation Denaturing Step	94°C เวลา 1 นาที	1
Denaturing Step	94°C เวลา 1 นาที	45
Annealing Step	35°C เวลา 1 นาที	
Extention Step	72°C เวลา 1 นาที	
Final Extention Step	72°C เวลา 5 นาที	1

3.4.4.7 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

1. ทำการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอจากภาพถ่าย โดยทำการวิเคราะห์ครั้งละ 2 ไอโซเลท เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันของแต่ละไอโซเลท ถ้าปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นแสดงค่าเป็น 1 และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นแสดงค่าเป็น0 โดยเปรียบกับระดับของ 100 bp DNA leader (Vivantis) แสดงดังรูปที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. นำข้อมูลที่มีค่าเป็น 1 และ 0 ของแต่ละไพรเมอร์ไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 โดยวิธี unweighted pair group method arithmetic (UPGMA)



รูปที่ 3.2 แสดงการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

3.4.5 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ *B. bassiana* ต่อหนอนใยผัก

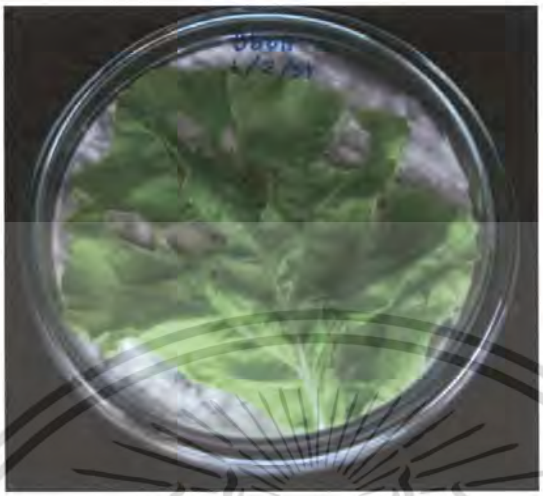
3.4.5.1 การคัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่เหมาะสมต่อการทำให้ติดเชื้อในหนอนใยผัก

1. ทำการเลี้ยงเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท เพื่อเพิ่มปริมาณด้วยวิธี Simple streak ลงในจานอาหาร PDA และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน

2. คัดเลือกหนอนใยผักที่มีอายุใกล้เคียงกัน ใส่ลงในจานอาหาร PDA ที่มีเชื้อตัวอย่างทั้ง 5 ไอโซเลท เจริญอยู่ จานละ 10 ตัว จำนวน 2 ซ้ำ และทำชุดควบคุม โดยเลี้ยงหนอนใยผักในจานอาหาร PDA ที่ไม่มีการเจริญของเชื้อไอโซเลทต่างๆ จำนวน 2 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7 วัน แสดงดังรูปที่ 3.3

3. บันทึกจำนวนของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อตัวอย่างทั้ง 5 ไอโซเลท และเลือกเชื้อตัวอย่างไอโซเลทที่ทำให้เกิดการติดเชื้อมากที่สุด มาคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.3 แสดงจานอาหารเลี้ยงเชื้อตัวอย่างที่ใช้การคัดเลือกเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท

3.4.5.2 การทดสอบความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่เหมาะสมต่อการติดเชื้อในหนอนใยผัก

1. เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อ กระดาษทิชชู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. นำตัวหนอนใยผักใส่ลงในจานอาหารที่เตรียมไว้ จานละ 10 ตัว

3. เตรียมสารละลายน้ำกลั่นที่มี tween 20 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ โดยใช้อัตราส่วนของ tween 1 หยด ต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายน้ำกลั่นที่มี tween ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารที่มีเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลทที่เหมาะสมเจริญอยู่

5. ใช้ spatula ขูดสปอร์และเส้นใยของเชื้อราที่เจริญออก และกรองผ่านแผ่นสำลีลงในขวดรูปชมพู่ใบเดิม

6. นำสารละลายที่ได้มาทำการตรวจนับสปอร์โดยวิธี Direct count (วิธีการดังภาคผนวก ค) และปรับกำลังสปอร์ด้วยน้ำกลั่นที่มี tween 20 ผสมอยู่ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1×10^{7} สปอร์/มิลลิลิตร และทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ 1×10^{6}, 1×10^{5}, 1×10^{4}, 1×10^{3} สปอร์/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายสปอร์ของเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆ ทั้ง 5 ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษทิชชู่และใบผักกาดที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้ทั่ว ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน แสดงดังรูปที่ 3.4

8. บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงจากจำนวนหนอนที่ตาย และนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS version 14.0

รูปที่ 3.4 แสดงการคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพต่อการติดเชื้อในหนอนใยผัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

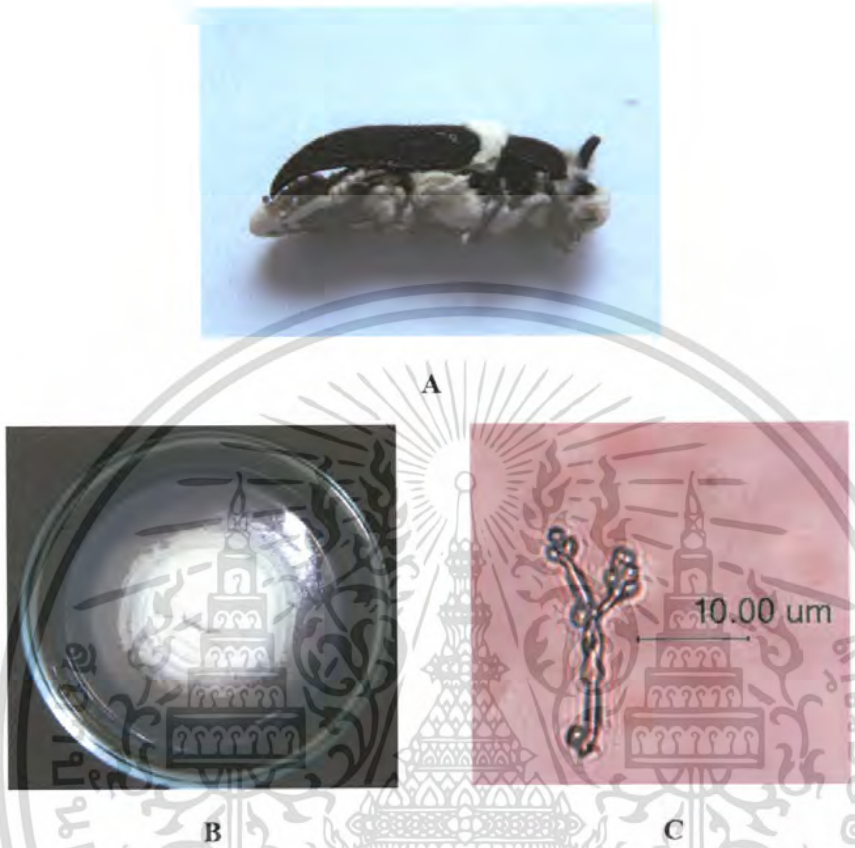
4.1 การคัดแยกเชื้อจากธรรมชาติ

ในการคัดแยกเชื้อรา *B. bassiana* จากดินธรรมชาติ และแมลงที่เกิดการติดเชื้อ 10 แหล่ง รวมจำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อรา *B. bassiana* ได้ 1 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.1) โดยเชื้อราที่คัดแยกได้จะมีลักษณะการเจริญบนอาหารได้ช้ากว่าเชื้อราชนิดอื่นๆ สปอร์มีรูปร่างกลม ใส ไม่มีสี เส้นใยสีขาวฟูแน่น ผิวหน้าเรียบ รอบๆ มีการเจริญเป็นวงซ้อนกันมากกว่าหนึ่งวง บางบริเวณเจริญเป็นร่องลึกลงไปในอาหาร และกลางโคโลนีมีลักษณะเป็นผงแป้งสีขาวอมเหลือง แสดงดังรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของเชื้อรา *B. bassiana* ที่คัดแยกจากธรรมชาติ

