

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Metarhizium* sp.
โดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Genetics diversity of *Metarhizium* sp.
by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)**



**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 อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Metarhizium* sp. โดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
Genetics diversity of *Metarhizium* sp. by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

นักศึกษา บุศรินทร์ เอี่ยมศิริ รหัสนักศึกษา 47050136
อริพพล ลักษณะ รหัสนักศึกษา 47050698


สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุัทตรา โพรธิเอี่ยม

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพรธิเอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชรวัลย์	
กรรมการ ผศ.ดร. สุัทตรา โพรธิเอี่ยม	


.....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. โดยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
นักศึกษา	นุศรินทร์ เอี่ยมศิริ รหัสนักศึกษา 47050136 อธิปพล ลักษณา รหัสนักศึกษา 47050698
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	พ.ศ. 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุพัตรา โปธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

การแพร่กระจายของสปอร์ของเชื้อราวงศ์ Deuteromycete ถูกนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช ด้วยความสามารถที่มีความจำเพาะเจาะจงในการเข้าทำลายแมลงและไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น เชื้อ *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลตที่นำมาศึกษานี้ พบว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้องที่ 28-30 องศาเซลเซียส การศึกษาความหลากหลายได้วิเคราะห์ rDNA ในตำแหน่ง ITS1- 5.8S - ITS2 โดยได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่มีขนาด 650 คู่เบส และเมื่อนำชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่ได้นี้มาทำการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 12 ชนิด (*Alu* I, *Bam*H I, *Bgl* II, *Bst* I, *Eco*R I, *Hae* III, *Hha* I, *Hind* III, *Hpa* II, *Pst* I, *Sac* I และ *Tag* I) และนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบพบว่า ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตได้ ผลจากการนำลำดับเบสในตำแหน่ง rDNA ไป BLAST พบว่าเชื้อรา *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลต นั้นคือเชื้อ *M. anisopliae* จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* กับเชื้อราในสกุลเดียวกันและสกุลใกล้เคียงอย่าง *Beauveria bassiana* และ *Cordyceps brongniartii* มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรม และเมื่อทำการทดสอบถึงความเป็นพิษในการเข้าทำลายปลวก (*Termitidae* sp.) ของสปอร์ของเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่า อัตราการตายของปลวกจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ โดยเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถทำให้ปลวกตายได้ภายใน 3 วัน หลังการได้รับสารละลายสปอร์ และหลังจากได้รับสปอร์ประมาณ 7 วันจะพบเส้นใยที่ซากของปลวกที่ตาย ซึ่งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้มีความเป็นพิษต่อปลวก

Special Project Title	Genetics diversity of <i>Metarhizium</i> sp. by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)	
Student	Busarin Iamsiri	Student ID 47050136
	Atippol Lugsana	Student ID 47050698
Program	Biotechnology	
Department	Applied Biology	
Academic Year	2007	
Advisor	Asst. Prof. Dr. Supattar Poeaim	

ABSTRACT

Metarhizium anisopliae is the entomopathogenic of the Deuteromycete fungi, which has become an important biocontrol agent used in the microbial control of insect pests without damaging the environment or non-target organisms. In this study, we had five isolates of *Metarhizium* sp. Five isolates of *Metarhizium* sp. have grown the highest rate at 30 celcius degree and room temperature (28 – 30 celcius degree). We analyzed the ITS1 -5.8S- ITS2 rDNA regions of strains and varieties of *Metarhizium* sp. by using ITS1 and ITS4 primers. The PCR amplification of these regions yielded a unique fragment of approximately 650 bp for five isolates of *Metarhizium* sp. The PCR products were digested with twelve restriction endonucleases (*Alu* I, *BamH* I, *Bgl* II, *Bst* I, *EcoR* I, *Hae* III, *Hha* I, *Hind* III, *Hpa* II, *Pst* I, *Sac* I and *Tag* I) and the PCR-RFLP profiles couldn't show differences between the species. Result of the rDNA BLAST showed that five isolates of *Metarhizium* sp. are *M. anisopliae*. The phylogenetic analyses of *Metarhizium* sp. showed the relationship of entomopathogenic, *Metarhizium* spp., *Beauveria bassiana* and *Cordyceps brongniartii*. Five isolates of *M. anisopliae* were tested for their pathogenicity to worker of termites, *Termitidae* sp. Percent mortality of termites depended on concentration of conidia suspension. Termites apparently died after three days post inoculation and after seven days the white mycelia developed around the cadavors. This study showed that five isolate of *M. ansopliae* could cause died of the termites.

กิตติกรรมประกาศ

ในการจัดทำรายงานพิเศษนี้ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ที่กรุณามาเป็นที่ปรึกษาและคอยช่วยเหลือให้โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ผศ. ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ คณะกรรมการพิจารณาโครงการพิเศษนี้ และขอขอบคุณพี่ ๆ ปริชญาทอ ที่ให้ความกรุณา และแนะนำทักษะและความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนคอยอำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาที่จัดทำโครงการพิเศษนี้

นอกจากนี้ต้องขอขอบคุณคณะอาจารย์ เจ้าหน้าที่ และนักศึกษาทุกชั้นปีของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความช่วยเหลือและคอยอำนวยความสะดวก ตลอดจนให้ความรู้ต่าง ๆ อันก่อให้เกิดประโยชน์อย่างยิ่งในการจัดทำโครงการพิเศษนี้ ซึ่งประสบการณ์ที่ได้รับนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในชีวิตประจำวันได้เป็นอย่างดี

นางสาวสุศรีนทร์ เอี่ยมศิริ

นายอธิปพล ลักษณ์า

31 มีนาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง	3
2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	5
2.3 เชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	8
2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i>	9
2.4.1 ข้อมูลพันธุลักษณะของประชากร	10
2.4.2 ไรโบโซม	13
2.4.3 Polymerize Chain Reaction (PCR)	15
2.4.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส	18
2.4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	19
2.5 การศึกษาผลของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. ที่มีต่อปลวก <i>Termitidae</i> sp.	20
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	25
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในโครงการพิเศษ	25
3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	26
3.3 การคัดแยกเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	27
3.3.1 การคัดแยกเชื้อราจากดิน	27
3.3.2 การคัดแยกเชื้อราจากแมลง	27
3.4 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต	28
3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	28
3.5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR	29
3.5.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP	30
3.5.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟลิซิส	31
3.5.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	32
3.6 การทดสอบผลของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. ที่มีต่อปลวก <i>Termitidae</i> sp.	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	34
4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	34
4.2 การคัดแยกเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	38
4.3 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต	39
4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม	52
4.4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ	52
4.4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR	53
4.4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP	54
4.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	57
4.4.5 การทำแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	59
4.5 การทดสอบผลของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. ที่มีต่อปลวก <i>Termitidae</i> sp.	61
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	63
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก ก	71
ภาคผนวก ข	76
ภาคผนวก ค	84
ภาคผนวก ง	86

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงไพรเมอร์และบริเวณจับของไพรเมอร์บน ITS – rDNA	15
3.1 แสดงสถานะในการเกิดปฏิกิริยา PCR ในแต่ละขั้นตอน	28
3.2 แสดงรายชื่อเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ในการทดลอง	29
4.1 แสดงผลการคัดแยกเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> จากธรรมชาติ	36
4.2 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA010 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	38
4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA012 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	40
4.4 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA013 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	43
4.5 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA014 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	44
4.6 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA015 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	46
4.7 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	47
4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละไอโซเลต	52
4.9 แสดงผลการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP	54
4.10 แสดงรายละเอียดของลำดับเบสที่นำมาทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	57
4.11 แสดงความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ใช้ในการทดสอบ	61
4.12 แสดงอัตราการตายของปลวกในการทดสอบผลของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp.	61
4.13 แสดงอัตราการตายของปลวกในการทดสอบผลของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. ไอโซเลต MA013 และ MA015 มีต่อปลวก <i>Termitidae</i> sp. ที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ต่างกัน	62

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 แสดงการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง	4
2.2 แสดงการรอกของเชื้อราบนผิวของหนอนผีเสื้อ (กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน)	4
2.3 แสดงการเข้าทำลายของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> บนตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงต่าง ๆ	6
2.4 แสดงลักษณะของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	7
2.5 แสดงบริเวณที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา	13
2.6 แสดงตำแหน่งจับของไพรมอร์บริเวณ ITS	14
2.7 แสดงการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส	18
2.8 แสดงวัฏจักรการดำรงชีวิตของปลวก	23
4.1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต	34
4.2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MA 010 บนอาหาร DG 18 และ PDA	35
4.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MA 012 บนอาหาร DG 18 และ PDA	35
4.4 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MA 013 บนอาหาร DG 18 และ PDA	36
4.5 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MA 014 บนอาหาร DG 18 และ PDA	36
4.6 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ไอโซเลต MA 015 บนอาหาร DG 18 และ PDA	36
4.7 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 010 ที่อุณหภูมิต่างๆ	40
4.8 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 012 ที่อุณหภูมิต่างๆ	42
4.9 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 013 ที่อุณหภูมิต่างๆ	43
4.10 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 014 ที่อุณหภูมิต่างๆ	45
4.11 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 015 ที่อุณหภูมิต่างๆ	46
4.12 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	48
4.13 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA010	49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.14 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA012	49
4.15 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA013	50
4.16 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA014	50
4.17 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA015	51
4.18 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต	52
4.19 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR	53
4.20 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP	56
4.21 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตกับเชื้อราอื่น	58
4.22 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา <i>Metarhizium</i> sp. ทั้ง 5 ไอโซเลต	60
6.1 แสดงลักษณะและขนาด (แท้จริง) ของ Haemocytometer	71
6.2 แสดงลักษณะ และตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนด้วย Haemocytometer	72
6.3 แสดงบริเวณในการใส่สารละลายสปอร์ลงบน Haemocytometer	73
6.4 แสดงบริเวณที่ใช้ับจำนวนตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น	74

บทที่ 1

บทนำ

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง เช่นพวก *Beauveria bassiana* และ *Metarhizium anisopliae* มีความสำคัญต่อการควบคุมแมลงที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคพืชได้หลายชนิด (Inglis และคณะ, 2001 ; Lomer และคณะ, 1997) ซึ่งมีการนำมาใช้ในการควบคุมตั๊กแตนหนวดยักษ์ และ ตั๊กแตน (locusts และ grasshoppers) ในประเทศออสเตรเลีย (Milner, 1997 ; Hunter และคณะ, 1999 ; Milner และ Pereire, 2000 ; Hunter และคณะ, 2001) และในประเทศแอฟริกา (Lomer และ คณะ, 2001) ในการพัฒนาวิธีการควบคุมแมลงโดยชีววิธีนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันในการดำเนินงานในหลาย ๆ ประเทศ (Lomer และคณะ, 2001) เช่น ประเทศจีน (Lee และคณะ, 2000) ประเทศบราซิล (Magalhaes และคณะ, 2000) และประเทศเม็กซิโก (Hernandez และ Gutierrez, 2000) ในประเทศบราซิลได้มีการผลิต *M. anisopliae* var. *anisopliae* ในทางการค้า โดยผลิตในรูป สารควบคุมทางชีวภาพต่อแมลงปีกแข็งที่ก่อให้เกิดโรคในอ้อย (*Mahanarva posticata*) (Bridge และคณะ, 1993)

Mitosporic fungi ใน วงศ์ *Metarhizium* สามารถแพร่กระจายอยู่โดยทั่วไปในดิน (Lomer และ Prior, 1992) เชื้อ *M. anisopliae* นั้นถูกค้นพบครั้งแรกจากแมลงปีกแข็งกินข้าวสาลีชื่อ *Anisoplia austriaca* มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงโดยทั่ว ๆ ไป ก็จะใช้กลไกทั้งในการเจาะทะลุผ่านชั้นของผิวหนังด้านนอกของสัตว์อาศัย (host) และจะเข้าไปในระบบน้ำเหลืองซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่เชื้อนี้จะสามารถเจริญเติบโตได้กลไกที่ใช้มี 2 แบบคือ ทางเคมี ได้แก่ การใช้เอนไซม์ (enzyme) และ ทางกล (mechanical force) (Chengshu และคณะ, 2002)

การใช้ประโยชน์จากความสามารถของเชื้อราเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดการใช้สารเคมี ในการกำจัดแมลง ด้วยเหตุผลที่ว่า การใช้สารเคมีนั้นเป็นพิษและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ เชื้อราเขียว *Metarhizium* นั้นเป็นเชื้อราที่ถูกทดสอบแล้วว่า มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นตัวควบคุม จำนวนของแมลงในหลายๆชนิด โดยส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อราสายพันธุ์ *M. anisopliae* ที่ใช้เป็นตัว ควบคุมปริมาณแมลงซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนของแมลง และตัวเต็มวัย ได้ มากกว่า 200 ชนิด

เนื่องจากในสายพันธุ์ของเชื้อ *Metarhizium* นั้นมีมากมายหลายชนิด เช่น *M. anisopliae*, *M. acridum*, *M. flavoviride* ซึ่งแต่ละชนิดก็คุณสมบัติและความจำเพาะต่อการเข้าทำลายแมลงแต่ละ ชนิดที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในด้านชีวโมเลกุลและชีววิทยาของราที่สามารถเปรียบเทียบความ

แตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อราได้นั้น ถือเป็นช่องทางใหม่ในการนำเทคนิคการประยุกต์ในด้านโมเลกุลมาใช้โดยนำตำแหน่งความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมมาใช้เป็นตัวจำแนกเชื้อราในหลาย ๆ ที่มา เป็นการศึกษาที่ได้รับความนิยม รวมทั้งการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจะทำให้สามารถหาความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ได้จากการตรวจหาความแตกต่างที่เกิดขึ้น จากขนาดและโครงสร้างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆกัน โดยในการศึกษานี้ได้นำเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีที่มาจากแตกต่างกันออกไป และทำการค้นหาเชื้อ *M. anisopliae* ในธรรมชาตินำมาคัดแยกสายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเปรียบเทียบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) ในบริเวณ Internal Transcribed Spacers (ITS) ในหน่วยย่อยใหญ่ของ nuclear ribosomal RNA (LSU rDNA) นั้นทำให้เกิดความชัดเจนสูงในการจัดจำแนกสายพันธุ์ เพราะเป็นบริเวณอนุรักษ์หรือจุดที่ศึกษาพบว่ามีลักษณะความจำเพาะที่แตกต่างกันของเชื้อ *M. anisopliae*

หากทราบถึงที่มาและความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเชื้อ *M. anisopliae* ก็จะเป็นการง่ายต่อการนำมาใช้และเป็นการวางรากฐานสำหรับการค้นหาสายพันธุ์ใหม่ๆ ในธรรมชาติเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ในประเทศที่มีประสิทธิภาพต่อการนำมาใช้

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

เป็นการนำเทคนิคการเปรียบเทียบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism : RFLP) มาทำการคัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่มีในห้องทดลอง และทำการเก็บตัวอย่างของเชื้อรา *M. anisopliae* ในธรรมชาติเพื่อค้นหาสายพันธุ์ของเชื้อราที่พบในประเทศไทย นำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพและสถานะที่เหมาะสมกับภูมิประเทศเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

เชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง เช่นพวก *B. bassiana* และ *M. anisopliae* มีความสำคัญในการควบคุมแมลงที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคพืชได้หลายชนิด (Inglis และคณะ, 2001 ; Lomer และคณะ, 1997)

ขบวนการในการเข้าทำลายของเชื้อรามีลักษณะเป็นวงจรดังภาพที่ 2.1และภาพที่ 2.2 ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