ลำดับ	รหัส	คัดแยกจาก	แหล่งที่มา	ผลการคัดแยก
1	SA03	ดิน	น้ำตกเจ็ดสาวน้อย (ริมน้ำตก) จ. นครราชสีมา	ไม่พบ
2	SA04	ดิน	น้ำตกเจ็ดสาวน้อย (ห่างจากน้ำตก 16 เมตร) จ.นครราชสีมา	ไม่พบ
3	SD05	ดิน	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จุดที่ 1 จ.กาญจนบุรี	ไม่พบ
4	SD06	ดิน	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จุดที่ 2 จ.กาญจนบุรี	ไม่พบ
5	SD11	ดิน	เขื่อนศรีนครินทร์ จุดที่ 1 จ.กาญจนบุรี	ไม่พบ
6	SD12	ดิน	เขื่อนศรีนครินทร์ จุดที่ 2 จ.กาญจนบุรี	ไม่พบ
7	IA001	แมลงปีกแข็ง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเดียวดาย จุดที่ 1 จ. นครนายก	พบ
8	IA002	แมงมุม	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเดียวดาย จุดที่ 2 จ. นครนายก	ไม่พบ
9	IA003	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ บริเวณหอดูสัตว์ เขาใหญ่ จ. นครนายก	ไม่พบ
10	IA004	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเดียวดาย จุดที่ 3 จ. นครนายก	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะแมลงที่ติดเชื้อ *B. bassiana* ในธรรมชาติ (A) ลักษณะโคโลนี (B) และสปอร์ (C) ของไอโซเลท IA 001

4.2 การทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งที่อุณหภูมิห้องมีอุณหภูมิประมาณ 26.5-28.5 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยที่ Bb 004, Bb 011, Bb 012 และ Bb 013 มีลักษณะผิวหน้าโคโลนีแผ่เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร แต่ไอโซเลท Bb 010 มีลักษณะของผิวหน้าโคโลนีขรุขระ และทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญเป็นวงขยายออกไป ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายแป้งสีขาว มีระยะเวลาสร้างสปอร์ภายใน 3-4 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยง สปอร์มีขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถวัดอัตราการเจริญโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และพบว่าที่อุณหภูมิห้อง เชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญมากที่สุด ดังตารางที่ 4.2-4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ไอโซเลท	แหล่งที่พบ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์					สีอาหาร PDA
			รูปร่าง	สี	ระยะเวลาสร้างสปอร์	ก้านชูสปอร์	ขนาดก้านชูสปอร์(µm)	
Bb 004	ไม่ทราบแหล่งที่มา	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวฟู นูนแน่น ต่อมาโคโลนีเรียบ เป็นฝุ่นคล้ายผงแป้ง มีสีขาวอมเหลือง และมีการเจริญของสโตรมากลางโคโลนี	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 010	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น ต่อมาเส้นใยบางบริเวณเริ่มฟู และมีการเจริญแผ่ออกเป็นวง ผิวหน้าโคโลนีขรุขระ และบริเวณที่มีการสร้างสปอร์จะมีลักษณะเป็นผงแป้ง สีขาวอมส้ม	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 011	Coleoptera	สร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น โดยแผ่แนบไปกับผิวหน้าอาหาร ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน บริเวณกลางโคโลนีมีร่องลึกลงไปในอาหาร ลักษณะเป็นผงสีขาว และมีสโตรมาเจริญ	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 012	Isoptera	เริ่มสร้างสร้างเส้นใยสีขาว เบาบาง และฟู ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกันอย่างชัดเจน ผิวหน้าเรียบแนบกับอาหาร มีเส้นใยสีขาวบางๆ ฟูทั่วโคโลนี บริเวณกลางโคโลนีเป็นผงสีขาว	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	ขาวอมเหลือง
Bb 013	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวฟูแน่น ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน แผ่แนบกับผิวอาหาร มีสโครมาขนาดเล็กเจริญ และโคโลนีมีลักษณะเป็นผงสีขาว	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน

ตารางที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

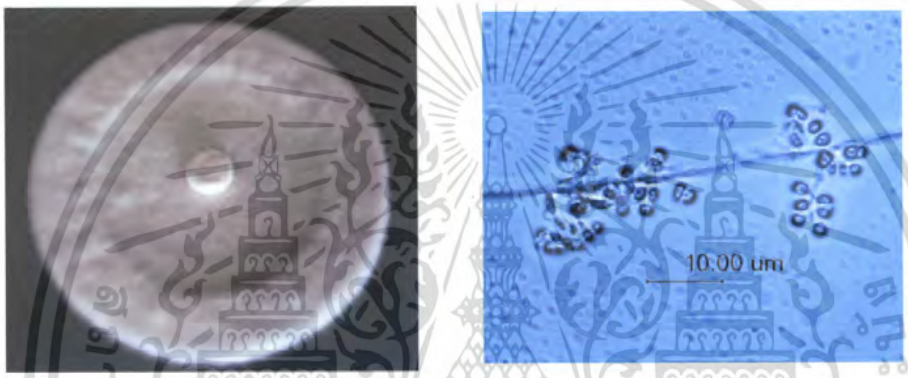
ไอโซเลท	แหล่งที่พบ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์					สีอาหาร
			รูปร่าง	สี	ระยะเวลาสร้างสปอร์	ก้านชูสปอร์	ขนาดก้านชูสปอร์(μm)	
Bb 004	ไม่ทราบแหล่งที่มา	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวฟู นูนแน่น ต่อมามีการเจริญแผ่เป็นวงซ้อนกัน บริเวณกลางโคโลนีเรียบ เป็นฝุ่นคล้ายผงแป้ง สีขาว และมีการเจริญของสโตรมา	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	บางบริเวณสีไม่เปลี่ยน บางบริเวณมีสีเหลืองอ่อน
Bb 010	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น ต่อมามีการเจริญแผ่ออกเป็นวง ผิวหน้าขรุขระ รอบๆ โคโลนีเส้นใยฟู สีขาว และบริเวณที่สร้างสปอร์จะเป็นผงคล้ายแป้ง สีขาวอมส้ม	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 011	Coleoptera	สร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น ผิวหน้าเรียบต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน บริเวณกลางโคโลนีมีลักษณะเป็นผงสีขาว และมีสโตรมาเจริญเส้นใยฟู สีขาวรอบๆ โคโลนี	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 012	Isoptera	เริ่มสร้างสร้างเส้นใยสีขาว เบาบาง และฟู ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกันอย่างชัดเจน ผิวหน้าเรียบแนบกับอาหาร บริเวณกลางโคโลนีเป็นผงสีขาว และมีสโตรมาเล็กๆ	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	ขาวอมเหลือง
Bb 013	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาว ฟู และแน่น ต่อมามีการเจริญออกเป็นวงซ้อนกัน แผ่แนบไปกับผิวหน้าอาหาร กลางโคโลนีมีสโตรมาเจริญ และมีลักษณะเป็นผงสีขาว	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน

ตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิห้อง

ไอโซเลท	แหล่งที่พบ	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะสปอร์					สีอาหาร
			รูปร่าง	สี	ระยะเวลาสร้างสปอร์	ก้านชูสปอร์	ขนาดก้านชูสปอร์(μm)	
Bb 004	ไม่ทราบแหล่งที่มา	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวฟู นูนแน่น ต่อมามีการเจริญแผ่เป็นวงซ้อนกัน บริเวณกลางโคโลนีเรียบ เป็นฝุ่นคล้ายผงแป้ง มีสีเหลืองนวล และมีการเจริญของสโตรมากลางโคโลนี	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	ขาวอมเหลือง
Bb010	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น ต่อมามีการเจริญแผ่ออกเป็นวงซ้อนกัน ผิวหน้าขรุขระ และบริเวณที่มีการสร้างสปอร์จะมีลักษณะเป็นผงแป้ง สีขาวอมส้ม	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 011	Coleoptera	สร้างเส้นใยสีขาวนูนแน่น โดยแผ่แนบไปกับผิวหน้าอาหาร ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกัน บริเวณกลางโคโลนีมีร่องลึกลงไปในอาหารลักษณะเป็นผงสีเหลืองนวล และมีการสร้างสโตรมาเส้นใยฟูสีขาวรอบๆ โคโลนี	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 012	Isoptera	สร้างเส้นใยสีขาว เบาบาง และฟู ต่อมามีการเจริญเป็นวงซ้อนกันอย่างชัดเจน ผิวหน้าเรียบแนบกับอาหาร บริเวณที่มีการสร้างสปอร์เป็นผงสีขาว	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	4 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน
Bb 013	Coleoptera	เริ่มสร้างเส้นใยสีขาว ฟู และแน่น ต่อมามีการเจริญออกเป็นวงซ้อนกัน แผ่แนบไปกับผิวหน้าอาหาร บริเวณที่สร้างสปอร์มีลักษณะเป็นผงคล้ายแป้งสีเหลืองนวลและกลางโคโลนีมีการเจริญของสโตรมา	ทรงกลม	ใส ไม่มีสี	3 วัน	ตั้งขึ้นเป็นก้านยาว เรียงเป็นเส้นเดียว หรือเป็นกิ่งก้าน	7-8	เหลืองอ่อน

4.3 ลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิต่างๆ

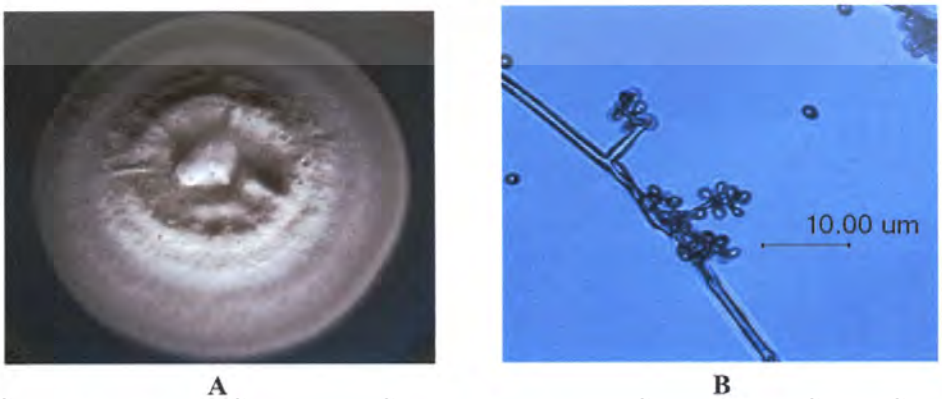
การเจริญของไอโซเลท Bb 004 ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลท Bb 004 มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยที่ผิวหน้าโคโลนีมีลักษณะเรียบนูน เป็นผงคล้ายแป้ง สีขาวอมเหลือง แสดงดังรูปที่ 4.2 A และสปอร์มีลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาว 7-8 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.2 B



A B

รูปที่ 4.2 แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 004

การเจริญของไอโซเลท Bb 010 ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลท Bb 010 มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยที่ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะขรุขระ เจริญออกเป็นวง และเป็นผงคล้ายแป้ง สีขาวอมส้ม แสดงดังรูปที่ 4.3 A และสปอร์มีลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.3 B



A B

รูปที่ 4.3 แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 010

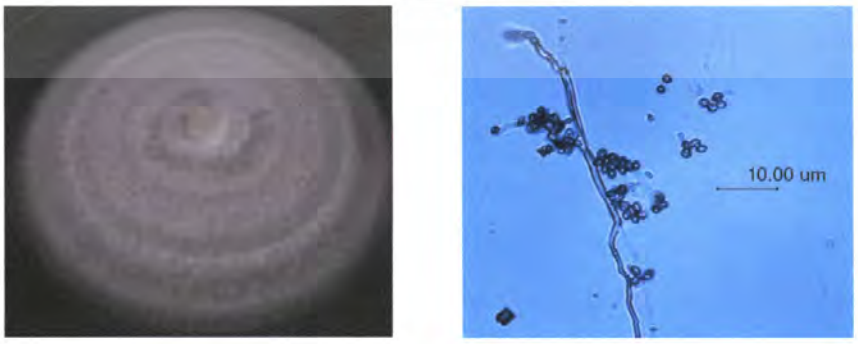
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของไอโซเลท Bb 011 ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลท Bb 011 มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยที่ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะแผ่เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร เจริญออกเป็นวงซ้อนกันหลายวง และเป็นผงคล้ายแป้ง สีเหลืองนวล แสดงดังรูปที่ 4.4 A และสปอร์มีลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.4 B

A B

รูปที่ 4.4 แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 011

การเจริญของไอโซเลท Bb 012 ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลท Bb 012 มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยที่ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะแผ่เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร เส้นใยเบาบาง และฟู มีเจริญออกเป็นวง และเป็นผงคล้ายแป้ง สีขาว แสดงดังรูปที่ 4.5 A และสปอร์มีลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.5 B

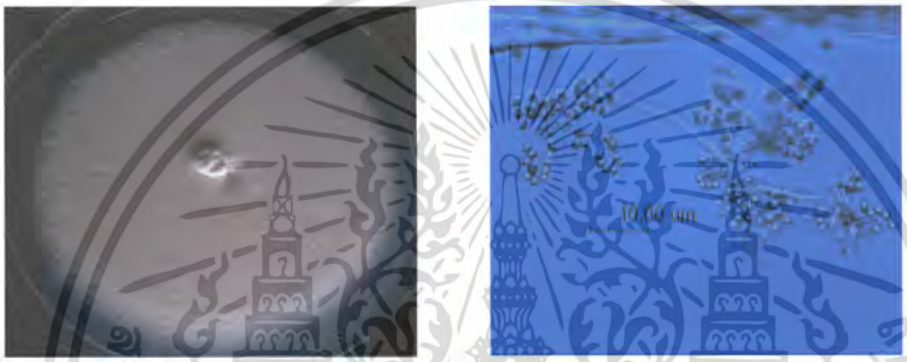


A B

รูปที่ 4.5 แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของไอโซเลท Bb 013 ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ลักษณะของโคโลนีและสปอร์ของไอโซเลท Bb 013 มีลักษณะไม่แตกต่างกัน โดยที่ผิวหน้าของโคโลนีมีลักษณะแผ่เรียบไปกับผิวหน้าอาหาร เจริญออกเป็นวง และเป็นผงคล้ายแป้ง สีเหลืองนวล แสดงดังรูปที่ 4.6 A และสปอร์มีลักษณะกลมรี ขนาดประมาณ 2.8-3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร แสดงดังรูปที่ 4.6 B