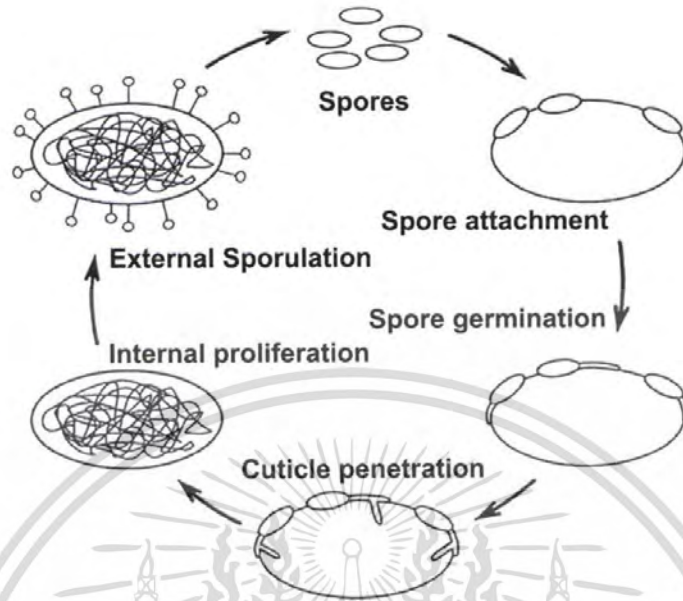
1. ระยะประชิดกับผนังลำตัวของแมลงเชื่อกันว่าแรงทางเคมีและแรงทางไฟฟ้าสถิต มีส่วนร่วมด้วย ปฏิกริยาร่วม (interreaction) ระหว่าง lipolytic บนผิวของสปอร์และไขมันบนผิวลำตัวแมลงอาศัย อาจมีส่วนสำคัญในการงอกของสปอร์

2. ระยะรากอก โดยทั่วไปสปอร์ของเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลง จะพักตัวในสิ่งแวดล้อมทางที่อุดมสมบูรณ์ เช่น ดิน เป็นต้น ถึงแม้ว่าความชื้นและอุณหภูมิจะพอเหมาะกับการงอกก็ตาม สปอร์เหล่านี้จะงอกทันทีภายหลังที่ได้ประชิดลำตัวแมลงอาจเป็นเพราะมีการกระตุ้นทางเคมีโดยสารบนผิวลำตัวแมลง และอาจกระตุ้นทางสรีระซึ่งสัมพันธ์กับขบวนการประชิดตัว หรืออาจเป็นเพราะการแยกทางสรีระออกจากจุลชีพซึ่งแข่งขันกันใช้สารอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ผิวลำตัวแมลงที่มีชีวิต หรือเพราะการประชิดผิวแมลงทำให้เชื้อราสร้างสารที่ทำให้การงอกดีขึ้น และกระตุ้นให้เกิดการงอกของสปอร์

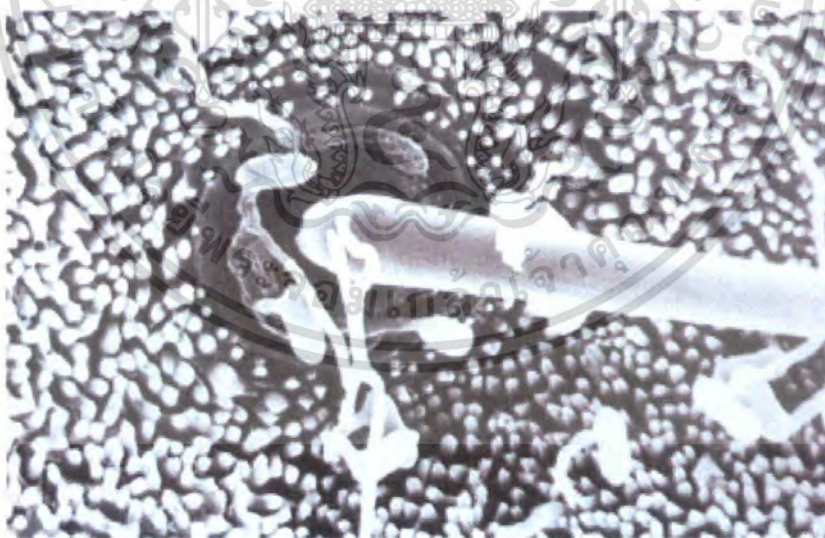
3. ระยะแทงทะลุผิว โดยราจะงอก germ tube ลื่น ๆ และใช้ germ tube หรือ injection pegs ที่ราสร้างขึ้นจากสปอร์แทงทะลุผิวหนังแมลงเข้าไปโดยมี appressoria เป็นส่วนที่ช่วยยึดผิวลำตัวแมลงไว้ เข้าใจว่ามีแรงทางเคมีและแรงทางกลเข้าเกี่ยวข้องในขบวนการนี้ โดยจากเคมีเป็นเอนไซม์ ซึ่งช่วงในการแทงทะลุผิวลำตัวแมลงที่ประกอบไปด้วยไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนโดยเฉพาะไคตินคาดว่าเอนไซม์หลายชนิดที่จำเป็นในการแทงทะลุผ่านผิวหนังลำตัวแมลงของ germ tube

4. ระยะการพัฒนาในตัวแมลง เมื่อเข้าไปแล้วเชื้อราจะสร้างเส้นใยเข้าไปตามทางเดินโลหิตและเข้าไปขยายจำนวนภายในเลือด โดยเส้นใยหักออกเป็นท่อนสั้น ๆ และเข้าทำลายอวัยวะต่าง ๆ ภายหลังที่แมลงตายลงหรือก่อนตายเล็กน้อยจะพบว่าเส้นใยขยายไปทั่วภายในลำตัวแมลงจนลำตัวเต็มไปด้วยเชื้อราหนาแน่นและแข็ง ในระยะต่อมาเชื้อราจะสร้างโคนิดีโอสปอร์และแทงทะลุออกมานอกลำตัวแมลงและสร้างสปอร์ตรงปลาย (มลิวัลย์, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 แสดงการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง
(ภาพจาก : <http://www.invasive.org/hwa/pathogens.cfm>)



ภาพที่ 2.2 แสดงการงอกของเชื้อราบนผิวของหนอนผีเสื้อ (กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน)
(ภาพจาก : <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/cham2.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium* sp.

M. anisopliae เป็นเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงมีลักษณะโครโมโซม 2n อยู่ในดิวิชัน deuteromycetes ซึ่งสันนิษฐานจากการสร้างระบบสืบพันธุ์ และข้อมูลทางพันธุกรรม (genotype) ได้จากสัตว์อาศัย (Michael และคณะ, 2000) เชื้อ *M. anisopliae* มีลักษณะคล้ายกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงโดยทั่ว ๆ ไป คือจะใช้กลไกทั้งในการเจาะทะลุผ่านชั้นของผิวหนังด้านนอกของสัตว์อาศัย (host) และจะเข้าไปในระบบน้ำเหลืองซึ่งอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่เชื้อนี้จะสามารถเจริญเติบโตได้กลไกที่ใช้มี 2 แบบคือ ทางเคมี ได้แก่ การใช้ เอนไซม์ (enzyme) และ ทางกล (mechanical force) (Chengshu และคณะ, 2002)

เชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเข้าทำลายทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงได้มากกว่า 200 สายพันธุ์ ดังภาพที่ 2.3 เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคแก่แมลง มีลักษณะการเข้าทำลายแมลงอาศัยแตกต่างกันไปจากเชื้อโรคอื่นของแมลง เช่น ไวรัส และแบคทีเรียจะทำให้เกิดโรคแก่แมลงโดยการกิน แต่เชื้อราพบว่าส่วนใหญ่จะเข้าไปทางผิวหนังโดยตรง (Marcela และคณะ, 2006)

ความพิเศษของเชื้อ *M. anisopliae* ที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในการควบคุมแมลง คือ

1. เชื้อ *M. anisopliae* นี้ไม่ทำให้เกิดการติดเชื้อในมนุษย์หรือสัตว์ชั้นสูง
2. จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *M. anisopliae* นี้ สามารถใช้ในการควบคุมแมลงได้หลายสายพันธุ์
3. เชื้อรา *M. anisopliae* นี้มีสปอร์ที่มีความทนทาน ซึ่งง่ายต่อนำมาทำการทดลองและการเก็บรักษา
4. มีระยะเวลาในการคงอยู่นานโดยจากการศึกษาสปอร์ของเชื้อ *M. anisopliae* นี้ แม้จะอยู่ในรังของปลวกนานกว่า 18 เดือน ก็สามารถเจริญไปเป็นเส้นใยของเชื้อราได้ (Milner และ Staples, 1996)



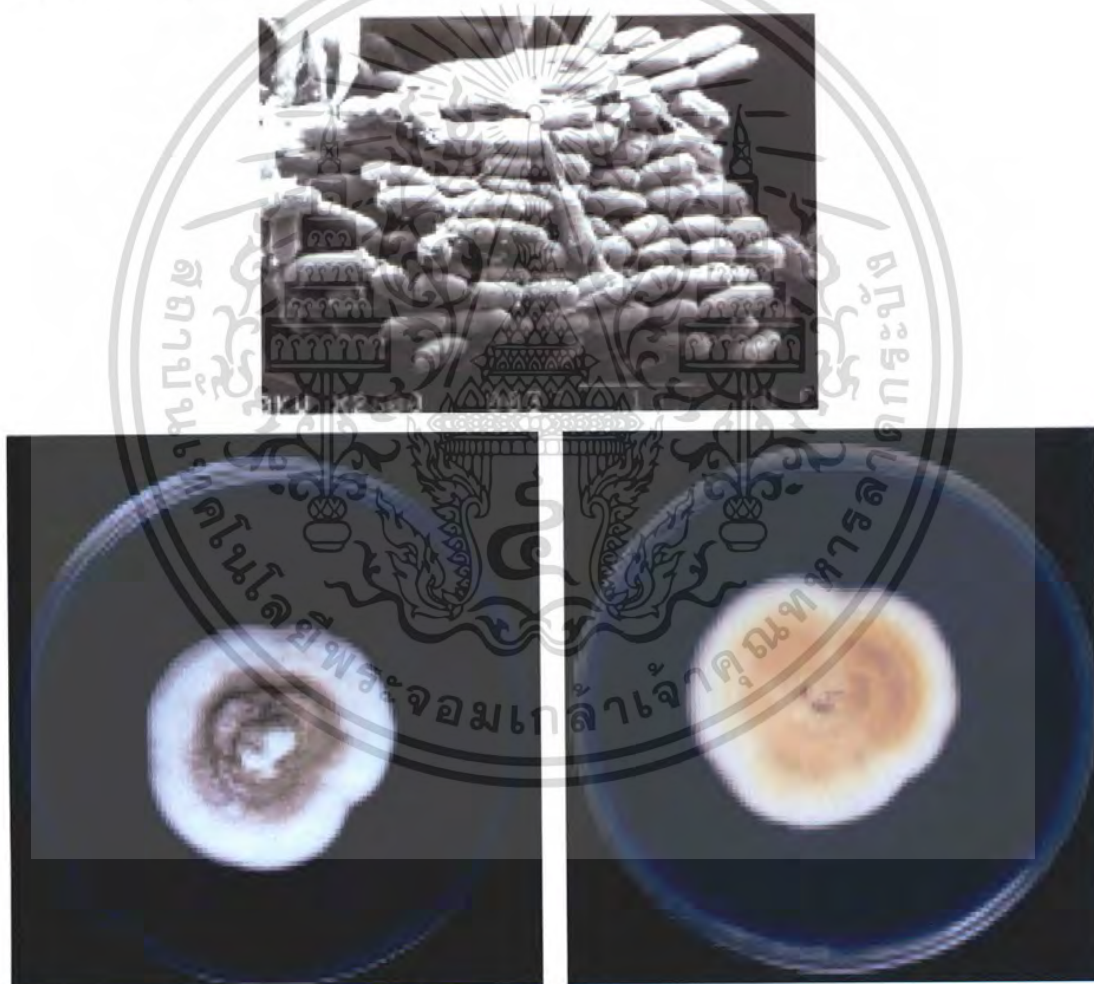
ภาพที่ 2.3 แสดงการเข้าทำลายของเชื้อรา *M. anisopliae* บนตัวอ่อนและตัวเต็มวัยของแมลงต่าง ๆ : หนอนผีเสื้อใบยาสูบ (บนซ้าย) , ตั๊กแตนทะเลทราย (ล่างซ้าย) , ค้างคาวหนวดยาว (บนขวา , กลางขวา) และหนอนผีเสื้อ (ล่างขวา)

(ภาพจาก : http://pmc04.doae.go.th/NE0949/pathogen_MetAni.htm และ

<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/cham2.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีลักษณะการเจริญของโคโลนีที่ต่างกัน ทั้งในด้านรูปร่าง ลักษณะความค้ำหรือมัน เรียบหรือขรุขระของผิวหน้าของโคโลนี สีของโคโลนี ความหนาแน่นของการสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการพองฟูหรือยุบลงของโคโลนี เมื่อมีอายุมากขึ้น เชื้อรา *M. anisopliae* ทุกสายพันธุ์มีลักษณะของโคโลนีคล้ายกัน คือ สร้างโคโลนีที่แน่นเห็นเป็นรอยหยักลึกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อผิวหน้าไม่ฟู สร้างสปอร์สีขาวในระยะแรก แล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียวย่นขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นสีเขียวเข้มอมน้ำตาล โดยจะเริ่มสร้างสปอร์ตรงศูนย์กลางของโคโลนีก่อน แล้วจึงขยายไปรอบๆ โดยที่แต่ละสายพันธุ์เจริญได้ช้าและเร็วต่างกันอย่างเห็นได้ชัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน ดังภาพที่ 2.4 (ทิพย์วดี และคณะ, 2546)



ภาพที่ 2.4 แสดงลักษณะของเชื้อรา *M. anisopliae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA : ภาพการเจริญของเส้นใยจากผิวด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ซ้าย), ภาพการเจริญของเส้นใยจากด้านล่างจนแก้ว (ขวา), และภาพแสดงลักษณะสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (บน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารจาก : ทิพย์วดี และคณะ, 2546) การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เชื้อรา *Metarhizium* sp.

ในการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp. จากในดินนั้นการเลือกใช้อาหารเพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการนั้นก็มีส่วนช่วยให้สามารถคัดเลือกเชื้อราได้ง่ายขึ้น อาหารที่ใช้ในการคัดแยก (selective media) เชื้อรา *Metarhizium* sp. จากดินนั้นมีหลายชนิดด้วยกัน โดย Fumio และคณะ (2003) ได้ใช้อาหาร SMY (Sabouraud Maltose Medium) ซึ่งประกอบไปด้วย 4% มอลโตส, 1% เปปโตน, 1% สารสกัดจากยีสต์และวุ้น 1.5 % นอกจากนี้ยังมีการใส่ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย คือ แอมพิซิลิน 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร, คลอแรมฟินิคอล 0.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในการคัดแยกเชื้อราจากดิน นอกจากนี้ Hughes และคณะ (2004) ได้ทำการแยกเชื้อราจากดินโดยใช้ดินตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่เติม 0.05 % Triton-X ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปเขย่านาน 25 วินาที และทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 1×10^0 , 1×10^{-1} และ 1×10^{-2} จากนั้นนำสารละลายที่ทำการเจือจางแล้วปริมาตร 100 ไมโครลิตรไปทำการ spread plate บนอาหารมาตรฐาน (Sabouraud Dextrose Agar) และอาหารคัดแยกเชื้อ ซึ่งประกอบไปด้วย 65 กรัมของ Sabouraud Dextrose Agar, 1 มิลลิลิตร ของ 10% dodine, 1 มิลลิลิตรของ 10% สเตรปโตมัยซินซัลเฟต, และ 1 มิลลิลิตรของ 5% คลอแรมฟินิคอล ต่อน้ำปริมาตร 1 ลิตร

จากการศึกษาที่ผ่านมา ลักษณะที่พบเห็นของแมลงที่เป็นสัตว์อาศัยของเชื้อราพบว่าเชื้อรามีความสามารถที่จะดำรงชีวิตอยู่ในดินและสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยปัจจัย เช่น ขาฆ่าแมลง สารประกอบทางอินทรีย์ของดิน ความชื้น รังสีอัลตราไวโอเลต และอุณหภูมิ ซึ่งสิ่งเหล่านี้เป็นสิ่งแวดล้อมทางกายภาพซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยที่เป็นสื่อกลางของการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุศาสตร์ของประชากร อย่างไรก็ตาม จากการสันนิษฐานว่ามีปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมหลายประการที่มีอิทธิพลต่อโครงสร้างของประชากรของเชื้อรา และความสามารถในการกลับคืนสู่สภาพเดิมเมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต อย่างไรก็ตาม ปัจจัยเหล่านี้ไม่สามารถใช้ในการกำหนดโครงสร้างของประชากรของเชื้อราได้ แต่ได้รับการรวบรวมไว้ในการทดสอบความเป็นไปได้ในการเชื่อมโยงกันของตัวชี้วัดทางกายภาพของพันธุศาสตร์ประชากร (Michael และคณะ, 2000)

ในการผลิตสารที่เกี่ยวข้องกับเชื้อรา *M. anisopliae* หรือเชื้อราที่เป็นสารควบคุมทางชีวภาพอื่น ๆ จะต้องพิจารณาปัจจัยในหลายประการเพื่อพัฒนาอาหารและปัจจัยการผลิตอื่น ๆ ให้มีราคาถูกเพื่อให้ได้ผลผลิตที่มาก อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจะต้องไม่ให้อาหารสปอร์ที่เพิ่มมากขึ้นเท่านั้น แต่จะต้องได้สปอร์ที่มีคุณภาพ เช่น มีความทนทานต่อการทำแห้ง ความคงตัวในการทำแห้งและความรุนแรงในการเกิดโรคในสัตว์อาศัย ต้องมีการดูแลและให้ความสนใจในเรื่องของสารอาหารที่เหมาะสม สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตและผลผลิตสปอร์ที่ได้ไปจนถึง การสะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสารที่สร้างขึ้นของเชื้อราที่เหมาะสมและรูปแบบของสปอร์ที่มีคุณภาพที่เพิ่มมากขึ้น (Farooq และคณะ, 2005)

Anna และคณะ (2007) พบว่ามีการทดลองในหลาย ๆ การทดลองที่ที่ใช้ประโยชน์จากเทคนิค PCR ในการตรวจสอบการพัฒนาของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในหลากหลายสายพันธุ์ของตัวอย่างการทดลอง ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะวิเคราะห์บริเวณยีนที่มีความซ้ำกันของลำดับเบสในปริมาณมาก โดยเฉพาะในยีนของ rDNA (18S, 28S และ 5.8S) และบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) คือ ITS1 และ ITS2 ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ว่องไวในการตรวจสอบและมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของเชื้อราสูง ซึ่งในการทดลองของ Anna และคณะนี้ เลือกศึกษายีนบริเวณ ITS 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง 18S และ 5.8S ของยีน rRNA เพราะ

1. ยีนบริเวณนี้มีความซ้ำกันของลำดับเบสในปริมาณมาก (> 100 คู่เบส ในจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อรา)
2. เป็นบริเวณที่ใช้กันอย่างกว้างขวางและมีความเหมาะสมในการใช้ศึกษาสายพันธุ์ของเชื้อรา
3. บริเวณนี้มีความหลากหลายมากในแต่ละสายพันธุ์และเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อราในแต่ละสายพันธุ์ด้วย

2.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ตามวิธีดั้งเดิมในการแยกกลุ่มและสายพันธุ์ของเชื้อรานั้น จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการแยกกลุ่มและสายพันธุ์ของเชื้อรา แต่เครื่องมือที่มีนั้นไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของเชื้อ *M. anisopliae* และลักษณะของเชื้อที่สามารถมองเห็นได้นั้นไม่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างได้พอที่จะพิสูจน์ได้ว่า เป็นเชื้อที่ต่างกัน เนื่องจากเชื้อ *M. anisopliae* นั้น มีลักษณะที่คล้ายกันแต่ก็มีความจำเพาะต่อแมลงและลักษณะบางอย่างที่แตกต่างกัน จากการศึกษาในด้านชีวโมเลกุล และชีววิทยาของราที่สามารถในการทำลายแมลง ถือเป็นวิธีการใหม่ในการนำเทคนิคการประยุกต์ด้านโมเลกุลมาใช้ โดยนำตำแหน่งความแตกต่างทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้เป็นตัวจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae* จากแหล่งต่าง ๆ และเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงชนิดอื่นๆ เป็นการศึกษาที่ได้รับความนิยม รวมทั้งการวิเคราะห์วิวัฒนาการ โดยสามารถหาความจำเพาะในสายพันธุ์ได้จากการตรวจหาความแตกต่างที่เกิดขึ้นจากขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่าง ๆ กันจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) ใน rDNA (ribosomal DNA) (Marcela และคณะ, 2006)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1 ข้อมูลพันธุลักษณะ (genotype) ของประชากร ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายทั้งทางกายภาพ และระดับโมเลกุลเป็นตัวบ่งบอก การใช้โมเลกุลเครื่องหมายนับเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลาย ทั้งนี้เนื่องจากมีข้อจำกัดน้อยและมีปริมาณของความแตกต่างมากในสิ่งมีชีวิต ซึ่งการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลใดๆ นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของประชากรเป็นสำคัญ สำหรับเครื่องหมายและโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันที่สำคัญคือ

2.4.1.1 Naked-Eye Polymorphism (NEP) เป็นความแตกต่างทางกายภาพ ของสิ่งมีชีวิตที่สามารถจะแยกออกอย่างง่าย ๆ ซึ่งลักษณะเหล่านี้ควบคุมด้วยยีนเพียงยีนเดียว ลักษณะทางกายภาพนี้สามารถนำมาเป็นเครื่องหมายบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตได้ อย่างไรก็ตาม คุณสมบัติที่สำคัญของเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือสะดวกและง่ายต่อการเก็บข้อมูล อย่างไรก็ตามจำนวนที่มีในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ นั้นเป็นข้อจำกัด อีกทั้งการกระจายตัวยังไม่ทั่วถึงทั้งจีโนมอีกด้วย

2.4.1.2 Isozyme และ Allozyme โดยที่ isozyme เป็นกลุ่มของเอนไซม์ต่างชนิดกันที่ทำหน้าที่เดียวกัน ส่วน allozyme นั้นคือกลุ่มของเอนไซม์ที่ผลิตมาจากอัลลีลที่ต่างกันจากยีนตัวเดียวกัน การตรวจสอบความแตกต่างนั้นอาศัยหลักการของความสามารถในการเคลื่อนตัวของโมเลกุลโปรตีนในอะกาโรสเจล ซึ่งแต่ละแบบของเอนไซม์จะมีความสามารถเร็วช้าในการเคลื่อนตัวที่ต่างกัน สำหรับขั้นตอนในการทำ isozyme และ allozyme นั้นเริ่มจากการสกัดเอนไซม์ที่ต้องการ จากนั้นจึงนำไปแยกขนาดด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความแตกต่างของชนิดนั้นเกิดได้จากรูปแบบของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน คุณสมบัติที่สำคัญของ โมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือการเป็น codominant marker อย่างไรก็ตามจำนวนของเครื่องหมายชนิดนี้ก็มีจำกัดในสิ่งมีชีวิต และเนื้อเยื่อพืชที่นำมาใช้สกัดก็เป็นตัวกำหนดคุณภาพอีกด้วย

2.4.1.3 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ซึ่งการตรวจสอบความแตกต่างอาศัยหลักการของความสามารถในการจับ (hybridize) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เหมือนกันควบคุมกับหลักของความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งที่ตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว สำหรับขั้นตอนในการทำ RFLP นั้นเริ่มจาก การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นก็นำดีเอ็นเอที่ถูกตัดแล้วนี้ไปแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กจะเดินทางในอะกาโรสเจลเร็วที่สุด ความแตกต่างของลักษณะภายในสายพันธุ์นั้นเกิดได้จากการเพิ่มขึ้น การขาดหาย หรือ การกลายพันธุ์ของลำดับเบสที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.4.1.4 Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการใช้ ลำดับนิวคลีโอไทด์สายสั้น ๆ ประมาณ 10 เบส เป็น ไพรเมอร์ เพื่อใช้ในการเพิ่มขยายจีโนมิกดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ไพรเมอร์นั้นสามารถไปจับได้โดยอาศัยหลัก-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การของการเพิ่มปริมาณโดยชิ้นส่วนที่ได้รับการเพิ่มขยายปริมาณแล้วนั้นจะถูกนำไปแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสเจล ซึ่งความแตกต่างของประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่มขึ้น การขาดหาย หรือ การกลายพันธุ์ของลำดับเบสในตำแหน่งที่นั้นๆ คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายนี้ก็คือความง่าย และความประหยัดต้นทุนในการดำเนินการ เนื่องจากการสร้างไพรเมอร์นั้นเป็นแบบสุ่มไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลจากลำดับเบส อีกทั้งใช้ปริมาณของดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อยมาก เนื่องจากอาศัยระบบของ PCR (Polymerize Chain Reaction) อย่างไรก็ตาม โมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้มักจะเป็น dominant marker จึงไม่สามารถตรวจสอบ heterozygous ได้ อีกทั้งยังไม่ทราบตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนมอีกด้วย

2.4.1.5 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่รวบรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าไว้ด้วยกัน วิธีการก็คือตัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ชนิดหนึ่งสามารถตัดได้ถี่ซึ่งโดยมากจะใช้ 4-base cutter ส่วนอีกชนิดหนึ่งจะตัดด้วยความถี่ที่น้อยกว่า โดยมากใช้ 6-8 base-cutter จากนั้นนำ adapter ของเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสองมาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ไลเกสสำหรับการเพิ่มขยาย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นใช้หลักการของ PCR โดยจะใช้ oligonucleotide ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับเบสที่ตรงกันข้ามกับ adapter ซึ่งทำให้สามารถจับกับ adapter ได้กระชับ โดยเพิ่มเบสจำเพาะ (selective base) ในส่วนท้ายของไพรเมอร์ ซึ่งนิยมใช้เบสจำเพาะจำนวน 2 หรือ 3 ซึ่งผลลัพธ์ได้คือการเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอบริเวณจำเพาะที่ไพรเมอร์สามารถจับได้ผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งความแตกต่างของประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่มขึ้น การขาดหาย หรือ การกลายพันธุ์ของลำดับเบสในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ ในตำแหน่งระหว่างไพรเมอร์นั้นๆ คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือจำนวนของความแตกต่าง (polymorphism) ที่สามารถตรวจสอบได้สูง 10-20 ความแตกต่างต่อการทำแต่ละครั้ง อีกทั้งสามารถเป็นได้ทั้ง codominant และ dominant marker ปัญหาที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือความยุ่งยากในการเก็บข้อมูลและจำนวนขั้นตอนที่ซับซ้อน อีกทั้งการไม่รู้ตำแหน่งที่แน่นอนในจีโนม

2.4.1.6 Simple Sequence Repeat (SSR) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้หลักการของการกระจายตัวของเบสซ้ำที่มีในสิ่งมีชีวิตลักษณะที่สำคัญของเบสซ้ำเหล่านี้ก็คือการมีลำดับเบสจำเพาะอยู่บริเวณหัวท้ายของเบสซ้ำซึ่งเบสจำเพาะเหล่านี้สามารถนำมาใช้สร้างเป็นไพรเมอร์ขนาด 20 เบส หรือมากกว่าเพื่อใช้ขยายปริมาณเบสซ้ำในตำแหน่งที่ต้องการโดยใช้หลักการของ PCR ผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้ โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งความแตกต่างของประชากรเกิดจากความแตกต่างของจำนวนเบสซ้ำในแต่ละสายพันธุ์คุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่ง โมเลกุลเครื่องหมายบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีโนม และจำนวนของรูปแบบของอัลลีลที่สามารถตรวจสอบได้ นอกจากนั้น โมเลกุลเครื่องหมายยังเป็นชนิด codominant จึงสามารถตรวจสอบ heterozygous ได้

2.4.1.7 Sequence Tag Site (STS) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของตำแหน่งเฉพาะในจีโนมมาออกแบบไพรเมอร์จากนั้นใช้หลักการของ PCR เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ ผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งความแตกต่างในประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายของลำดับเบสบริเวณจำเพาะนั้นหรือกลายพันธุ์ในตำแหน่งของไพรเมอร์ที่จับคุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่ง โมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนมและการเป็น codominant marker สำหรับข้อจำกัดที่สำคัญนั้นก็คือจะต้องมีข้อมูลลำดับเบสสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

2.4.1.8 Express Sequence Tag (EST) เป็นโมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ข้อมูลจากลำดับเบสของยีนที่มีการแสดงออกมาออกแบบไพรเมอร์เฉพาะตำแหน่งของยีนนั้นๆจากนั้นใช้หลักการของ PCR เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสหรือโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วแต่ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นๆ ซึ่งความแตกต่างของประชากรนั้นเกิดจากการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายของลำดับเบสที่ตำแหน่งยีนคุณสมบัติที่สำคัญของโมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือ ความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่ง โมเลกุลเครื่องหมายต่อยีนที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์สำหรับข้อจำกัดที่สำคัญนั้นก็คือจะต้องมีข้อมูล ลำดับเบสสำหรับใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ เช่นเดียวกับ STS

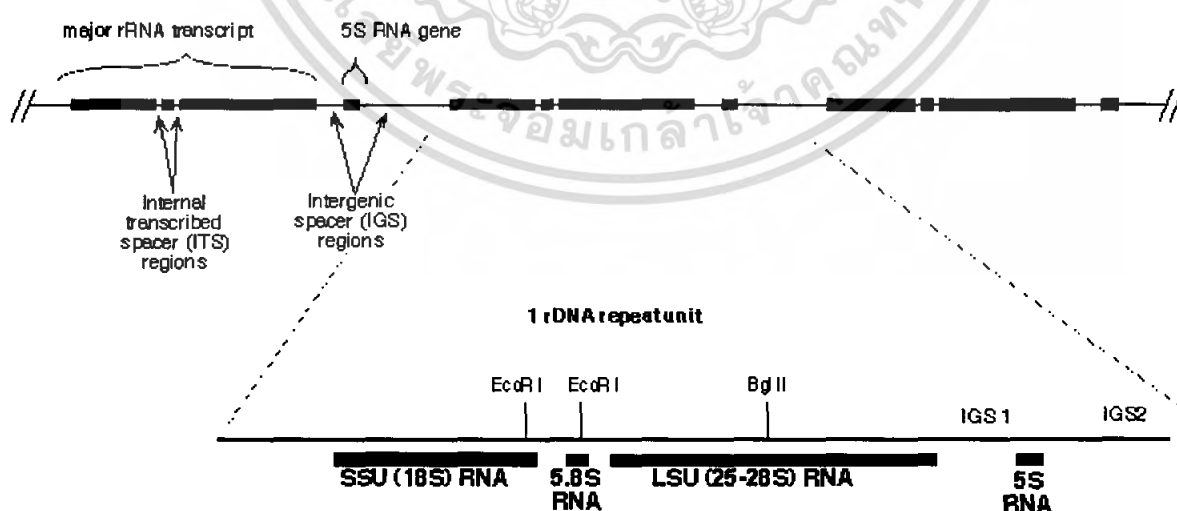
2.4.1.9 Resistance Gene Analog Polymorphism (RGAP) เป็น โมเลกุลเครื่องหมายที่ใช้ข้อมูลลำดับกรดอะมิโนตรงตำแหน่งที่อนุรักษ์ของยีนต้านทานโรคและแมลงต่างๆมาออกแบบ degenerate ไพรเมอร์จากนั้นใช้หลักการของ PCR เพื่อเพิ่มขยายชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอผลผลิตของการทำ PCR นั้นจะนำไปแยกขนาดโดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งสามารถตรวจสอบความแตกต่างอันเกิดจากการเพิ่มขึ้น การขาดหาย หรือ การกลายพันธุ์ของลำดับเบสในบริเวณตำแหน่งของยีนนั้นๆคุณสมบัติที่สำคัญของ โมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้ก็คือความจำเพาะเจาะจงของตำแหน่งโมเลกุลเครื่องหมายบนจีโนมซึ่ง โมเลกุลเครื่องหมายนี้จะอยู่ใกล้กับหรือตรงกับตำแหน่งของยีนต้านทาน โมเลกุลเครื่องหมายชนิดนี้เป็นได้ทั้ง dominant และ codominant marker อีกทั้งยังมีตำแหน่งที่แน่นอนบนจีโนมอีกด้วย

(<http://dna.kps.ku.ac.th/mcrop/linkageMap/genomeMapping.doc>)