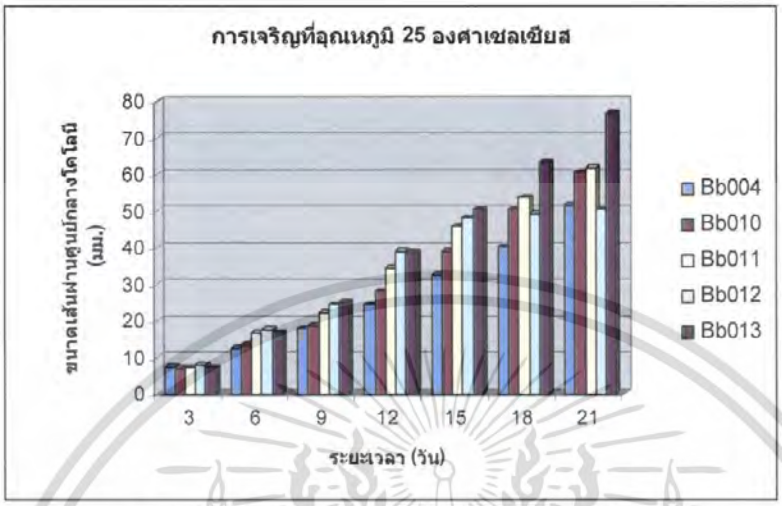


A B

รูปที่ 4.6 แสดงลักษณะโคโลนี (A) และสปอร์ (B) ของไอโซเลท Bb 013

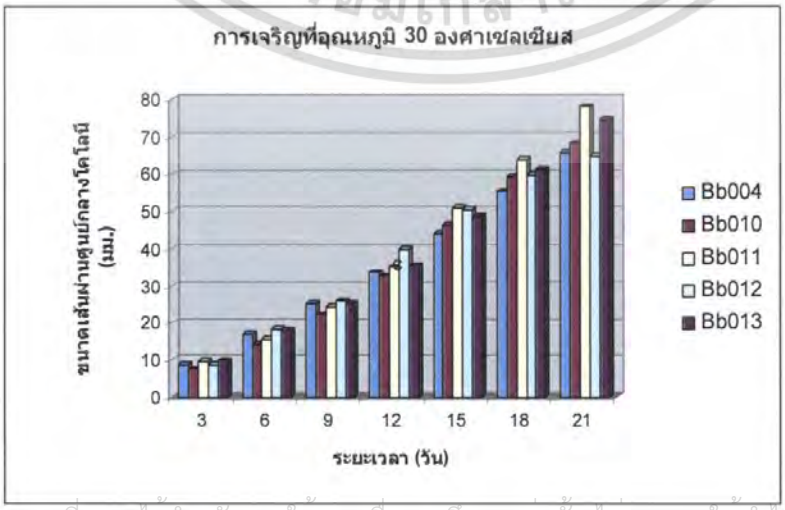
จากผลการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ที่อุณหภูมิต่างๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวัดอัตราการเจริญทุกๆ 3 วัน เป็นระยะเวลาทั้งหมด 21 วัน ได้ผลการทดลอง คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อในช่วงระยะเวลา 6 วัน ทุกไอโซเลทมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน ในช่วงระยะเวลาของวันที่ 9 ถึงวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อมีอัตราการเจริญเรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ คือ Bb 004 < Bb 010 < Bb 011 < Bb 012 < Bb 013 และในช่วงระยะเวลาของวันที่ 18 ถึงวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 010 Bb011 และ Bb 012 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกันในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยงไอโซเลท Bb 010 และ Bb 011 ทั้งสองไอโซเลทมีอัตราใกล้เคียงกัน และไอโซเลท Bb 004 และ Bb 012 ทั้งสองไอโซเลทนี้มีอัตราการเจริญน้อยที่สุดใกล้เคียงกัน โดยที่ไอโซเลท Bb 013 มีอัตราการเจริญสูงที่สุด แสดงดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

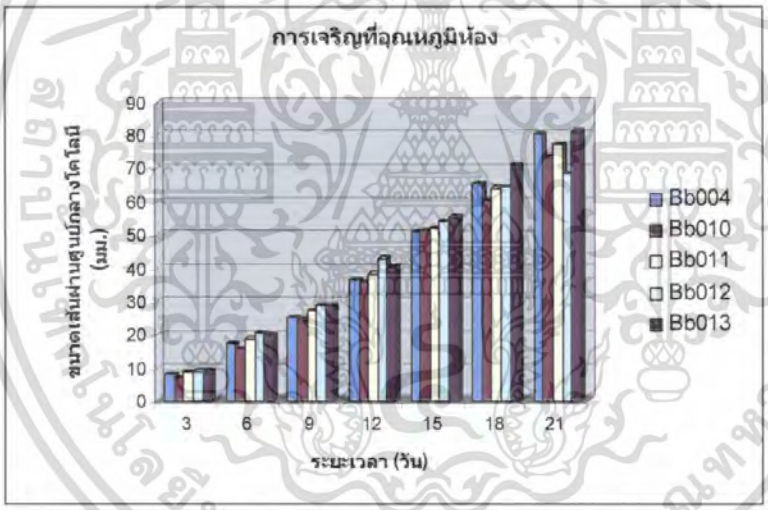
อัตราการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาของวันที่ 3 ถึงวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ทุกไอโซเลทมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน โดยที่ไอโซเลท Bb 004 มีอัตราการเจริญมากที่สุดในวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 011 และ Bb 012 มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 011 มีอัตราการเจริญมากที่สุด และไอโซเลท Bb 004 มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลทอื่นมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน และในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 004 และ Bb 012 น้อยที่สุดใกล้เคียงกัน ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีอัตราการเจริญเรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ คือ Bb 010 < Bb 013 < Bb 011 โดยที่ไอโซเลท Bb 011 มีอัตราการเจริญสูงที่สุด แสดงดังรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ในช่วงระยะเวลาของวันที่ 3 ถึงวันที่ 9 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 010 มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน ในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 012 มีอัตราการเจริญมากที่สุด ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน ในวันที่ 15 ของการเพาะเลี้ยง ทุกไอโซเลทมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน ในวันที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง ไอโซเลท Bb 013 มีอัตราการเจริญมากที่สุด และไอโซเลท Bb 010 มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน และในวันที่ 21 ของการเพาะเลี้ยง แต่ละไอโซเลทมีอัตราการเจริญเรียงลำดับจากน้อยไปมากได้ดังนี้ คือ Bb 012 < Bb 010 < Bb 011 < Bb 004 < Bb 013 โดยที่ไอโซเลท Bb 013 มีอัตราการเจริญสูงที่สุด แสดงดังรูปที่ 4.9



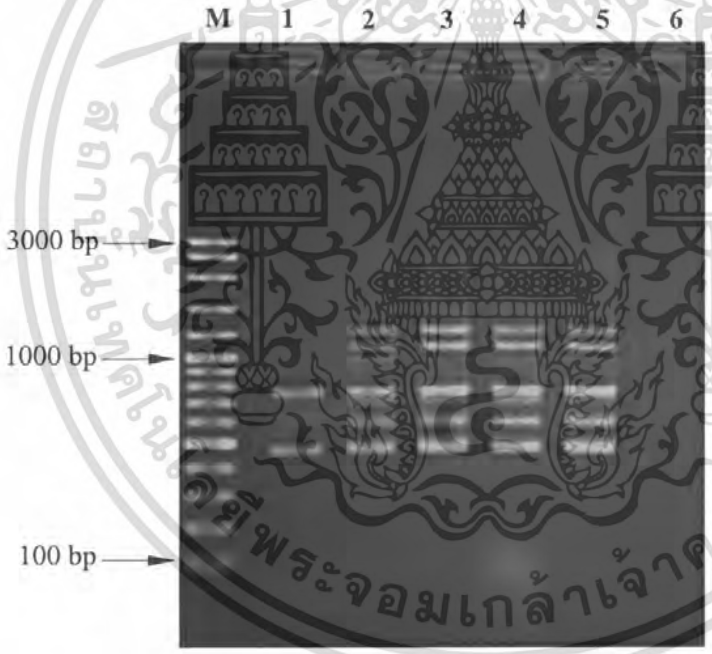
รูปที่ 4.9 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ที่อุณหภูมิห้อง