2.4.2 ไรโบโซม

เป็นเครื่องมือที่เซลล์ใช้แปลรหัสพันธุกรรมมีลักษณะและการทำงานคือ ไรโบโซมจะทำงานโดยการจับกับ mRNA เพื่อการแปลรหัสพันธุกรรม ในการนี้ไรโบโซมแปลรหัสโดยการทำให้โคดอนบน mRNA จับกับแอนติโคดอนบน tRNA ได้อย่างจำเพาะก่อนที่จะมีการเชื่อมกรดอะมิโนที่ tRNA นำเข้ามา โดยที่ภายในไรโบโซมมีบริเวณที่จับกับ tRNA อยู่สองบริเวณคือบริเวณที่จับกับ aminoacyl tRNA เรียกว่า A site กับบริเวณที่จับกับ peptidyl tRNA เรียกว่า P site ไรโบโซมอ่านรหัสพันธุกรรมบน mRNA ไปทีละ 1 โคดอนในระหว่างการสังเคราะห์โปรตีน การอ่านรหัสบน mRNA นี้ไรโบโซมจะอ่านรหัสไปในทิศ 5' -> 3' และเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ระหว่าง aminoacyl tRNA และ peptidyl tRNA นอกจากนี้ไรโบโซมยังทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนในทุกขั้นตอนอันได้แก่ initiation, elongation และ termination ไรโบโซมประกอบขึ้นจาก rRNA และส่วนประกอบของไรโบโซมมี 2 หน่วยย่อยคือ หน่วยใหญ่ (50S, 60S) และหน่วยเล็ก (30S, 40S) มีขนาดต่างกันขึ้นกับว่าเป็นไรโบโซมของโปรคาริโอตหรือยูคาริโอตแต่ถึงแม้ว่าจะมีขนาดแตกต่างกันไรโบโซมก็ทำหน้าที่เดียวกันคือการสังเคราะห์โปรตีน

การตรวจสอบรหัสยีนใน Inter Genic Spacers (IGS), Internal Transcribed Spacers (ITS) (ภาพที่ 2.5) และในหน่วยเล็กและใหญ่ของ nuclear ribosomal RNA นั้นทำให้เกิดความชัดเจนสูงในการจัดจำแนกสายพันธุ์ เพราะเป็นบริเวณอนุรักษ์หรือจุดที่ทดสอบพบว่ามีลักษณะความจำเพาะที่แตกต่างกันของ *M. anisopliae* (Marcela และคณะ, 2006)

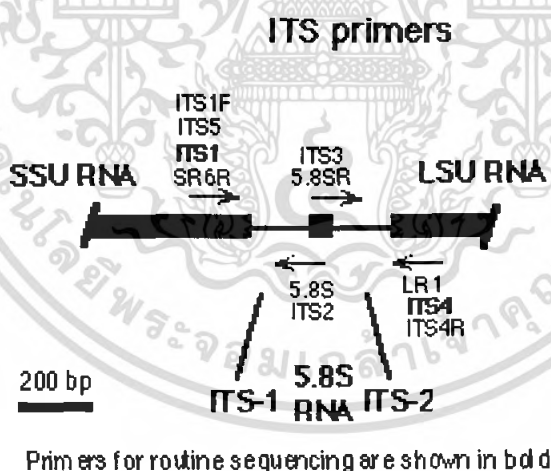


ภาพที่ 2.5 แสดงบริเวณที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อรา

(ภาพจาก : <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการตรวจสอบความแตกต่างหรือวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตสปีชีส์ต่าง ๆ นั้น การใช้ rDNA ในการวิเคราะห์ก็มีความสำคัญเนื่องจาก rDNA ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอตจะประกอบด้วยตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ไปเป็น rRNA ขนาด 18S, 5.8S, 28S และตำแหน่งที่คั่นระหว่าง rDNA แต่ละขนาดเรียกว่า Internal Transcribed Spacers (ITS) ซึ่งจะมี 2 ตำแหน่งคือ ITS1 และ ITS2 นอกจากนี้ rDNA ยังมีลำดับเบสที่หลากหลายในแต่ละสิ่งมีชีวิตซึ่งจะสามารถนำมาใช้ในการศึกษาการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่แตกต่างกันของลำดับของสิ่งมีชีวิตได้ (Fouly และคณะ, 1997 ; Argentina, 1999) Ricardo ได้ทำการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าความยาวของ rDNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณบริเวณตำแหน่งเฉพาะของไพรเมอร์บริเวณ ITS (ภาพที่ 2.6 และตารางที่ 2.1) สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อรา *M. anisopliae* จากเชื้อรา *M. album* และ *M. flavoviride* ได้ และการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 6 ชนิด (*Afl* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II และ *Sau* 3AI) ยังสามารถใช้ในการจัดจำแนกความแตกต่างของ *M. anisopliae* ได้อีกด้วย (Ricardo, 2004) นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Curran และคณะ (1994) และ Driver และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า ข้อมูลลำดับเบสในส่วน of ITS และ 5.8S rDNA สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อ *Metarhizium* spp. ได้



ภาพที่ 2.6 แสดงตำแหน่งจับของไพรเมอร์บริเวณ ITS

(ภาพจาก : <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>)

ตารางที่ 2.1 แสดงไพรเมอร์และบริเวณจับของไพรเมอร์บน ITS – rDNA

ชื่อไพรเมอร์	ตำแหน่งจำเพาะ	อ้างอิง
ITS1	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'	White et al, 1990
ITS2	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'	White et al, 1990
ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'	White et al, 1990
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'	White et al, 1990
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'	White et al, 1990
ITS1-F	5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3'	Gardes & Bruns, 1993
ITS4-B	5' CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG 3'	Gardes & Bruns, 1993
5.8S	5' CGCTGCGTTCTTCATCG 3'	Vilgalys lab
5.8SR	5' TCGATGAAGAACGCAGCG 3'	Vilgalys lab
SR6R	5' AAGNAAAAGTCGTAACAAGG 3'	Vilgalys lab

ที่มา : <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>

2.4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของดีเอ็นเอซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอ ต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปีพ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อยจนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลายๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมากต่องานด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

2.4.3.1 หลักการของ PCR

ใช้หลักการพื้นฐานในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอที่เป็น

ต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสซึ่งใช้กันอยู่ทั่วไปในการติดฉลากดีเอ็นเอและ
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสแต่ PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกันโดยใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ปฏิกริยา PCR มี 3 ขั้นตอนและหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน

ขั้นแรก เรียกว่า denaturing เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิสูง 92-95 องศาเซลเซียส

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

ขั้นที่สาม เรียกว่า extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลาย 5 ของไพรเมอร์ตามข้อมูลบนดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรสที่ใช้ควรจะต้องคุณสมบัติอยู่ได้ภายใต้สภาวะของปฏิกริยาตลอดทั้งสามขั้นตอน

จากขั้นตอนที่ 1-3 ซึ่งนับเป็นจำนวน 1 รอบ (one cycle) จะให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าเมื่อจัดให้เกิดปฏิกริยาลูกโซ่จากขั้นที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนไปอีกหลาย ๆ รอบจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มากมายประมาณว่าปฏิกริยา 20 รอบ สามารถเพิ่มปริมาณสารดีเอ็นเอ ไม่น้อยกว่า 100,000 เท่า

2.4.3.2 สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกริยา PCR

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลองจึงต้องมีการเติมสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่สารเคมีที่ต้องใช้ปฏิกริยา PCR มีดังต่อไปนี้

- Deoxynucleotides (dNTPs) เป็นนิวคลีโอไทด์ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

- ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกริยาเชื่อมต่อกับนิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์

- ไพรเมอร์เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ในการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการจะเพิ่มจำนวนเพื่อใช้ในการสร้างไพรเมอร์จำเพาะ

- PCR บัพเฟอร์ เป็นสารละลายที่ช่วยควบคุมสภาวะของการทำปฏิกริยาให้เหมาะสมเช่น พีเอช และเกลือต่าง ๆ ซึ่งจะต้องมีอนุพลแมกนีเซียม (Mg^{++}) อยู่ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง ทยวจยมเกล้าจาดกระษั

- Template คือดีเอ็นเอต้นแบบหรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ

สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็ก ปริมาตรสาร 20-100 ไมโครลิตร เมื่อนำหลอดส่วนผสมไปใส่ไว้ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่เรียกว่า เครื่องเทอร์โมไซเคิล (DNA thermal cycler : นิยมเรียกว่าเครื่อง PCR) ที่ปรับอุณหภูมิได้ตาม โปรแกรมที่กำหนดจะเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นในหลอด เมื่อเกิดปฏิกิริยาจนครบรอบ และระยะเวลาที่กำหนดจะได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการเป็นจำนวนมาก

2.4.3.3 เครื่องเทอร์โมไซเคิล (thermal cycler)

เครื่องเทอร์โมไซเคิล เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR ซึ่งเครื่องนี้มีอยู่หลายแบบ และหลายระบบขึ้นกับการออกแบบและการคิดค้นของบริษัทผู้ผลิตข้อสำคัญคือต้องสามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบได้ตั้งโปรแกรมการทำงานได้และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนักระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้นคือ denaturing, annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

2.4.3.4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองจะไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ดังนั้นเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอผลผลิตจะต้องนำตัวอย่างที่ทำ PCR มาแยกหาดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคที่เรียกว่า อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.4.3.5 ประโยชน์ของ PCR

ปัจจุบันนี้นับได้ว่า PCR เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุล ทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตร สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของพันธุกรรมหรือยีนทำแผนที่ยีนและศึกษาลำดับเบสของยีนของสิ่งมีชีวิตได้ทุกชนิด ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคนี้สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สนใจศึกษาให้มีปริมาณมากในเวลาอันรวดเร็วและเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย

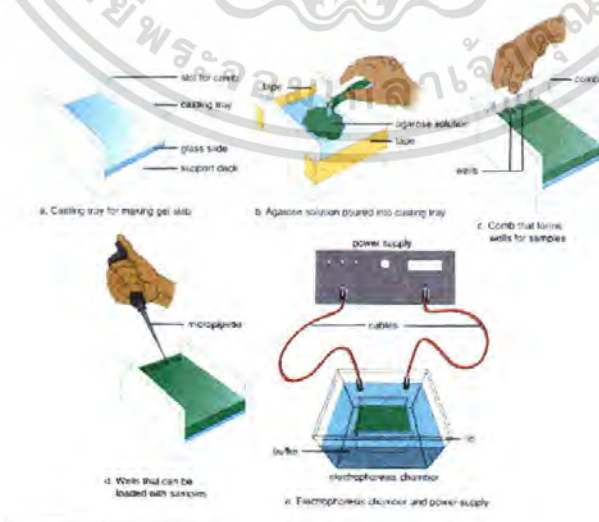
ประโยชน์ของ PCR ทางด้านการแพทย์ ได้แก่ การตรวจวินิจฉัยโรคโดยการตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค (เช่น โรคเอดส์, วัณโรค, มาเลเรีย) การตรวจหาอินกอมะเร็ง (เช่น มะเร็งเต้านม, มะเร็งลำไส้ใหญ่) ซึ่งประโยชน์ของ PCR ทางด้านการแพทย์เหล่านี้ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ทางด้านการเกษตร PCR มีบทบาทมากในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช การเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อ 83976 ว่างถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจวินิจฉัยโรคสายพันธุ์พืชด้านทานโรค การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรครวมทั้งศึกษายีนกับตัวอื่น ๆ ของพืชและเชื้อโรค และการแสดงออกของยีนเหล่านั้นได้ซึ่งเทคนิค PCR นี้ช่วยให้เข้าใจถึงพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชและพืชอาศัยตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ ขณะนี้เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงกิ่งซึ่งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย 4-5 หมื่นล้านบาทต่อปี แต่ในปัจจุบันนี้เกษตรกรเริ่มประสบปัญหาจากโรคระบาดในบ่อเลี้ยงกิ่งซึ่งมีผลต่อผลผลิตกิ่งส่งออกทำให้ประเทศไทยสูญเสียรายได้ถึงปีละ 1-2 หมื่นล้านบาท สาเหตุของโรคระบาดในกิ่งที่พบส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งต้องใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบทำให้สามารถป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันที่ นอกจากนี้การคัดเลือกสายพันธุ์กิ่งที่ดีเพื่อใช้ในการผสมพันธุ์ซึ่งมีความแปรปรวนพันธุกรรม (genetic diversity หรือ variation) สูงจะไม่สามารถดำเนินไปได้ถ้าไม่ใช้วิธีการคัดเลือกที่มีประสิทธิภาพและถูกต้องถึงระดับพันธุกรรม (<http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm>)

2.4.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นอะกาโรสเจล (agarose gel) ดังภาพที่ 2.7 โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอสามารถเคลื่อนที่ไปได้จะขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งจะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอุตราไวโอเลตซึ่งจะเห็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นวุ้น (<http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm>)



ภาพที่ 2.7 แสดงการทำเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) คือ การนำความรู้ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศมาใช้ในการศึกษาข้อมูลที่ได้จากการวิจัยด้านชีวภาพ (biological science) ทำให้ก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่องานวิจัยทางด้านวิทยาศาสตร์ชีวภาพและการแพทย์ชีวสารสนเทศเป็นศาสตร์แขนงใหม่ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการนำความรู้ด้านเทคโนโลยีสารสนเทศมาใช้ในการศึกษาและใช้เพื่อการจัดการกับข้อมูลจำนวนมากที่ได้จากการวิจัยด้านชีวภาพ (biological science) ซึ่งในปัจจุบันข้อมูลของยีนและโปรตีนมีจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากบริษัทเซเลรา (celera genomics) ซึ่งทำการถอดลำดับจีโนมมนุษย์สำเร็จเป็นรายแรกและยังมีแผนการที่จะถอดลำดับจีโนมของมนุษย์อีก 6 ครั้งเพื่อให้ข้อมูลที่ได้ครอบคลุมมนุษย์ทุกๆ เชื้อชาติและเพศ (<http://www.ims.nus.edu.sg/Programs/genome/part1.htm>)

ดังนั้นนักวิจัยและนักวิทยาศาสตร์จึงต้องอาศัยเครื่องมือและความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศมาช่วยจัดการระบบบริหารข้อมูลจำนวนมากที่เป็นผลจากโครงการจีโนมของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ความรู้ความเข้าใจและการประยุกต์ใช้ชีวสารสนเทศในงานวิจัยจะช่วยให้นักวิจัยสามารถสืบค้นข้อมูลยีนและโปรตีน โดยศึกษาความสัมพันธ์ของการทำงานของยีนทั้งระบบ (genome wide) เข้าใจกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเข้าใจความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนตลอดจนการค้นหาเป้าหมายใหม่ๆ ของยา

การใช้ชีวสารสนเทศมาช่วยในการถอดลำดับจีโนม

การเรียงตัวของคู่เบส (sequencing) ทำโดยตัดเส้นดีเอ็นเอเป็นชิ้น ๆ แล้วป้อนเข้าไปให้เครื่องอ่านอัตโนมัติอ่านถอดอักษรทีละตัวๆ ของรหัสทางพันธุกรรมจากนั้นทำการประกอบเข้าด้วยกันใหม่ (assembly) นำตัวอักษรที่แกะแล้วในแต่ละชิ้นของเส้นดีเอ็นเอมาประกอบเรียงกันใหม่จนกระทั่งได้ลำดับคู่เบสของดีเอ็นเอทั้งหมด

ปัจจุบันเรามีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอ (DNA sequence data) ของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดอย่างครบถ้วน แต่เราจะทำอย่างไรจึงจะบอกได้ว่าตรงส่วนไหนของดีเอ็นเอทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ทำให้นักวิทยาศาสตร์ต้องพึ่งคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศเพื่อตามให้ทันข้อมูลที่มีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว อินเทอร์เน็ตโดยเฉพาะอย่างยิ่ง World Wide Web ทำให้นักวิทยาศาสตร์สามารถเข้าถึงข้อมูลเหล่านั้นได้และนี่คือที่มาของศาสตร์อีกแขนงหนึ่งที่เรียกว่า Computation biology และถูกพัฒนาเรื่อยมาจนเป็นชีวสารสนเทศในปัจจุบัน

การค้นหาข้อมูลหรือซอฟต์แวร์บนอินเทอร์เน็ต โดยการใช้ฐานข้อมูลทางชีวภาพ ที่มีให้บริการต่อสาธารณะ (public biological databases) สามฐานหน่วยงานใหญ่ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

EMBL, <http://www.embl-heidelberg.de/>

DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอหรือลำดับกรดอะมิโน หรือโปรตีนจากการทดลองกับลำดับนิวคลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล โดยทำการเปรียบเทียบทีละคู่ (pairwise sequence alignment) โดยใช้ BLAST หรือ FASTA เพื่อทำการเปรียบเทียบทีละกลุ่ม (multiple sequence alignment) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนหรือโปรตีน เหล่านั้น โดยใช้ ClustalX, ClustalW หรือ Jalview เป็นต้น

2.5 การศึกษาผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ที่มีต่อปลวก *Termitidae* sp.

2.5.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลวก

ปลวกตัวแรกของโลกถือกำเนิดเมื่อประมาณ 220 ล้านปีมาแล้ว การขุดพบซากฟอสซิลของปลวก โดย E.M. Bordy แห่งมหาวิทยาลัย Witwatersrand ในแอฟริกาได้ทำให้นักชีววิทยาสัตว์ คึกคักบรรพบุรุษว่าปลวกโบราณมีรูปร่างที่คล้ายคลึงแมลงสาบปัจจุบันมาก แต่มีขนาดเล็กกว่า และมีผิวอ่อนนุ่มกว่า ถึงแม้โลกทุกวันนี้มีปลวกมากกว่า 2,000 ชนิด แต่ก็มีเพียงไม่กี่ชนิดที่ชอบอาศัยอยู่ในเนื้อไม้ของอาคารบ้านเรือน ซึ่งนับเป็นภัยต่อที่อยู่อาศัย เพราะปลวกจะกัดกินสรรพสิ่งที่ทำด้วยไม้จนหมด จากความแตกต่างของสภาพทางชีววิทยา นิเวศวิทยา และชีวิตความเป็นอยู่ รวมถึงอุปนิสัยในการสร้างรังและการกินอาหารของปลวกแต่ละชนิด สามารถจำแนกปลวกได้เป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ดังนี้

2.5.1.1 แบ่งตามประเภทของอาหาร และอุปนิสัยในการสร้างรัง สามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทดังนี้

- ปลวกกินเนื้อไม้ พบได้ทั้งชนิดที่สร้างรังอยู่ใต้พื้นดิน ชนิดสร้างรังขนาดเล็กอยู่บนดิน หรือบนต้นไม้ ซึ่งจัดเป็นปลวกใต้ดิน และบางชนิดอาศัยอยู่กินภายในเนื้อไม้ ที่เรียกว่าปลวกไม้แห้งหรือปลวกไม้เปียก

- ปลวกเพาะเลี้ยงเชื้อรา จะกินอาหารทั้งเนื้อไม้ เศษไม้ ใบไม้ และเชื้อราที่เพาะเลี้ยงไว้ภายในรัง พบทั้งชนิดที่สร้างรังอยู่ใต้พื้นดิน และสร้างรังขนาดกลาง ถึงขนาดใหญ่บนดิน

- ปลวกกินดิน และอินทรีย์วัตถุ พบได้ทั้งชนิดที่สร้างรังอยู่ใต้พื้นดิน และสร้างรังขนาดเล็กอยู่บนพื้นดิน

- ปลวกกินไลเคน ส่วนใหญ่พบสร้างรังบนดินบริเวณโคนต้นไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.2 แบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

ในกระบวนการกินและการย่อยอาหารปลวกจะไม่สามารถผลิตน้ำย่อยหรือเอนไซม์ออกมาย่อยอาหารได้เองแต่จะต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อาศัยร่วมอยู่ภายในระบบทางเดินอาหารของปลวก เช่น โปรโตซัว, แบคทีเรีย หรือเชื้อรา ให้ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพ เช่น เซลลูเลส และ ลิกโนเซลลูเลสออกมาย่อยเซลลูโลสและลิกนิน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารที่ปลวกกินเข้าไปให้เปลี่ยนเป็นพลังงานหรือสารประกอบในรูปที่ปลวกสามารถนำไปใช้ในการดำรงชีวิตได้ ทำให้สามารถแบ่งประเภทปลวกตามชนิดของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารได้เป็น 2 ประเภท

- ปลวกชั้นต่ำ ส่วนใหญ่เป็นปลวกชนิดที่กินเนื้อไม้เป็นอาหาร จะอาศัยโปรโตซัวซึ่งอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารช่วยในการผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยอาหาร สำหรับในประเทศไทยพบทั้งหมด 3 วงศ์ (family) คือ *Kalotermitidae*, *Termospsidae* และ *Rhinotermitidae*
- ปลวกชั้นสูง ส่วนใหญ่เป็นปลวกชนิดที่กินดิน ซากอินทรีย์วัตถุ ไลเคน รวมถึงพวกที่กินเศษไม้ ใบไม้ และเพาะเลี้ยงเชื้อราไว้เป็นอาหารจะมีวิวัฒนาการที่สูงขึ้นเพื่อปรับตัวให้อยู่รอดได้ในสภาพนิเวศที่แห้งแล้งหรือขาดอาหารได้ดี โดยอาศัยจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียหรือเชื้อราภายในระบบทางเดินอาหารทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์เพื่อช่วยย่อยอาหารให้กับปลวกซึ่งแบคทีเรียบางชนิดจะมีความสามารถในการจับธาตุไนโตรเจนจากอากาศมาสร้างเป็นกรดอะมิโนที่ปลวกสามารถนำไปใช้ในการดำรงชีวิตได้และบางชนิดมีความสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพืชบางอย่างที่สลายตัวได้ยากในสภาพแวดล้อม ในประเทศไทยพบปลวกชั้นสูงนี้อยู่ในวงศ์ *Termitidae*

2.5.2 ปลวกถูกจำแนกเป็น 7 วงศ์ (family) ด้วยกันคือ

2.5.2.1 *Mastotermidae* กลุ่มนี้มีปลวกชนิดเดียวคือ *Mastotermes darwiniensis* ซึ่งพบที่บริเวณป่าที่ไม่มีฝนทางเหนือของประเทศออสเตรเลีย เป็นปลวกที่มีขนาดใหญ่มาก วรรณะทหารของปลวกชนิดนี้มีความยาวมากกว่า 2 เซนติเมตร

2.5.2.2 *Hodotermitidae* เป็นปลวกที่ถูกจัดเข้าในกลุ่มโบราณของพวกหาคินบนผิวน้ำดิน กินหญ้าเป็นอาหาร เป็นพวกที่พบอาศัยอยู่ในทุ่งหญ้าสะวันนาจนถึงทุ่งหญ้าที่แห้งแล้งต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะไม่สร้างจอมปลวกเป็นที่อาศัย

2.5.2.3 *Termopsidae* ปลวกทุกชนิดในวงศ์นี้สร้างรังและกินอาหารในท่อนไม้ผู้เป็นปลวกที่อยู่ในลำดับต้นๆของสายวิวัฒนาการจัดเป็นปลวกโบราณอีกกลุ่มหนึ่งมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในแถบเอเชีย

2.5.2.4 *Kalotermitidae* ปลวกในวงศ์นี้หมายถึงปลวกไม้แห้งและรวมไปถึงปลวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม้ชื้น มีการพัฒนามาจากวงศ์ *Mastotermitidae*

2.5.2.5 *Rhinotermitidae* ปลวกในวงศ์นี้ทั้งหมดเป็นปลวกกินเนื้อไม้และมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางตลอดทั้งบริเวณเขตร้อนใกล้เส้นศูนย์สูตรและในเขตหนาว เป็นปลวกที่อาศัยอยู่ใต้ดิน ปลวกในสกุล *Coptotermes* และ *Reticulitermes* เป็นปลวกที่เป็นศัตรูสำคัญในทวีปเอเชีย อเมริกา และยุโรป

2.5.2.6 *Serritermitidae* ปลวกในวงศ์นี้พบมีปลวก *Serritermes serrifer* จากประเทศบราซิลเพียงชนิดเดียวเท่านั้นปลวกวงศ์นี้มีกรรมที่ผิดปกติทั้งในวรรณะสืบพันธุ์และวรรณะทหาร

2.5.2.7 *Termitidae* ปลวกในวงศ์นี้จัดเป็นปลวกวงศ์ที่ใหญ่ที่สุด ประกอบด้วยปลวกประมาณสามในสี่ของปลวกทั้งหมดที่พบอยู่ในโลกขณะนี้

2.5.3 ลักษณะทางชีววิทยาและวงจรชีวิตของปลวก

ลักษณะทางชีววิทยา ปลวกเป็นแมลงที่มีลักษณะความเป็นอยู่แบบสังคม มีการแบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นวรรณะต่าง ๆ กัน รูปร่างลักษณะของปลวกในแต่ละวรรณะไม่เหมือนกัน ในระบบสังคมของปลวกต่างชนิดกันจะมีการดำรงชีวิตที่ต่างกันออกไปและเป็นพื้นฐานของลักษณะทางชีววิทยา นิเวศวิทยา และวงจรชีวิตของปลวกแต่ละชนิดนั้น ๆ วรรณะต่าง ๆ ของปลวกโดยทั่วไปปลวกในแต่ละรังจะประกอบด้วยสมาชิก 3 วรรณะใหญ่คือ วรรณะทหาร วรรณะกรรมกร และวรรณะสืบพันธุ์ ทั้ง 3 วรรณะ อาศัยอยู่ร่วมกันภายในรังซึ่งมีการจัดระบบอย่างดีทุกวรรณะมีหน้าที่ในการดำรงชีวิตเฉพาะของตนเองซึ่งเกี่ยวข้องและเกี่ยวเนื่องกับหน้าที่ของวรรณะอื่น ๆ ในการดำรงชีวิตและการพัฒนาของประชากรในรังทั้งหมด ในการควบคุมวิถีชีวิตและการทำงานของปลวกแต่ละวรรณะ ถูกกำหนดในหลายสาเหตุด้วยกัน การแลกเปลี่ยนสารเคมีระหว่างปลวกแต่ละตัวภายในรังเดียวกันเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยควบคุมหน้าที่ต่างๆภายในรังให้ดำเนินไปตามภาระหน้าที่ของแต่ละวรรณะ ตามระบบของสังคมในปลวกแต่ละรัง

2.5.3.1 วรรณะทหาร (soldier) เป็นปลวกที่มีหน้าที่ในการป้องกันประชากรในวรรณะอื่นๆ จากศัตรูที่จะเข้ามาทำร้าย โดยทั่วไปจะเป็นพวกที่มีขนาดใหญ่กว่าปลวกวรรณะอื่นๆ มีหัวโตสีน้ำตาล กรามใหญ่ ยาวและแข็งแรง ใช้ในการต่อสู้กับศัตรู ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นมดชนิดต่างๆ ปลวกบางชนิดไม่มีกรรมกร แต่จะมีต่อมหรือท่ออยู่ที่ส่วนหัวซึ่งจะเป็นทางออกของสารเคมีซึ่งเป็นสารเหนียวๆ เพื่อใช้ต่อสู้กับศัตรูแทนกรรมกร

2.5.3.2 วรรณะกรรมกร (worker) เป็นปลวกที่พบจำนวนมากที่สุดในจอมปลวกแต่ละรัง มีหน้าที่หลายประการ เช่น เลี้ยงตัวอ่อน หาอาหาร สร้างและซ่อมแซมรัง ปลวกกรรมกรหรือบางครั้งเรียกว่าปลวกงานที่มีอายุต่างกันจะมีขนาดและหน้าที่ในการดำเนินงานที่ต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

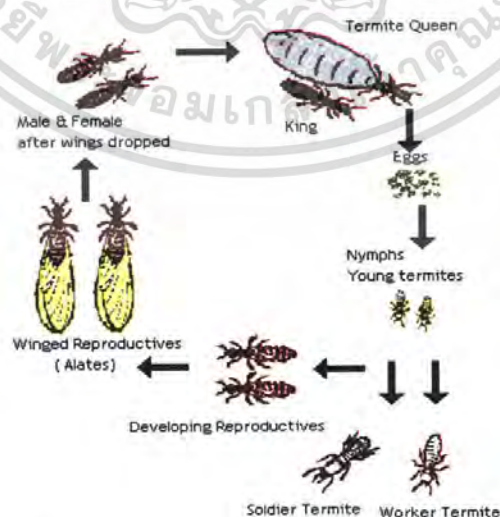
กันออกไป ปลวกกรรมกรเป็นปลวกที่ไม่มีปีก มีผนังลำตัวบางสีอ่อน เป็นวรรณะที่เราจะพบเห็นมากที่สุดเมื่อสำรวจพบการทำลายของปลวกเนื่องจากเป็นวรรณะเดียวที่ทำหน้าที่ในการทำลายไม้หรือวัสดุต่างๆ

2.5.3.3 วรรณะสืบพันธุ์ (reproductive) ประกอบด้วยปลวกที่มีรูปร่างลักษณะต่างกันไปตามช่วงระยะเวลาของการดำเนินชีวิตเช่น

แมลงเม่า เป็นปลวกวรรณะสืบพันธุ์ที่มีปีก ส่วนใหญ่ปีกจะมีขนาดยาวเป็นสองเท่าของลำตัว สีของลำตัวจะเป็นสีน้ำตาลอมเหลืองไปจนถึงสีดำ เมื่อคืนฟ้าอากาศเหมาะสมแมลงเม่าจะบินออกจากรังไปผสมพันธุ์กันและเริ่มสร้างรังใหม่

นางพญา และราชา เป็นแมลงเม่าที่ผสมพันธุ์กันแล้วสลัดปีกและสร้างรังอยู่ในดินหรือในไม้ ถ้าเป็นปลวกไม้แห้ง สำหรับนางพญาหรือราชินีปลวก เมื่อผสมพันธุ์แล้ว ส่วนท้องจะขยายใหญ่เพื่อใช้เป็นอวัยวะที่ไขเป็นที่เก็บไข่ซึ่งมีอยู่มากมายนับล้านฟอง เพื่อรอจังหวะที่จะวางไข่ต่อไป

การควบคุมการเกิดของปลวกวรรณะต่าง ๆ นั้น จะเกิดขึ้นเป็นวงจรดังภาพที่ 2.8 สันนิษฐานว่าเกิดขึ้นภายใต้การควบคุมของนางพญา ซึ่งจะผลิตสารเคมีหรือฮอร์โมนชนิดต่างๆ ออกมาทางรูขับถ่าย แต่ปลวกกรรมกรจะมาเลียสารนี้ แล้วเลียต่อ ๆ กันไปจนทั่วรัง รูปร่างลักษณะรวมทั้งการทำงานของปลวกที่ได้รับสารเคมีจากนางพญาก็จะถูกควบคุมให้เป็นไปตามความต้องการในการพัฒนาการดำรงชีวิตของปลวกในแต่ละรัง (<http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/anatomy/bug.htm>)



ภาพที่ 2.8 แสดงวัฏจักรการดำรงชีวิตของปลวก

(ภาพจาก http://www.ipst.ac.th/ThaiVersion/publications/in_sci/termite.html)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ประเทศจีนได้มีการค้นพบสายพันธุ์ใหม่ของเชื้อ *M. anisopliae* และได้มีการตั้งชื่อว่า *M. anisopliae* var. *dcjhtium* โดยได้จากปลวกที่อาศัยอยู่ใต้ดิน *Odontotermes formosanus* ซึ่งพบได้บริเวณภูเขา Loujia ในประเทศจีน ซึ่งเชื้อราที่มีความรุนแรงสูงและตัวปลวกต้านเชื้อราได้น้อยที่สุด โดยในการศึกษากครั้งนี้ได้นำสายพันธุ์ใหม่ที่ค้นพบ มาทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ ของเชื้อ *M. anisopliae* ไอโซเลตอื่น ๆ อีก 4 ไอโซเลต ส่วนการวิเคราะห์ทางชีวภาพนั้นได้มีการนำปลวกที่อาศัยอยู่ใต้ดิน (*O. formosanus*) มาเป็นตัวอย่างของการทดลอง โดยทำการเปรียบเทียบความรุนแรงของการเกิดโรคซึ่งการวิเคราะห์นี้มีทั้งทางด้านชีวเคมีและชีวโมเลกุลรวมทั้งมีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์กันของเชื้อรา *M. anisopliae* อีก 4 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ *M. anisopliae* var. *dcjhtium* ด้วย (Changjin และคณะ, 2007)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในโรงงานพิเศษ

3.1.1 อุปกรณ์

- 3.1.1.1 จานแก้วทดลอง
- 3.1.1.2 หลอดทดลองขนาด 25 มิลลิลิตร
- 3.1.1.3 หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 3.1.1.4 หลอดทดลองขนาด 2 ไมโครลิตร
- 3.1.1.5 เข็มเขี่ยเชื้อ และ ทัพ
- 3.1.1.6 เครื่องเขย่า
- 3.1.1.7 เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์
- 3.1.1.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ DNA E-Z KIT
- 3.1.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 3.1.1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.1.11 ตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียส และ อุณหภูมิห้อง
- 3.1.1.12 Haemocytometer (คู่มือการใช้ในภาคผนวก ก.)
- 3.1.1.13 เครื่องเทอร์โมไซเคิล (เครื่อง PCR)
- 3.1.1.14 โกร่งและที่บด
- 3.1.1.15 ขวดคูเรนซ์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- 3.1.1.16 ตู้เขี่ยเชื้อ

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด
- 3.1.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (คู่มือการเตรียมที่ภาคผนวก ค.)
 - 3.1.2.2.1 Potato Dextrose Agar (PDA)
 - 3.1.2.2.2 Potato Dextrose Broth
 - 3.1.2.2.3 Water Agar (WA)
 - 3.1.2.2.4 DG 18
- 3.1.2.3 สีย้อมแลคโตฟีโนลคอตตอนบลู (lactophenol cotton blue)
- 3.1.2.4 สารละลาย tween 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.2.5 สารละลาย EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) พีเอช 8
- 3.1.2.6 สารละลายผสม Chloroform : Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 1:4)
- 3.1.2.7 สารละลาย Isopropanol
- 3.1.2.8 สารละลาย 80% Ethanol
- 3.1.2.9 สารละลายบัฟเฟอร์ TBE (Tris Boric acid disodium EDTA)
- 3.1.2.10 สีย้อม (dye)
- 3.1.2.11 ฟูโนอะกาโรส
- 3.1.2.12 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethylidium bromide)

3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium* sp.