เมื่อทำการทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 26.5-28.5 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 94 เปอร์เซ็นต์ โดยที่การทดสอบการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิทั้ง 3 มีลักษณะของโคโลนีไม่แตกต่างกัน แต่การเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่ทำการทดสอบการเจริญของแต่ละอุณหภูมิ มีความแตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิห้อง การเจริญของเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญของเชื้อสูงที่สุด แสดงดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายระดับโมเลกุลโดยเทคนิค RAPD

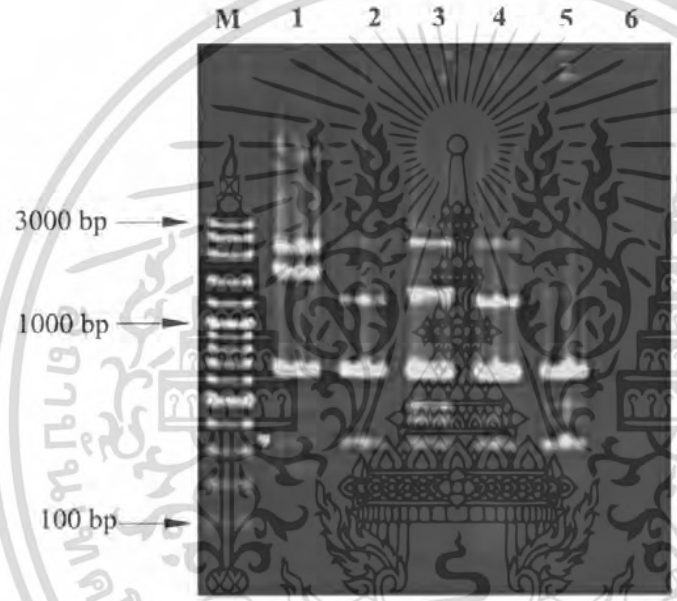
จากการวิเคราะห์ผลด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงลักษณะแถบดีเอ็นเอต่างๆ ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ แสดงดังตารางที่ 3.1 ทำให้เห็นความแตกต่างกันของทั้ง 5 ไอโซเลท เช่น ไพรเมอร์ OPC-09 แสดงถึงความแตกต่างกันของไอโซเลท Bb 004 ซึ่งไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดตั้งแต่ 1,000 bp ขึ้นไป ขณะที่ไอโซเลท Bb 010 Bb 011 Bb 012 และ Bb 013 ไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนแถบดีเอ็นเอ แสดงดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPC-09 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

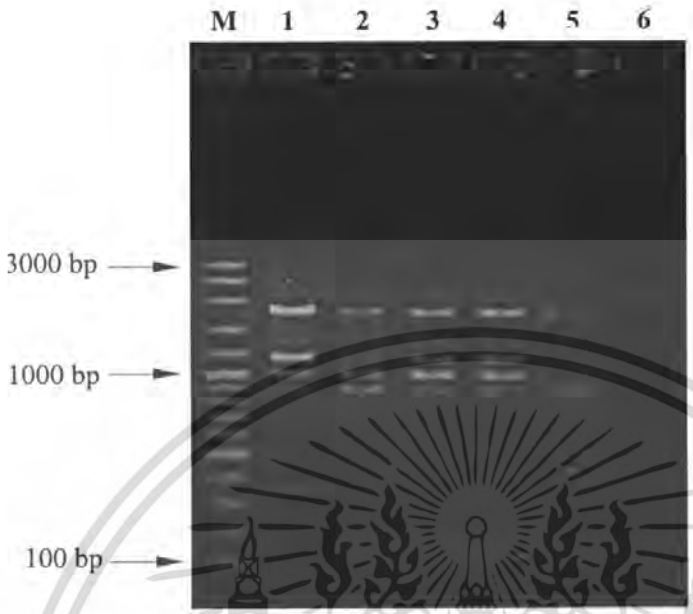
การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13 แสดงถึงความแตกต่างกันของไอโซเลท Bb 004 ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,500-2,000 bp ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ ไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดนี้ปรากฏ และไอโซเลท Bb 004 และ Bb 010 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 400-500 bp ขณะที่ไอโซเลท Bb 011 Bb 012 และ Bb 013 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดนี้ แสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPG-13 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative

การวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ไอโซเลท Bb 004 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 900 bp ซึ่งไอโซเลทอื่นๆ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 900 bp และไอโซเลท Bb 010 และ Bb 013 ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 1,200 bp ขณะที่ไอโซเลท Bb 004 Bb 011 และ Bb 012 ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาดนี้ แสดงดังรูปที่ 4.12

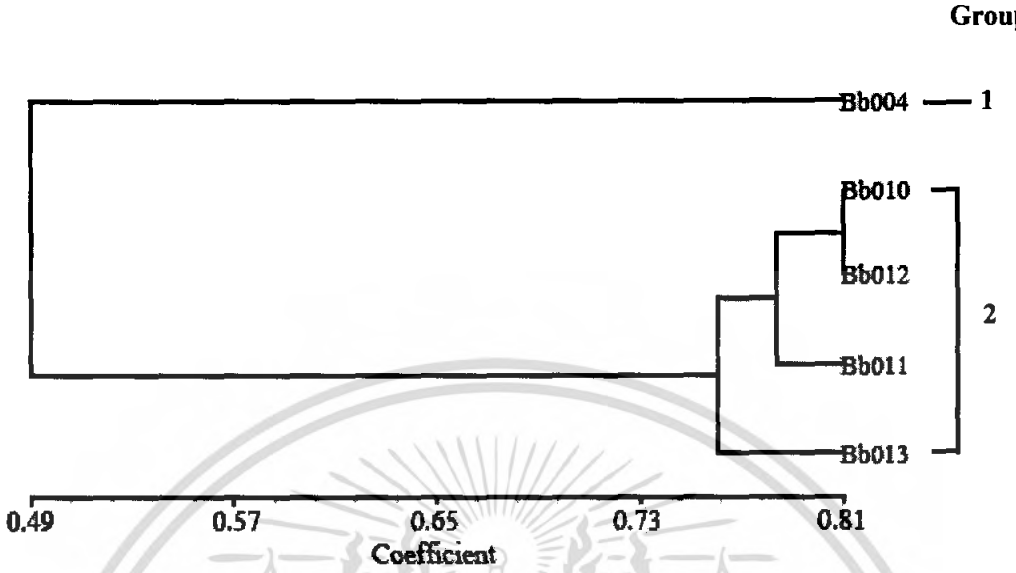
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ OPB-14 ซึ่ง M คือ Marker 100 bp DNA leader ซึ่งช่องที่ 1 คือ ไอโซเลท Bb 004 ช่องที่ 2 คือ ไอโซเลท Bb 010 ช่องที่ 3 คือ ไอโซเลท Bb 011 ช่องที่ 4 คือ ไอโซเลท Bb 012 ช่องที่ 5 คือ ไอโซเลท Bb 013 ช่องที่ 6 คือ Negative

จากการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ และทำการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ โดยทำการกำหนดให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเหมือนกันในตำแหน่งเดียวกันเป็น 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏในตำแหน่งเดียวกันเป็น 0 ได้ผลรวมทั้งหมด 80 แถบดีเอ็นเอ เฉลี่ย 9 แถบดีเอ็นเอต่อไพรเมอร์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Coefficient) กันครั้งละ 2 ไอโซเลท โดยมีค่าหลากหลายตั้งแต่ 78.5-45.2 เปอร์เซ็นต์ เฉลี่ย 77.6 เปอร์เซ็นต์ และทำการจำแนกกลุ่มที่มีความคล้ายคลึงกันโดยใช้วิธี UPGMA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย ไอโซเลท Bb 004 และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไอโซเลท Bb 010, Bb 011, Bb 012 และ Bb 013 โดยกลุ่มที่ 1 และ 2 มีความคล้ายคลึงกัน 49.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในกลุ่มที่ 2 มีความคล้ายคลึงกันของไอโซเลทต่างๆ ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังรูปที่ 4.13 ทั้งนี้กลุ่มที่ 1 และ 2 ต่างมีแหล่งที่มา และได้รับมาในช่วงเวลาที่ต่างกัน โดยในกลุ่มที่ 1 ไม่ทราบชนิดของแมลงที่เป็นแหล่งอาศัย ซึ่งในกลุ่มที่ 2 ทราบชนิดของแมลงที่เป็นแหล่งอาศัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 แสดงแผนภูมิที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 UPGMA

4.5 การคัดเลือกเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่เหมาะสมต่อการก่อให้เกิดโรคในหนอนใยผัก

จากการทดลองนำหนอนใยผักจำนวน 10 ตัว มาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท จำนวน 2 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งมีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 26.5-28.5 องศาเซลเซียส โดยทำการสังเกตผลเป็นระยะเวลา 7 วัน ได้ผลคือ ในวันที่ 3 ของการทดลอง พบว่าหนอนใยผักหยุดกินอาหารและไม่เคลื่อนไหว ในวันที่ 5 ของการทดลอง พบว่าลำตัวหนอนใยผักมีลักษณะแข็งและมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาตามข้อปล้องของลำตัวหนอนใยผัก และในวันที่ 7 ของการทดลอง พบว่าเส้นใยเจริญขึ้นปกคลุมทั่วลำตัวของหนอนใยผัก แสดงดังรูปที่ 4.14 และจากการคัดเลือกเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท Bb 004 มีความสามารถทำให้หนอนใยผักตายเนื่องจากการเกิดโรคมากที่สุด แสดงดังตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงจำนวนหนอนใยผักที่เกิดโรคและไม่เกิดโรคจากเชื้อ *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท

ไอโซเลท	จำนวนหนอนใยผักที่เกิดโรค (เปอร์เซ็นต์)	จำนวนหนอนใยผักที่ไม่เกิดโรค (เปอร์เซ็นต์)
Control	0	100
Bb 004	70	30
Bb 010	10	90
Bb 011	20	80
Bb 012	25	75
Bb 013	15	85

4.6 การคัดเลือกความเข้มข้นสารละลายสปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลท 004 ที่เหมาะสม

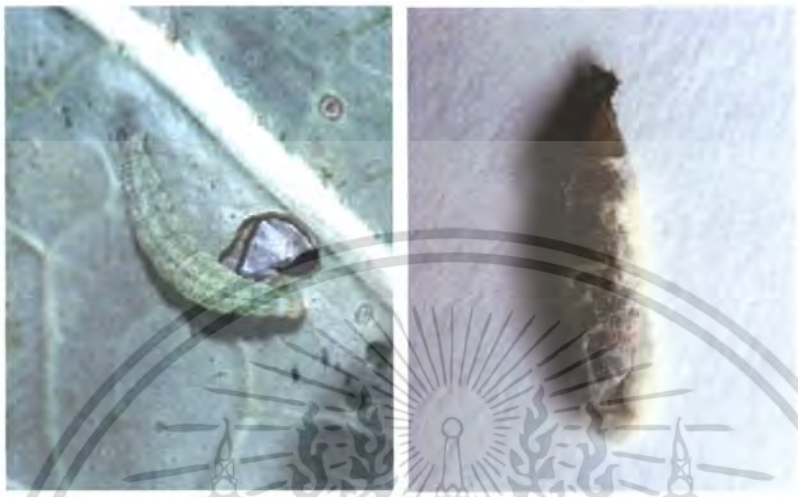
จากการทดลองเมื่อหยดสารละลายสปอร์ของเชื้อ *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กันคือ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ลงบนกระดาษทิชชู่และใบผักกาดในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีตัวหนอนใยผักจานละ 10 ตัว แล้วนำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูความสามารถในการเกิดโรคต่อหนอนใยผัก แสดงดังรูปที่ 4.14 และนำไปวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม SPSS version 14.0 ดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลท Bb 004 ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ คือ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7 เป็นระยะเวลา 7 วัน

ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์	ค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อ
0	0.00^{a}
10^3	3.00^{b}
10^4	3.50^{bc}
10^5	4.00^{bc}
10^6	4.50^{c}
10^7	6.50^{d}

*** ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลอง ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



A B

รูปที่ 4.14 แสดงหนอนใยผักก่อนการเกิดโรค (A) และหลังการเกิดโรค (B)

จากการศึกษาความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *B .bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค RAPD ทำให้แบ่งกลุ่มเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ได้เป็น 2 กลุ่ม โดยไอโซเลท Bb 004 นั้น มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ เช่นเดียวกับ Cravanzola และคณะ (1997), Berretta และคณะ (1998), Wang และคณะ (2002), Estrada และคณะ (2006) ที่สามารถแยกไอโซเลทต่างๆ จากกันได้ด้วยเทคนิค RAPD โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ทั้งหมด 9 ไพรเมอร์ คือ OPA-20, OPAM-03, OPAM-12, OPB-14, OPB-18, OPC-04, OPC-09, OPE-07 และ OPG-13 ที่แตกต่างไปจากการทดลองของบุคคลอื่น แต่ก็ยังสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทได้เช่นเดียวกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ในการก่อให้เกิดโรคต่อหนอนใยผัก พบว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท มีความสามารถในการก่อโรคต่อหนอนใยผักได้ โดยไอโซเลท Bb 004 มีประสิทธิภาพในการก่อโรคต่อหนอนใยผักมากที่สุด เช่นเดียวกับ Wang และคณะ (2002) ที่ใช้เชื้อราสายพันธุ์ผสมระหว่าง Bb 123 และ Bb 151 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการก่อโรคต่อหนอนผีเสื้อได้ดีเช่นเดียวกัน โดยในการทดสอบครั้งนี้ได้ใช้สารละลายสปอร์ของเชื้อที่มีความเข้มข้น 1×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง โดยมีอุณหภูมิห้องอยู่ที่ 26.5-28.5 องศาเซลเซียส และมีความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ พบว่าลักษณะโคโลนีและสปอร์ของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท ที่ได้จากการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิ ไม่มีความแตกต่างกัน โดยที่ Bb 004, Bb 011, Bb 012 และ Bb 013 มีลักษณะของผิวหน้าโคโลนีเรียบกับผิวหน้าอาหาร แต่ไอโซเลท Bb 010 มีลักษณะผิวหน้าของโคโลนีขรุขระ และทั้ง 5 ไอโซเลท มีลักษณะการเจริญเป็นวงขยายออกไป ผิวหน้าโคโลนีเป็นผงคล้ายแป้งสีขาว มีระยะเวลาสร้างสปอร์ภายใน 3-4 วัน หลังจากการเพาะเลี้ยง สปอร์มีขนาดประมาณ 3.0 ไมโครเมตร และมีก้านชูสปอร์ยาวประมาณ 7-8 ไมโครเมตร ซึ่งสามารถวัดอัตราการเจริญโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และพบว่าที่อุณหภูมิห้อง เชื้อรา *B. bassiana* ทั้ง 5 ไอโซเลท มีอัตราการเจริญมากที่สุด และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญน้อยที่สุด ซึ่งสามารถเรียงลำดับอัตราการเจริญของเชื้อที่อุณหภูมิทั้ง 3 อุณหภูมิ จากมากไปน้อยได้ดังนี้คือ ที่อุณหภูมิห้อง > 30 องศาเซลเซียส > 25 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ผลความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *B. bassiana* ด้วยเทคนิค RAPD โดยการนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและไม่ปรากฏบนตำแหน่งเดียวกัน พบว่าเมื่อนำค่าการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ผลต่อด้วยโปรแกรม NTSYS-pc version 2.0 UPGMA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มไอโซเลทต่างๆ ได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยที่ ไอโซเลท Bb 004 มีความคล้ายคลึงกันน้อยที่สุด ขณะที่ไอโซเลท Bb 010 และ Bb 012 มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุด

การทดสอบประสิทธิภาพต่อการทำให้เกิดโรคในหนอนใยผัก โดยการคัดเลือกไอโซเลทที่เหมาะสมจากทั้ง 5 ไอโซเลท ด้วยการนำหนอนใยผักที่มีอายุใกล้เคียงกันมาเลี้ยงในจานอาหารที่เลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลท จานละ 10 ตัว จำนวน 2 ซ้ำ พบว่าไอโซเลท Bb 004 มีจำนวนหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีประสิทธิภาพต่อการทำให้เกิดโรคในหนอนใยผักมากที่สุดของทั้ง 5 ไอโซเลท จากนั้นจึงเลือกไอโซเลท Bb 004 มาคัดเลือกความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่เหมาะสม โดยมีทั้งหมด 5 ความเข้มข้น คือ 10^7-10^3 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลอง คือ ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการทำให้หนอนใยผักตายจากการเกิดโรคมากที่สุด ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์เท่ากับ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะจากการทดลองนี้คือ ในขั้นตอนการวิเคราะห์ความหลากหลายทางโมเลกุลของเชื้อรา *B. bassiana* ด้วยเทคนิค RAPD พบว่า ไอโซเลท Bb 004 มีค่าความคล้ายคลึงกันกับไอโซเลทอื่นๆ น้อยที่สุด เนื่องจากมีแหล่งที่มาของเชื้อต่างกันและจำนวนไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD นี้ มีเพียง 9 ไพรเมอร์ ทำให้ข้อมูลในการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอมีน้อย จึงทำให้การจัดจำแนกไอโซเลท Bb 004 มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลทอื่นๆ น้อยมาก จึงควรใช้ไพรเมอร์จำนวนมาก หรือตั้งแต่ 20-30 ไพรเมอร์ขึ้นไป ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD นี้ และควรทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD จากไพรเมอร์เดิมซ้ำกัน ประมาณ 2-3 ครั้ง โดยที่ลักษณะของการเกิดแถบดีเอ็นเอไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เพื่อหาลักษณะของไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างกันมากที่สุด เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลหาความแตกต่างกันของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ ได้ดีที่สุด

การทดสอบประสิทธิภาพต่อการติดเชื้อในหนอนใยผัก ไอโซเลท Bb 004 มีประสิทธิภาพต่อการทำให้หนอนตายจากการติดเชื้อมากที่สุด ขณะที่ไอโซเลทอื่นๆ มีประสิทธิภาพต่ำมาก จึงควรนำเชื้อไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพต่อการทำให้หนอนติดเชื้อต่ำของแต่ละไอโซเลท มากระตุ้นความสามารถในการทำให้ติดเชื้อต่อหนอนใยผัก โดยการนำหนอนใยผักมาเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพต่ำนี้ ทุกๆ 1 เดือน จากนั้นทำการย้ายเชื้อมาเลี้ยงในอาหาร WA และ DG 18 เพื่อทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์ และเก็บไว้ใช้งานต่อไป และการนำหนอนใยผักที่มีอายุใกล้เคียงกัน มาทดสอบประสิทธิภาพต่อการทำให้ติดเชื้อพบว่า หนอนใยผักบางตัวจะเข้าสู่ระยะดักแด้หลังจากเก็บในแปลงเพาะปลูกภายในระยะเวลา 3-6 ชั่วโมง จึงทำให้ไม่สามารถนำหนอนใยผักมาทดสอบประสิทธิภาพต่อการทำให้ติดเชื้อได้ จึงควรทำกรงขนาดเล็กและทำการเพาะปลูกต้นผักกาดเขียวหรือต้นคะน้าไว้ภายในกรง และนำหนอนมาเลี้ยงไว้จนกระทั่งเข้าดักแด้และเป็นผีเสื้อ และทำการย้ายกระถางเพาะปลูกใหม่เข้าไปในกรงอีกครั้ง และให้น้ำเชื่อม (น้ำตาลทรายผสมน้ำกลั่น) เพื่อเป็นอาหารแก่ผีเสื้อ ปล่อยให้ผสมพันธุ์และวางไข่จนกระทั่งฟักออกมาเป็นตัวหนอนใยผัก เลือกหนอนใยผักที่มีอายุประมาณ 7 วันหลังฟักออกจากไข่ จะทำให้ได้หนอนใยผักสำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพที่มีอายุเท่ากัน ทำให้ลดปัญหาการเข้าระยะดักแด้และทำให้สามารถทราบอัตราการรอดของหนอนใยผักที่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เจษฎา เด่นดวงบริพันธ์. 2547. วงศ์วานวิวัฒนาการ [Online]. Available : http://www.turffy.com/KEVIN&RAJESH/Systematics/-%20Jessy%20Bio%20-%20--%20Current%20Contents%20in%20Biology%20By%20Dr_Jessada%20Denduangboripant.htm

มลิวัลย์ ปันยารชุน. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา. เอกสารวิชาการการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. หน้า 280-281.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2543. ปฏิบัติการเบื้องต้น. ครั้งที่ I. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภิรานนท์.2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Berretta, M. F., Lecuona, R. E., Zandomeni, R. O. and Grau, O. 1998. Genotyping Isolates of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* by RAPD with Fluorescent Labels. *Journal of Invertebrate Pathology*. 71: 145-150.

Boucias, D.G., Pendland, J.C. 1998. *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers, Boston.

Castrillo L.A., Vandenberg J.D., and Wraight S.P. 2003. Strain-specific detection of Introduce *Beauveria bassiana* in agricultural fields by use of sequence-characterized amplified region markers. *Journal of Invertebrate Pathology*. 82: 75-83.

Cravanzola, F., Piatti, P., Bridge, P.D. and Ozino, O.I. 1997. Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from European cockchafer (*Melolontha* spp.). *Applied Microbiology*. 25: 289-294.

De Muro, M.A., Mehta, S., Moore, D., 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates form Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology*. 229: 249-257.

Estrada, M.E., Camacho, M.V. and Benito, C. 2007. The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. as assessed using Inter-microsatellites (ISSRs). *Cellular and Molecular Biology*. Letters. 12: 240-248.

[Online]. Available: http://pmc09.doae.go.th/site/home/index.php

Hajek, A.E. and R.J. St. Leger. 1994. Interaction between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology*. 39: 293-322.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marh, S. 1997. The Insect Fungus *Beauveria bassiana.* [Online]. Available: http://www.entomology.wisc.edu/mbcn/kyf410.html

Neuveglise C., Brygoo Y., and Riba G.1997. 28S rDNA group-I introns: a powerful tool for identifying strains of *Beauveria brongniartii. Molecular Ecoogyl.* 6: 373–381.

Ricardo Henri Rodrigues Destefano, Suzete A. lanza Destefano and Claudio Luiz Messias. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae var. anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Genetic and Molecular Biology.* 2(27) : 245-252.

Roberts, D.W. 1996. Toxins from the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae.* II.Symptoms and detection in moribund hosts. *Journal of Invertebrate Pathology.* 8: 222-227.

Rehner, S.A. and Buckley, E. P. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1-alpha sequences: evidence for cryptic diversification and links to Cordyceps teleomorphs. *Mycologia.* 97: 84-98.