3.2.2.1 ทำการศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหาร 2 ชนิด คือ PDA และ DG 18 โดยทำการเย็บเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในจานแก้วทดลองที่มีอาหารแต่ละชนิดอยู่ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 18-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แล้วสังเกตลักษณะการเจริญเติบโต ลักษณะสีของเส้นใย และสีของสปอร์

โดยเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตได้รับมาจากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืช โดยชีววินทรีย์แห่งชาติซึ่งมีรหัสและที่มาดังนี้

MA 010	ใช้ในการควบคุมปลวก
MA 012	ใช้ในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย
MA 013	ใช้ในการควบคุมด้วงหมัดผัก
MA 014	ค้นพบจากดินจังหวัดกาญจนบุรี
MA 015	ได้รับมาจากกรมส่งเสริมการเกษตร

3.2.2..2 การศึกษาลักษณะของสปอร์ ทำการศึกษาลักษณะของสปอร์โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตบนอาหาร PDA โดยทำการเย็บเชื้อที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในจานแก้วทดลองที่มีอาหาร PDA นำกระดาษปิดสไลด์ที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วไปปักบนวุ้นทำมุม 45 องศา แล้วทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิประมาณ 18-30 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำกระดาษปิดสไลด์ไปย้อมด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู (Lactophenol cotton blue) แล้วส่องดูลักษณะสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3 คัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp.

ทำการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp. 5 ไอโซเลตจากห้องทดลองเพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ และเก็บตัวอย่างต่างๆ จากธรรมชาติเช่น ดิน ซากแมลง เพื่อคัดแยกเชื้อ จากนั้นนำมาทำการคัดแยก ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

3.3.1 การคัดแยกเชื้อราจากดิน

3.3.1.1 นำตัวอย่างดินหนักปริมาณ 1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นที่ผสม tween 80 (คู่มือการเตรียมที่ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่า ผสมให้เข้ากับ

3.3.1.2 ทำการเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4}

3.3.1.3 คุตสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ DG18 และ WA โดยทำ 2 ซ้ำ

3.3.1.4 นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องสังเกตลักษณะของเชื้อราที่ขึ้นบนอาหาร เพาะเลี้ยงว่ามีเชื้อราโคโลนีใดที่มีลักษณะเหมือนเชื้อราที่ต้องการ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA และส่องดูลักษณะสปอร์

3.3.2 การคัดแยกเชื้อราจากแมลง

3.3.2.1 หยคน้ำกลั่นที่ทำการนิ่งฆ่าเชื้อลงบนสไลด์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

3.3.2.2 ให้ลูบเผาไฟตะแคงเชื้อราที่อยู่บนตัวแมลง จากนั้นนำลูบมาเขียนบนน้ำกลั่นที่อยู่บนสไลด์เพื่อละลายสปอร์ที่ติดมา

3.3.2.3 ใช้ลูบเผาไฟตะแคงที่สารละลายบนสไลด์ จากนั้นนำไป streak plate ลงบนอาหาร 2 ชนิด คือ DG18 และ WA โดยทำ 2 ซ้ำ

3.3.2.4 คุตสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรไปทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคือ DG18 และ WA โดยทำ 2 ซ้ำ

3.3.2.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องสังเกตลักษณะของเชื้อราที่ขึ้นบนอาหารเพาะเลี้ยงว่ามีเชื้อราโคโลนีใดที่มีลักษณะเหมือนเชื้อราที่ต้องการ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA และส่องดูลักษณะสปอร์

3.4 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

เมื่อได้เชื้อ *Metarhizium* sp. ที่บริสุทธิ์แล้วจะนำมาเลี้ยงในงานแก้วทดลองที่ใส่อาหาร PDA โดยทำการเขี่ยเชื้อวางที่จุดกลางของงานแก้วทดลองเพื่อให้ได้เชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงทำการเจาะโคโลนีของเชื้อ *Metarhizium* sp. ด้วย cock borer บริเวณเส้นผ่าศูนย์กลางที่เท่า ๆ กันมาวางบนงานแก้วทดลองที่ใส่อาหาร PDA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 25, 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส) โดยในการบ่มนั้นจะบ่มทั้งแบบคว่ำงานแก้วทดลองและหงายงานแก้วทดลอง เพื่อทดสอบว่าการคว่ำงานแก้วทดลองและการหงายงานแก้วทดลอง จะส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราหรือไม่ จากนั้นจึงสังเกตการเจริญของเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยการวัดขนาดรัศมีของโคโลนี และสังเกตการเจริญของเชื้อเพื่อทำการเปรียบเทียบว่าในอุณหภูมิใดที่เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่สุด

3.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.5.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

3.5.1.1 นำเชื้อ *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลตที่บริสุทธิ์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใส่อาหาร PDB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วเขี่ยสปอร์ของเชื้อมา 1 ลูก จากนั้นนำมาบ่มในอุณหภูมิห้องด้วยเครื่องเขี่ยที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-7 วัน สังเกตว่าเส้นใยของเชื้อเจริญเป็นแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด DNA E-Z KIT โดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.5.1.2 เขี่ยเส้นใยเชื้อราใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างเส้นใยโดยการเติมสารละลาย EDTA พีเอช 8 เข้มข้น 25 มิลลิโมล ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเขย่า

3.5.1.3 ดูดสารละลาย EDTA ทั้ง (ทำซ้ำข้อ 1 – 2 จำนวน 3 รอบ)

3.5.1.4 เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าเพื่อล้างเส้นใยเชื้อราให้สะอาด

3.5.1.5 ดูดน้ำกลั่นทิ้งทำการแยกเส้นใยเชื้อราใส่โกร่งและทำการบดเส้นใยโดยใช้ไนโตรเจนเหลว

3.5.1.6 ตักเส้นใยที่บดเป็นผงแล้วใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 มิลลิกรัม

3.5.1.7 เติมหัมพ์เฟอร์ DA ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตรและหัมพ์เฟอร์ DB ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ปริมาตร 40 ไมโครลิตร เขย่านาน 10 วินาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.8 นำหลอดทดลองไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที

3.5.1.9 เดิมสารละลายผสม Chloroform : Isoamyl alcohol (อัตราส่วน 1:4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่านาน 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

3.5.1.10 คูตสารละลายชั้นบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมานานาน 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.5.1.11 คูตสารละลายทิ้งแล้วใส่ 80% Ethanol ที่เย็น ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

3.5.1.12 คูตสารละลายทิ้งแล้วนำดีเอ็นเอไปทำให้แห้งโดยการนำไปไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วให้นำมาละลายใน TE บัฟเฟอร์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร

3.5.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR

3.5.2.1 เตรียม Master mix ใส่ลงใน หลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร

- ไพรเมอร์ (20 พิโคโมล/ไมโครลิตร) 2 ชนิด

ITS 1 (42 นาโนโมล/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร

มีลำดับเบสดังนี้ 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'

ITS 4 (64 นาโนโมล/มิลลิลิตร) 1 ไมโครลิตร

มีลำดับเบสดังนี้ 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'

- Mix dNTPs (1.25 มิลลิโมล) 4 ไมโครลิตร

- MgCl₂ 1.5 ไมโครลิตร

- 10 X PCR บัฟเฟอร์ 2.5 ไมโครลิตร

- Tag ดีเอ็นเอพอลิเมอร์เรส 0.2 ไมโครลิตร

3.5.2.2 คูตสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร ตามลำดับดังนี้

- Master mix 10.2 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง

- DI water ตามที่คำนวณได้ใส่จนครบ 20 ไมโครลิตร (โดยลบออกจาก ปริมาตร master mix และ ปริมาตรดีเอ็นเอ)

- ดีเอ็นเอตัวอย่างเข้มข้น 1000 นาโนกรัม

3.5.2.3 นำเข้าเครื่องเทอร์โมไซเคิลโดยใช้สภาวะในการทำ PCR ดังตารางที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แสดงสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา PCR ในแต่ละขั้นตอน

ปฏิกิริยาในแต่ละขั้น	อุณหภูมิและเวลา	จำนวนรอบ
Initiation Denaturing Step	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	1
Denaturing Step	94 องศาเซลเซียส 1 นาที30วินาที	} 35
Annealing Step	55 องศาเซลเซียส 2 นาที	
Extention Step	72 องศาเซลเซียส 3 นาที	
Final Extention Step	95 องศาเซลเซียส 5 นาที	1

3.5.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP

3.5.3.1 การเตรียม Master Mix

- DI water	12.3	ไมโครลิตร
- 10X บัฟเฟอร์	2.0	ไมโครลิตร
- bovine serume albumine	0.2	ไมโครลิตร
- เอนไซม์ตัดจำเพาะดังตารางที่ 3.2	0.5	ไมโครลิตร

3.5.3.2 แบ่ง Master Mix ใส่หลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตรและเติมผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอปริมาตร 3 ไมโครลิตรแล้วนำไปเขย่าให้เข้ากัน

3.5.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดตามตารางที่ 3.2

3.5.3.4 หยุดปฏิกิริยาโดยนำหลอดตัวอย่างไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิและเวลาตามตารางที่ 3.2 ตามที่กำหนดของแต่ละเอนไซม์

3.5.3.5 นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP ไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ตารางที่ 3.2 แสดงรายชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นำมาใช้ในการทดลองพร้อมสภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด

ชื่อเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา(องศาเซลเซียส)	บัฟเฟอร์ที่เหมาะสม
<i>Alu I</i>	Vivantis	37	65 °C นาน 20 นาที	V5
<i>BamH I</i>	Vivantis	37	65 °C นาน 20 นาที	V2
<i>Bgl II</i>	Vivantis	37	-	V4
<i>EcoR I</i>	Vivantis	37	65 °C นาน 20 นาที	บัฟเฟอร์ <i>EcoR I</i>
<i>Hae III (Bsn I)</i>	Vivantis	37	80 °C นาน 20 นาที	V4
<i>Hha I (AspLE I)</i>	Vivantis	37	-	V3
<i>Hpa II (Msp I)</i>	Vivantis	37	-	V5
<i>Sac I (Psp124B I)</i>	Vivantis	37	65 นาน 20 นาที	V1
<i>Tag I</i>	Vivantis	65	-	V5
<i>Hind III</i>	Promega	37	65 นาน 15 นาที	บัฟเฟอร์ <i>Hind III</i>
<i>Pst I</i>	Promega	37	65 นาน 15 นาที	บัฟเฟอร์ <i>Pst I</i>
<i>BstE I</i>	GibcoBRL	65	65 นาน 10 นาที	บัฟเฟอร์ <i>BstE I</i>

(- หมายถึงไม่มีอุณหภูมิที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา)

3.5.4 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.5.4.1 เตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1% ใน 1X บัฟเฟอร์ TBE (Tris Boric acid disodium EDTA)

3.5.4.2 เตรียมทำ Mater Mix

- | | | |
|----------------------------------|---|-----------|
| - ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ RFLP | 3 | ไมโครลิตร |
| - สีย้อม (dye) | 1 | ไมโครลิตร |
| - น้ำ DI | 5 | ไมโครลิตร |

3.5.4.3 ทำการใส่ตัวอย่างลงในช่องรู้อะกาโรส

3.5.4.4 ข้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethyldium bromide) นาน 3-5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.5 ล้างน้ำนาน 10-30 นาที

3.5.4.6 นำไปส่องดูด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตทำการถ่ายรูป บันทึกผล และคำนวณหาขนาดดีเอ็นเอเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder)

3.5.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ได้มีการส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการหาลำดับเบส โดยส่งไปที่ศูนย์พันธุ - วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และจะมีการตรวจทานและตรวจสอบความถูกต้องของ ลำดับเบสของ ITS1-5.8S-ITS2 ที่ได้จากการหาลำดับเบส โดยผู้ทำการทดลองจะทำการตรวจสอบ ลำดับเบสที่เครื่องอ่านลำดับเบสไม่สามารถอ่านได้ (N)

3.5.5.1 ใช้โปรแกรม BioEdit ทำการเรียงเรียงและจัดตำแหน่งของลำดับเบสที่ได้

3.5.5.2 ใช้โปรแกรม Clustal X ในการเปรียบเทียบความแตกต่าง (alignment) ของ ลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตกับเชื้อราอื่น ๆ ทั้งในสายพันธุ์

3.5.5.3 ใช้โปรแกรม BLAST ของ NCBI วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้เพื่อตรวจสอบ ความสัมพันธ์กันของลำดับเบสในแต่ละสายพันธุ์

3.5.5.4 ใช้ของโปรแกรม PHYLIP ในการสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทาง พันธุกรรมของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลงสายพันธุ์ *Metarhizium* sp., *Beauveria bassiana* และ *Cordyceps brongniartii*

3.6 การทดสอบผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ที่มีต่อปลวก *Termitidae* sp.

3.6.1 นำกระดาษทิชชูวางลงในจานแก้วทดลองจากนั้นใส่ขี้เลื่อยที่ฆ่าเชื้อแล้วลง บนกระดาษทิชชูจากนั้นจึงนำปลวกมาใส่ลงในจานทดลองจานละ 10 ตัว นำสำลีจุ่มน้ำกลั่นมาวาง ที่มุมใดมุมหนึ่งของจานทดลองแล้วนำไปเลี้ยงในกล่องกระดาษ ทำการเลี้ยงเป็นเป็น 2 วันเพื่อให้ ปลวกปรับสภาพให้เข้ากับภาชนะที่ใช้เลี้ยง

3.6.2 นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเอียง (slant) เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 20 วันที่เลี้ยงที่ อุณหภูมิห้อง ใส่น้ำกลั่นที่ผสม tween 80 ลงในหลอดทดลองแล้วใช้รูปเจียให้สปอร์กระจายตัว

3.6.3 จากนั้นจึงย้ายสารละลายมาใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ นำหลอดทดลองไป เขย่าให้สปอร์กระจายตัวให้ทั่วในสารละลาย จากนั้นนำมาทำการเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3}

3.6.4 ทำการนับจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer ที่ความเข้มข้นของ สารละลายสปอร์ที่อัตราเจือจาง 10^{-3} เนื่องจากจะมีจำนวนสปอร์ที่สะดวกในการนับจำนวน จากนั้นจึงนำจำนวนสปอร์ที่นับได้มาคำนวณหาปริมาณสปอร์ต่อสารละลาย 1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.5 นำสารละลายสปอร์มาทำการใส่ลงในจานทดลองโดย MA010, MA012 และ MA014 นั้นทดสอบโดยไม่ทำการเจือจาง เนื่องจากจากการทดสอบการติดเชื้อราในปลวกของทั้ง 3 ไอโซเลตนี้พบน้อยมากเมื่อเทียบกับอีก 2 ไอโซเลต ส่วนใน MA013 และ MA015 ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นสูงสุดและเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ในจานทดลองควบคุมนั้นจะใส่น้ำกลั่นผสม tween 80 โดยทุกการทดสอบจะใช้ปริมาตรสารละลาย 600 ไมโครลิตร

3.6.6 ทำการตรวจสอบผลโดยนับจำนวนปลวกที่ตายในวันที่ 4 และ 7 โดยจะทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium* sp.

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Metarhizium* sp. บนอาหาร PDA จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์ไปปักบนวุ้นให้เอียงทำมุม 45 องศา แล้วให้เส้นใยเชื้อราเจริญไปบนกระจกปิดสไลด์จะใช้เวลาประมาณ 10 วัน จากนั้นนำกระจกปิดสไลด์มาข้อมด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอลคอตตอนบลู แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า มีลักษณะดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ที่กำลังขยาย 40 เท่า : A คือ

MA010, B คือ MA012, C คือ MA013, D คือ MA014 และ E คือ MA015

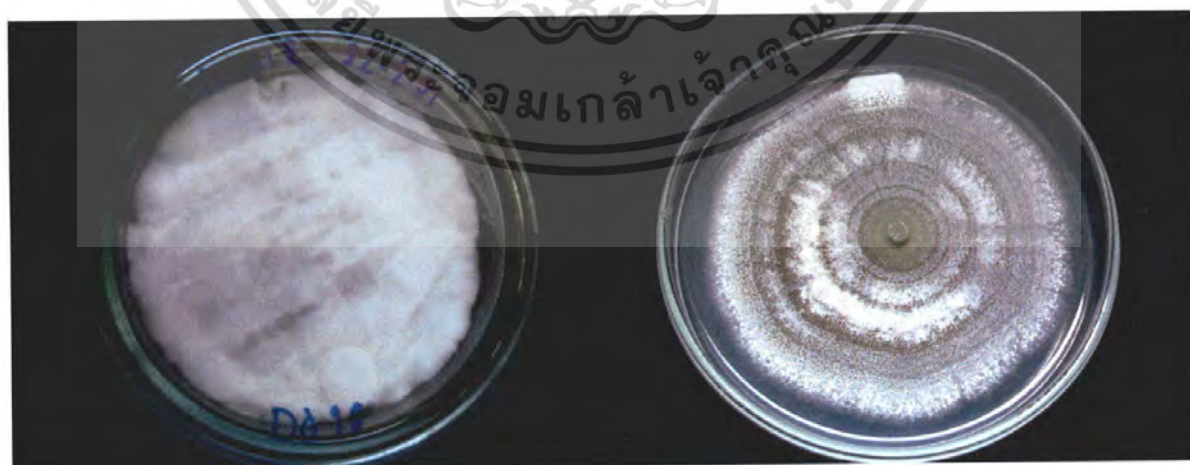
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าลักษณะของสปอร์ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. มีลักษณะยาว รี คล้ายเมล็ดข้าวสาร และเส้นใยเป็นเส้นใยแบบมีผนังกัน (septate hypha)

นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของเส้นใยและสปอร์ โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลตในอาหาร 2 ชนิด คือ DG18 และ PDA โดยทำการเพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิห้องซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าจะมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่าง กันอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในภาพที่ 4.2 – 4.6



ภาพที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MA 010 บนอาหาร DG 18 (ซ้าย) และ PDA (ขวา) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MA 012 บนอาหาร DG 18 (ซ้าย) และ PDA (ขวา) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง

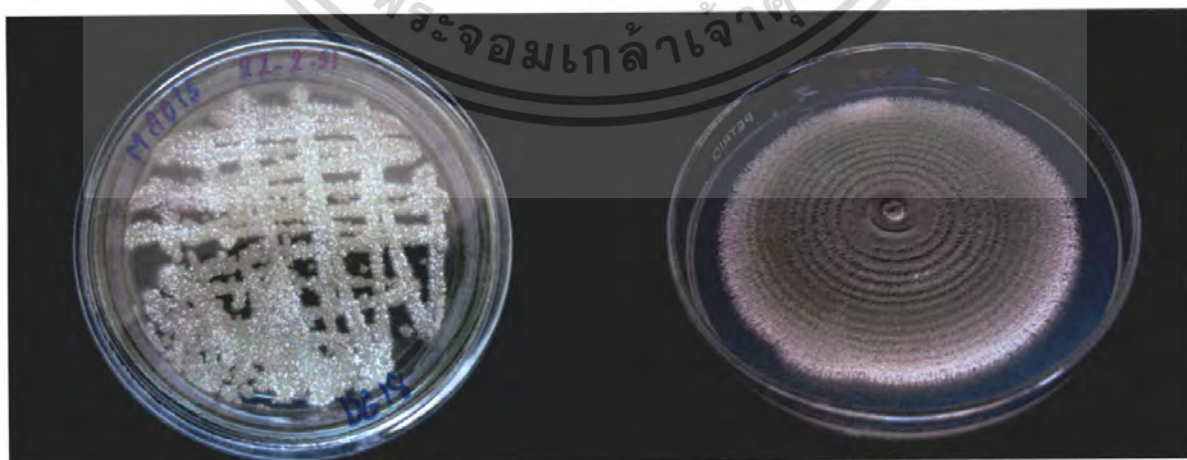
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MA 013 บนอาหาร DG 18 (ข้าว) และ PDA (ขบว) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MA 014 บนอาหาร DG 18 (ข้าว) และ PDA (ขบว) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ 4.6 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราไอโซเลต MA 015 บนอาหาร DG 18 (ข้าว) และ PDA (ขบว) เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะพบว่าลักษณะของเส้นใยโดยเฉพาะสีของเส้นใยเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหาร ที่แตกต่างกัน จะมีสีที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด เช่น MA 015 พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร PDA จะสร้างสปอร์สีเข้มกว่าเลี้ยงบนอาหาร DG 18 นอกจากนี้ลักษณะของเส้นใยของเชื้อรา เช่น ใน MA 010 และ MA 012 จะพบว่าเส้นใยมีลักษณะฟูกว่าปกติและจะสามารถมองเห็นสปอร์ได้หลังจากทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร DG18 ไปแล้วนาน 2 สัปดาห์ ซึ่งแตกต่างจากบนอาหาร PDA ซึ่งหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเพียง 1 สัปดาห์ก็จะสามารถมองเห็นสปอร์ของเชื้อราได้ชัดเจน ซึ่งสาเหตุของความแตกต่างนี้เกิดจากปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา ทำให้มองเห็นแตกต่างกันออกไป ส่วนในเชื้อรา MA 013 นั้น เกิดการสร้างสารสีเหลืองบนอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งพบว่าถ้าเลี้ยงบนอาหาร DG 18 เชื้อรา MA 013 สามารถสร้างสารสีเหลืองได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหาร PDA

ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Farooq และคณะ (2005) ที่ทำการทดลองให้เห็นว่าการผลิตสปอร์ของเชื้อรา *M.anisopliae* ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา และปริมาณสารอาหารที่ได้รับซึ่งจะไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราเหมือนกับที่การเพิ่มขึ้นของอัตราการเจริญของเชื้อราไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณสปอร์ของเชื้อรา และยังพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* จะให้ปริมาณสปอร์สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหาร PDA และจะมีอัตราการเจริญสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่ 35 ต่อ 1 ซึ่งจะเหมือนกันปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA (Sabouraud dextrose Agar)

และในการทดลองของ ทิพย์วดี และคณะ (2546) พบว่า เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ที่เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีลักษณะการเจริญของโคโลนีที่แตกต่างกัน ทั้งในด้านรูปร่าง ลักษณะความด้านหรือมัน เรียบหรือขรุขระของผิวหน้าของโคโลนี สีของโคโลนี ความหนาแน่นของการสร้างเส้นใยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และการพองฟูหรือยุบลงของโคโลนีเมื่อมีอายุมากขึ้น เชื้อรา *M. anisopliae* ทุกสายพันธุ์มีลักษณะของโคโลนีคล้ายกัน คือ สร้างโคโลนีที่แน่นเห็นเป็นรอยหยักลึกลงในอาหารเลี้ยงผิวหน้าไม่ฟู สร้างสปอร์สีขาวในระยะแรก แล้วเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มขึ้นเรื่อยๆ จนเป็นสีเขียวเข้มอมน้ำตาล โดยจะเริ่มสร้างสปอร์ตรงศูนย์กลางของโคโลนีก่อน แล้วจึงขยายไปรอบๆ โดยที่แต่ละสายพันธุ์เจริญได้ช้าและเร็วต่างกันอย่างเห็นได้ชัดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน

4.2 คัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp.

ทำการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp. 5 ไอโซเลตจากห้องทดลองทำให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ โดยได้มีการกำหนดรหัสของแต่ละไอโซเลตเพื่อให้ง่ายต่อการนำมาทำการทดลอง ดังนี้

MA 010	ใช้ในการควบคุมปลวก
MA 012	ใช้ในการควบคุมด้วงหนวดยาวอ้อย
MA 013	ใช้ในการควบคุมด้วงหมัดผัก
MA 014	ค้นพบจากดินจังหวัดกาญจนบุรี
MA 015	ได้รับมาจากกรมส่งเสริมการเกษตร

ในการเก็บตัวอย่างต่างๆ จากธรรมชาติ เช่น ดิน, ซากแมลง เพื่อคัดแยกเชื้อซึ่งได้ทำการทดลองกับตัวอย่างดินและแมลงตามตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงผลการคัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากธรรมชาติ

ลำดับ	รหัส	ชนิดของแหล่งที่มา	แหล่งที่มา
1	SD 03	ดิน	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จุดที่ 1 จ.กาญจนบุรี
2	SD 04	ดิน	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จุดที่ 2 จ.กาญจนบุรี
3	SD 09	ดิน	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จุดที่ 7 จ.กาญจนบุรี
4	SD 10	แมลงมด	เส้นทางศึกษาธรรมชาติชั้น 3 ไปชั้น 1 จ.กาญจนบุรี
5	SE 01	ดิน	จ.ราชบุรี
6	IB001	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเด็ยวคาย จุดที่ 1 จ.นครนายก
7	IB 002	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเด็ยวคาย จุดที่ 2 จ.นครนายก
8	IB 003	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ หอดูสัตว์ เขาใหญ่ จ.นครนายก
9	IB 004	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ ผาเด็ยวคาย จุดที่ 3 จ.นครนายก
10	IB 005	แมลง	เส้นทางศึกษาธรรมชาติ เขาใหญ่ จ.นครนายก

ซึ่งผลการทดลองคัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากธรรมชาตินั้นทั้งจากตัวอย่างดินและแมลงยังไม่พบเชื้อ *Metarhizium* sp.

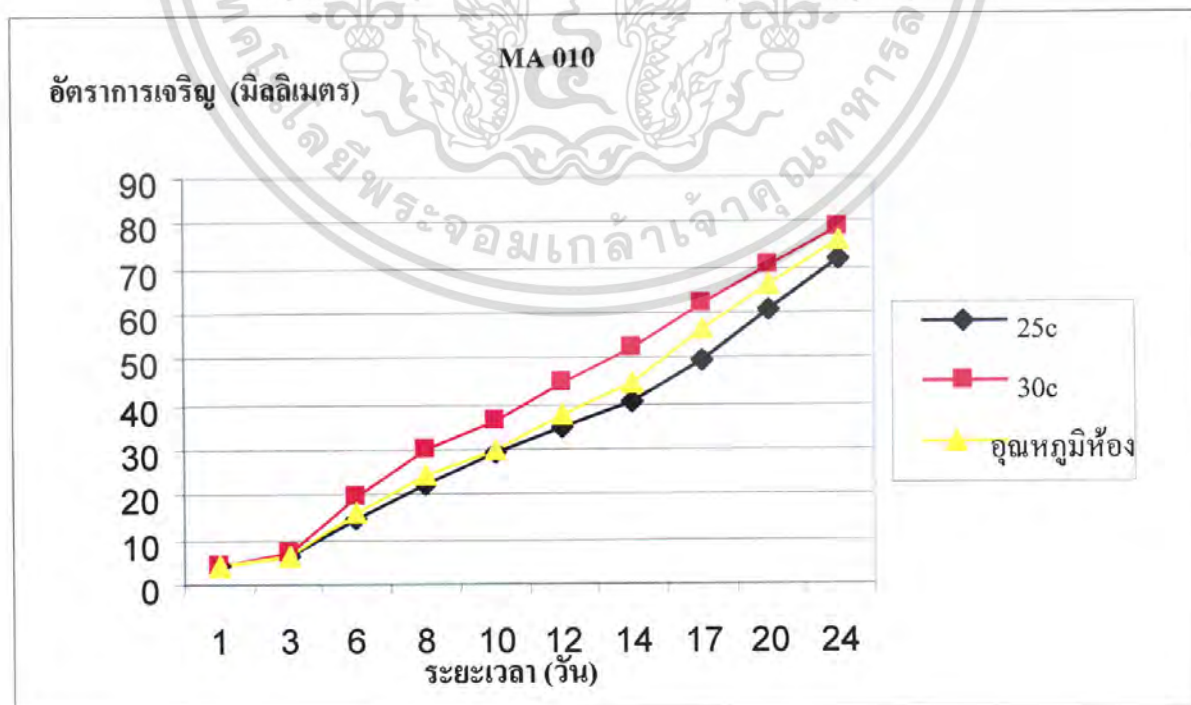
4.3 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

นำเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่บริสุทธิ์แล้วมาเลี้ยงในงานแก้วทดลองที่ใส่อาหาร PDA โดยทำการเชื่อมต่อวางที่จุดกลางของงานทดลองเพื่อให้ได้เชื้อที่เจริญเป็น โคลนเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วจึงทำการเจาะโคลนของเชื้อ *Metarhizium* sp. ด้วย cock borer เบอร์ 2 บริเวณเส้นผ่าศูนย์กลางที่เท่าๆ กันมาวางบนงานทดลองที่ใส่อาหาร PDA และนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กัน 25, 30 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส)

การเจริญของเชื้อ ไอโซเลต MA 010 นั้นเริ่มแรกเชื้อจะเจริญเป็นเส้นใยสีขาวบางๆ กระจายรอบชิ้นวัสดุที่นำไปวางและเมื่อเส้นใยมีอายุมากขึ้นก็จะเริ่มสร้างสปอร์ โดยสปอร์จะเริ่มเจริญจากวงใน เริ่มพบได้ในวันที่ 6 ของการเจริญโดยใน 3 อุณหภูมิ 3 ระดับ มีระยะเวลาในการสร้างสปอร์ที่ใกล้เคียงกันแต่มีลักษณะการเจริญที่แตกต่างกัน โดยในอุณหภูมิ 25, 30 องศาเซลเซียสนั้นมีการสร้างเส้นใยที่พูนหนาคล้ายลำต้ และมีการสร้างสปอร์เป็นบางบริเวณ โดยในบริเวณที่มีการสร้างสปอร์จะมีการเจริญของเส้นใยไม่หนามากนัก ส่วนในอุณหภูมิห้องนั้นการเจริญของเส้นใยไม่พูนหนาและมีการสร้างสปอร์มากกว่าในอุณหภูมิต่ำๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.13 ส่วนในการเปรียบเทียบการเจริญในแบบแก้วงานทดลองและหางงานทดลองนั้นอัตราการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน ที่สังเกตได้พบเพียงการเกิดไอน้ำที่ฝางานทดลองในการเจริญแบบหางงานทดลอง และการย่อยลงมาของเส้นใยในแบบแก้วงานทดลองที่ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งในการทำการทดลองนั้น ควรทำการทดลองแบบหางงานทดลองเพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตลักษณะสปอร์และง่ายต่อการวัดอัตราการเจริญเติบโตลักษณะต่างๆ ที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่านั้น เส้นใยจะมีสีขาวฟู และมีสปอร์สีเขียวแกมน้ำตาล ไม่พบการเปลี่ยนสีของอาหาร และไม่มีกลิ่น และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา MA 010 นั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.2 และกราฟแสดงการเปรียบเทียบที่ 3 อุณหภูมิดังภาพที่ 4.7

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA010 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

MA 010			
วันที่	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตร)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิห้อง
1	3.90	3.90	3.90
3	6.50	6.84	6.58
6	14.95	19.23	15.81
8	22.39	30.03	24.09
10	29.16	36.57	30.33
12	34.98	44.41	37.50
14	40.81	52.25	44.68
17	49.88	62.21	56.68
20	61.01	70.34	66.04
24	71.87	78.58	76.20