Rehner, S.A., Posada, F., Buckley E.P., Infanate, F., Castillo, A., Vega, F.E. 2006. Phylogenetic origins of African and Neotropical *Beauveria bassiana s.l.* pathogens of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei. Journal of Invertebrate Pathology.* 93: 11-21.

Wang, C.-S., Li, Z.-Z., and Butt, T.M.2002. Molecular studies of co-formulated strains of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana. Journal of Invertebrate Pathology.* 80:29-34.

[Online]. Available : http://pmc09.doae.go.th/site/home/index.php

[Online]. Available : http://www.nakhonpathom.doae.go.th/muang/2007/pathogens4.html

[Online]. Available : http://www.homestead.com/ipmofalaska/files/beauveria.jpg

[Online]. Available : http://plantpro.doae.go.th/plantclinic/clinic/plant/agrotis/xylostella.html

[Online]. Available : http://www.barascientific.com/bscnews/forum/DNA/dna_4.php

[Online]. Available : http://www.thirarat.com/moodle/mod/resource/view.php?id=39

[Online]. Available : http://dna.kps.ku.ac.th/m-crop/Technique11_RAPD.html

[Online]. Available : http://www.elchrom.com/public/index.php?article=113

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา *B. bassiana*

Potato dextrose agar (PDA)

Potato	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร
Agar-agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง PDA สำเร็จรูป 39 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Potato dextrose broth (PDB)

Potato peptone	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง PDB สำเร็จรูป 24 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Water agar (WA)

Agar	15.0	กรัมต่อลิตร
Chloramphenical	1.0	กรัมต่อลิตร
Cycloheximide	0.5	กรัมต่อลิตร

ชั่งผงวุ้น 15 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ทำการเติม Chloramphenical 1.0 กรัม Cycloheximide 0.5 กรัม เขย่าเบาๆ อย่าให้เกิดฟอง จนกระทั่งละลายหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dichloran-Glyceral (DG 18) Agar

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
Potassium dihydrogen phosphate	1.0	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulfate	0.5	กรัมต่อลิตร
Dichloran	0.002	กรัมต่อลิตร
Chloramphenical	0.1	กรัมต่อลิตร
Agar-agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ชั่งผง DG 18 สำเร็จรูป 31.6 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 825 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมกลีเซอรอล 175 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

10X TBE

ชั่ง Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ใส่ลงใน 0.5M EDTA (pH 8.0) 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที/ 20 นาที

1X TBE

ต้องการเตรียม 1X TBE ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

จาก $N_1V_1 = N_2V_2$

$(1X)(1{,}000\ ml) = (10X)\ V_2$

$V_2 = 100$ มิลลิลิตร

ดังนั้น ต้องตวง 10X TBE มา 100 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

0.5M EDTA

ชั่ง EDTA 93.06 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมน้ำกลั่นประมาณ 300 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ magnetic bar (สารละลายมีสีขาวขุ่น) สามารถให้ความร้อนได้เล็กน้อย จากนั้นปรับพีเอช เป็น 8.0 โดยใช้สารละลายกรด-ด่าง และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ 1M EDTA = 372.24 กรัม ในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร

Ethidium Bromide : EtBr

ดูดสารละลายจาก stock 20 ไมโครลิตร ใส่ลงในถาดย้อมเจล จากนั้นตวง 1X TBE Buffer 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในถาดย้อมเจล และผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1% Agarose gel

กรณีที่เตรียมเจลเล็ก

ชั่งวุ้น 0.2 กรัม ลงใน TBE buffer 20 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนจนสารละลายใส ทิ้งให้เย็นพอสัมผัสได้ จากนั้นเทลงในถาดรองเจล รอจนกระทั่งวุ้นแข็ง

กรณีที่เตรียมเจลใหญ่

ชั่งวุ้น 0.4 กรัม ลงใน TBE buffer 40 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนจนสารละลายใส ทิ้งให้เย็นพอสัมผัสได้ จากนั้นเทลงในถาดรองเจล รอจนกระทั่งวุ้นแข็ง

20 mol/ µl Primer

ไพรเมอร์เริ่มต้นมีความเข้มข้น 100 pMol ในการทำ RAPD ต้องการเตรียมไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 mol/µl ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยคำนวณจากสูตร

$N_1V_1 = N_2V_2$

$(100)\,V = (20)(50)$

$V = (20)(50)/100$

$= 10$ ไมโครลิตร

ดังนั้นต้องปิเปตไพรเมอร์เริ่มต้นมา 10 ไมโครลิตร และเติมน้ำพีซีอาร์ 40 ไมโครลิตร

การเตรียมสีย้อม Lactophenol Cotton Blue

มีส่วนประกอบดังนี้

Glycerine	40	กรัม
Lactic acid	20	กรัม
Phenol	20	กรัม
Distilled water	20	กรัม

นำส่วนประกอบทั้งหมดละลายเข้าด้วยกัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง และเก็บไว้ในขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การตรวจนับสปอร์โดยวิธี Direct count

1. วางกระจกปิดสไลด์ของ haemacytometer ให้อยู่ตำแหน่งกึ่งกลางของสไลด์ แล้วปิเปตสารละลายสปอร์ที่เจือจางเหมาะสมแตะที่ขอบกระจกปิดสไลด์ให้ตัวอย่างไหลเข้าไประหว่างกระจกปิดสไลด์และสไลด์จนเต็มพอดี

2. นับจำนวนสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยเลือกนับสปอร์ที่อยู่ในตาราง รวมทั้งสปอร์ที่คาบเส้นด้านล่างและเส้นทางด้านขวา ซึ่งการนับทำตามมุมทแยงซ้ายและขวา รวม 10 ช่อง เป็นจำนวน 2 ซ้ำ

3. ทำการคำนวณสปอร์ต่อมิลลิลิตร

Haemacytometer มีระยะห่างระหว่าง chamber ถึงกระจกปิดสไลด์เท่ากับ 0.1 มิลลิเมตร มีความกว้างและความยาวในแต่ละช่องเท่ากันคือ 0.2 มิลลิเมตร ดังนั้นในแต่ละช่องจะมีปริมาตรเท่ากับ 4×10^{-3} ลูกบาศก์มิลลิเมตร

$$\text{จำนวนสปอร์ต่อ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร} = \frac{X \times 1 \times 10^{6} \times \text{ระดับความเจือจาง}}{4} \qquad (3.2)$$

X = จำนวนสปอร์ที่นับได้เฉลี่ยใน 1 ช่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ตาราง ง-1 แสดงค่าความคล้ายคลึงกันของเชื้อ *B. bassiana* ไอโซเลทต่างๆ

	Bb 004	Bb 010	Bb 011	Bb 012	Bb 013
Bb 004	1.000000				
Bb 010	0.456522	1.000000			
Bb 011	0.530121	0.782609	1.000000		
Bb 012	0.452381	0.810345	0.785047	1.000000	
Bb 013	0.530121	0.782609	0.735849	0.766355	1.000000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 14.0

ตาราง จ-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อ *B. bassiana*

ANOVA

Infected

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	45.417	5	9.083	36.333	.000
Within Groups	1.500	6	.250		
Total	46.917	11			

ตาราง จ-2 ค่าเฉลี่ยของหนอนใยผักที่เกิดการติดเชื้อ *B. bassiana* ที่ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ต่างๆ คือ 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 และ 10^7

B. bassiana* infected *Plutella xylostella

Duncan

Concentration	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
0 spores/ml	2	.00			
1000 spores/ml	2		3.00		
1000000 spores/ml	2		3.50	3.50	
10000 spores/ml	2		4.00	4.00	
100000 spores/ml	2			4.50	
10000000 spores/ml	2				6.50
Sig.		1.000	.102	.102	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้