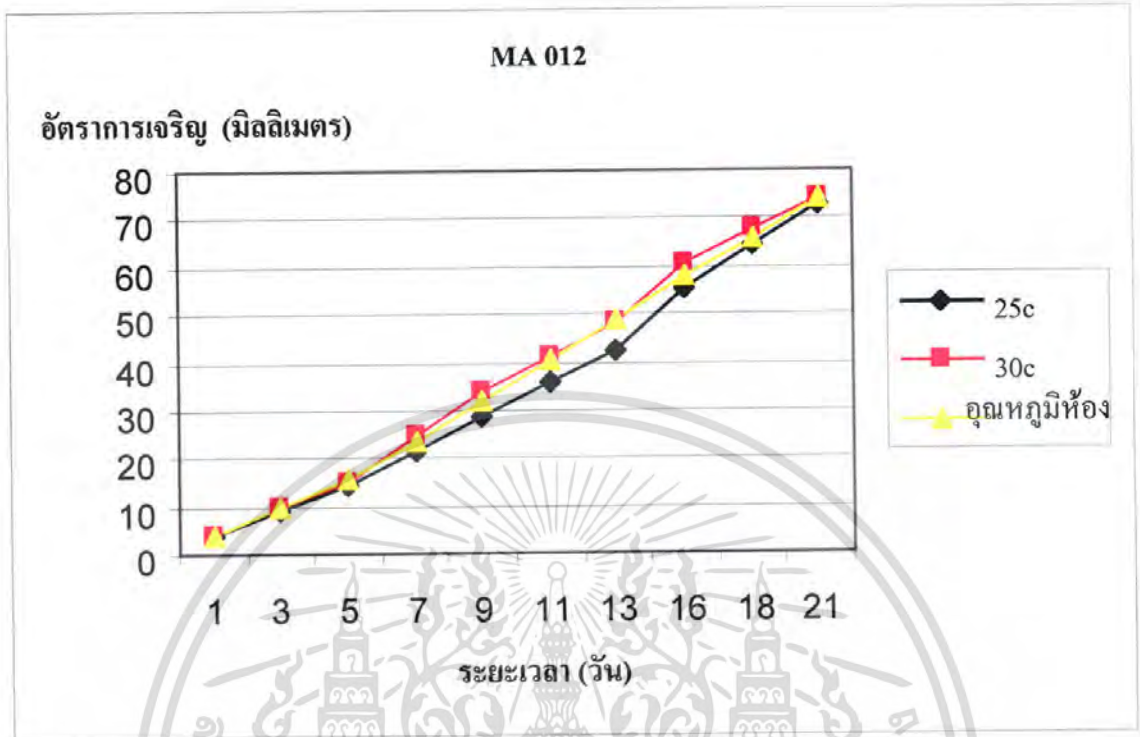
เอกสารนี้เป็น **ภาพที่ 4.7** กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 010 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ การค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อไอโซเลต MA012 นั้น มีลักษณะของเส้นใยสีขาวฟูและมีการสร้างสปอร์ สีเขียวแก่ม่าน้ำตาล โดยการเจริญจะเริ่มจากการสร้างเส้นใยสีขาว และในวันที่ 5 พบการสร้างสปอร์ จากจุดที่เส้นใยมีอายุมากที่สุด ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจะมีการเจริญของเส้นใยฟูหนาจนจน ทำให้การสร้างสปอร์นั้นทำได้น้อย รองลงมาคือที่ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องนั้นมีการสร้างเส้นใยน้อยแต่มีการสร้างสปอร์มากและหนาแน่น การเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA 012 นั้นสีของอาหารไม่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในภาพที่ 4.14 และในการเปรียบเทียบการเจริญในแบบคว่ำ และหงายจานทดลองนั้น ไม่มีความแตกต่างกันในอัตราการเจริญ แต่มีความแตกต่างทางด้านลักษณะการเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเส้นใยเจริญฟูขย้อยลงมาที่ฝาจานทดลองในการเจริญแบบคว่ำจานทดลอง และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา MA 012 นั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.8

ตารางที่ 4.3 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA012 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

MA 012			
วันที่	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตร)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิห้อง
1	3.9	3.9	3.9
3	9.18	9.48	9.61
5	14.46	15.06	15.32
7	21.6	24.43	23.68
9	28.74	33.81	32.04
11	35.56	41.05	40.56
13	42.38	48.29	49.09
16	55.29	60.72	57.64
18	64.16	67.56	65.96
21	73.03	74.41	74.28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



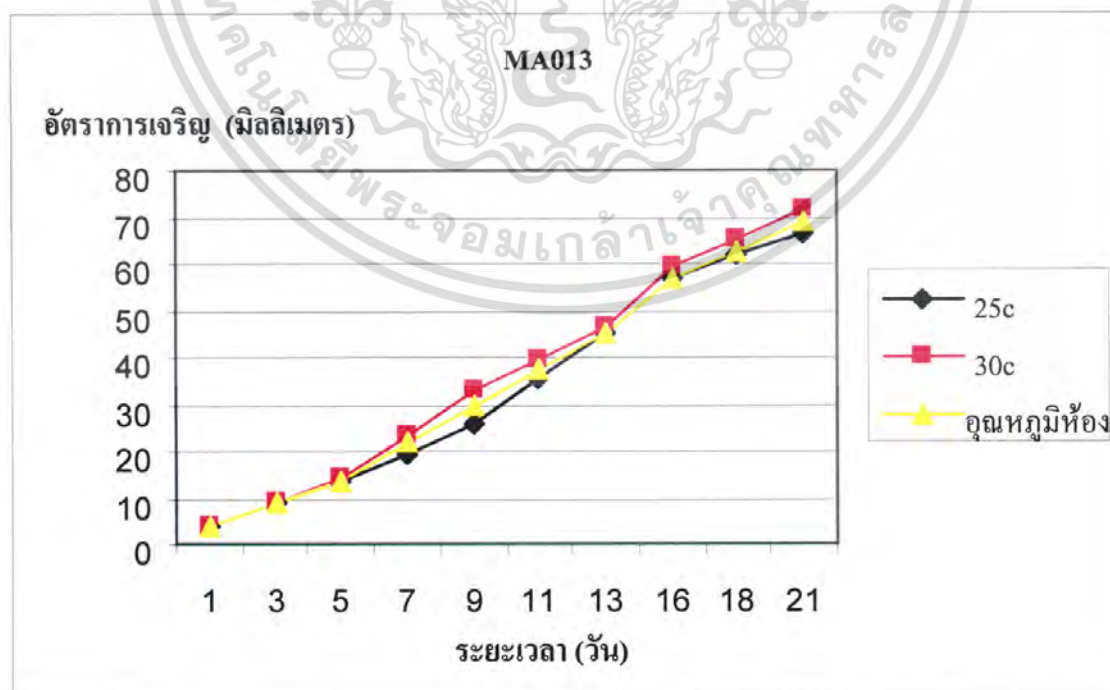
ภาพที่ 4.8 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 012 ที่อุณหภูมิต่างๆ

การเจริญของเชื้อไอโซเลต MA 013 นั้นเส้นใยมีลักษณะเหลืองอ่อนๆ และมีการสร้างสปอร์สีเขียวอมเข้มนเหลือง ลักษณะในการเจริญและการสร้างสปอร์นั้นคล้ายๆ กับเชื้อราทั่วไป โดยจะสร้างเส้นใยออกมาก่อนจากนั้นจึงเริ่มสร้างสปอร์โดยเริ่มพบในวันที่ 7 ในการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA 013 นั้นไม่ค่อยมีความแตกต่างในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.15 รวมทั้งการเจริญในแบบความและหงายด้วย ลักษณะของการเจริญนั้นในเชื้อไอโซเลต MA 013 นั้นมีการสร้างสารที่ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเล็กน้อยและมีการสร้างสปอร์ได้ดีในทุกๆ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา MA 013 นั้นดังแสดงในตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA013 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

MA 013			
วันที่	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตร)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิห้อง
1	3.9	3.9	3.9
3	8.74	9.09	8.73
5	13.58	14.28	13.56
7	19.57	23.49	21.67
9	25.57	32.71	29.79
11	35.5	39.58	37.38
13	45.43	46.46	44.98
16	56.9	59.14	56.7
18	61.76	65.37	62.82
21	66.63	71.6	68.95



ภาพที่ 4.9 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 013 ที่อุณหภูมิต่างๆ

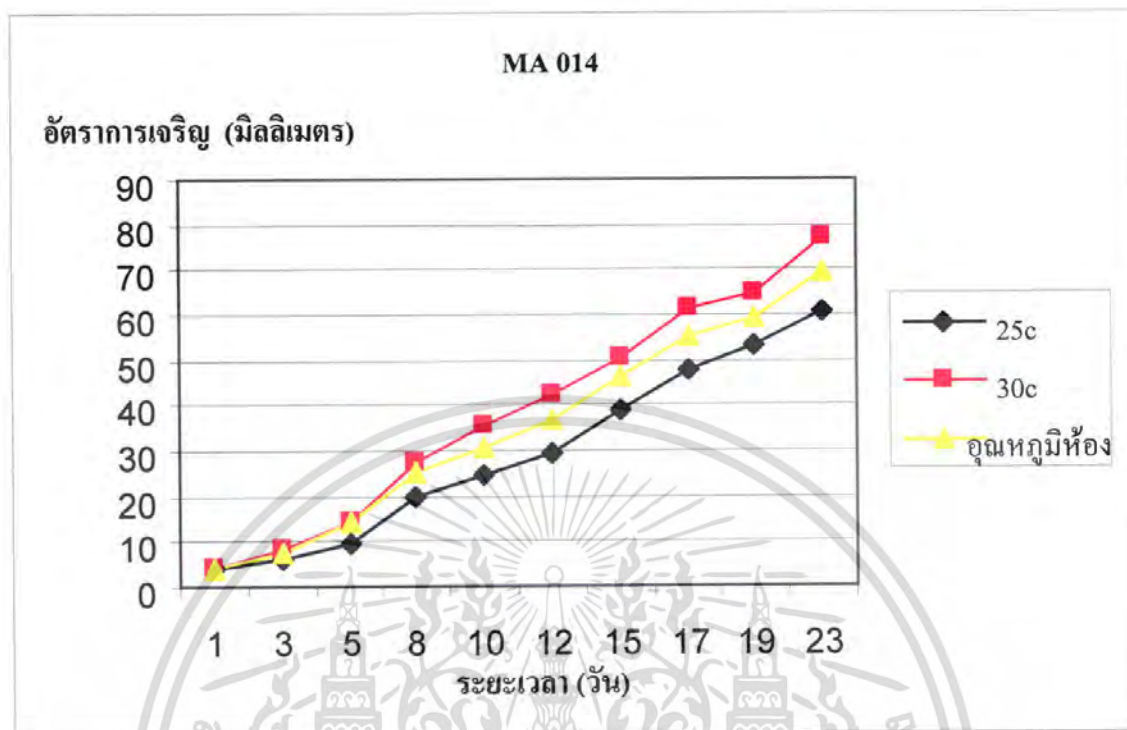
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญของเชื้อไอโซเลต MA014 นั้นเริ่มแรกเชื้อจะเจริญเป็นเส้นใยสีขาวฟูรอบๆ บริเวณชั้นวุ้นที่นำไปวางและเมื่อเส้นใยได้เจริญเป็นวงกว้างขึ้น ก็จะเริ่มสร้างสปอร์จากวงในหรือ บริเวณที่เส้นใยมีอายุมากที่สุด โดยการสร้างสปอร์นั้นจะมีสีเขียวเข้มเริ่มพบได้ในวันที่ 5 ของการเจริญที่ 30 องศาเซลเซียสแบบคว่ำจานทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.16 ที่อุณหภูมิห้องในทั้งแบบคว่ำและหงายจานทดลอง ในวันที่ 8 นั้นพบการสร้างสปอร์ในทุก ๆ แบบ และทุก ๆ อุณหภูมิของการเจริญ การเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA 014 นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของสีอาหาร โดยในแบบคว่ำและหงายนั้นอัตราการเจริญและลักษณะไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ในอุณหภูมิห้องสังเกตพบว่า เชื้อมีการสร้างสปอร์ได้ดีกว่าในอุณหภูมิต่ำ โดยสามารถเปรียบเทียบความหนาแน่นในการสร้างสปอร์ได้ด้วยตาเปล่า แต่ในอุณหภูมิต่ำมีการสร้างเส้นใยที่ฟูและหนากว่า และ อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา MA 014 นั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และภาพที่ 4.10

ตารางที่ 4.5 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA014 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

MA 014			
วันที่	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตร)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิห้อง
1	3.9	3.9	3.9
3	6.21	8.46	7.79
5	9.39	14.49	14.06
8	19.69	27.41	25.07
10	24.81	35.48	30.97
12	29.31	42.31	36.96
15	38.99	50.55	46.39
17	47.39	61.25	55.03
19	53.19	64.61	59.29
23	60.67	76.94	69.74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



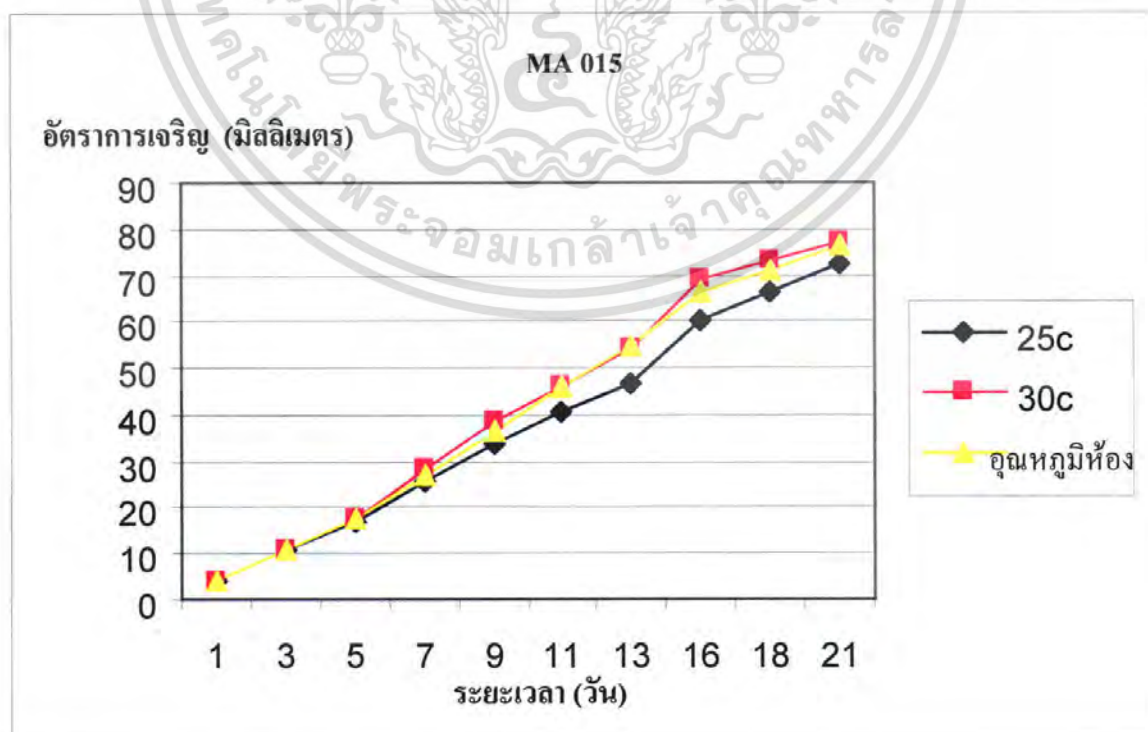
ภาพที่ 4.10 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA 014 ที่อุณหภูมิต่างๆ

การเจริญของเชื้อไอโซเลต MA 015 นั้นมีเส้นใยสีขาวไม่ฟูและมีสปอร์สีเขียวเข้มอมน้ำตาล โดยการเจริญนั้นจะเริ่มจากการสร้างเส้นใยสีขาวโดยเชื้อราไอโซเลต MA 015 สามารถสร้างสปอร์ได้เร็วมากสามารถพบการสร้างสปอร์ได้ในวันที่ 3 ของทุกอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง พื้นที่ในการเจริญส่วนใหญ่จะเป็นสปอร์ เนื่องจากเชื้อมีการสร้างสปอร์ได้เร็ว และหนาแน่นมากจนทำให้บังเส้นใยหมดเหลือเพียงรอบนอกของการเจริญเท่านั้นดังแสดงในภาพที่ 4.17 ลักษณะและอัตราการเจริญใน 3 อุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ ที่ใช้ในการทดลองนั้นไม่แตกต่างกันมากนัก สื่ออาหารไม่มีการเปลี่ยนแปลง และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อรา MA 010 นั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราไอโซเลต MA015 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

MA 015			
วันที่	อัตราการเจริญ (มิลลิเมตร)		
	25 องศาเซลเซียส	30 องศาเซลเซียส	อุณหภูมิห้อง
1	3.9	3.9	3.9
3	10.49	10.9	10.81
5	17.08	17.91	17.72
7	25.57	28.11	27.12
9	34.07	38.32	36.53
11	40.52	46.07	45.69
13	46.97	53.83	54.86
16	60.51	68.73	66.47
18	66.56	73.05	71.33
21	72.61	77.37	76.19



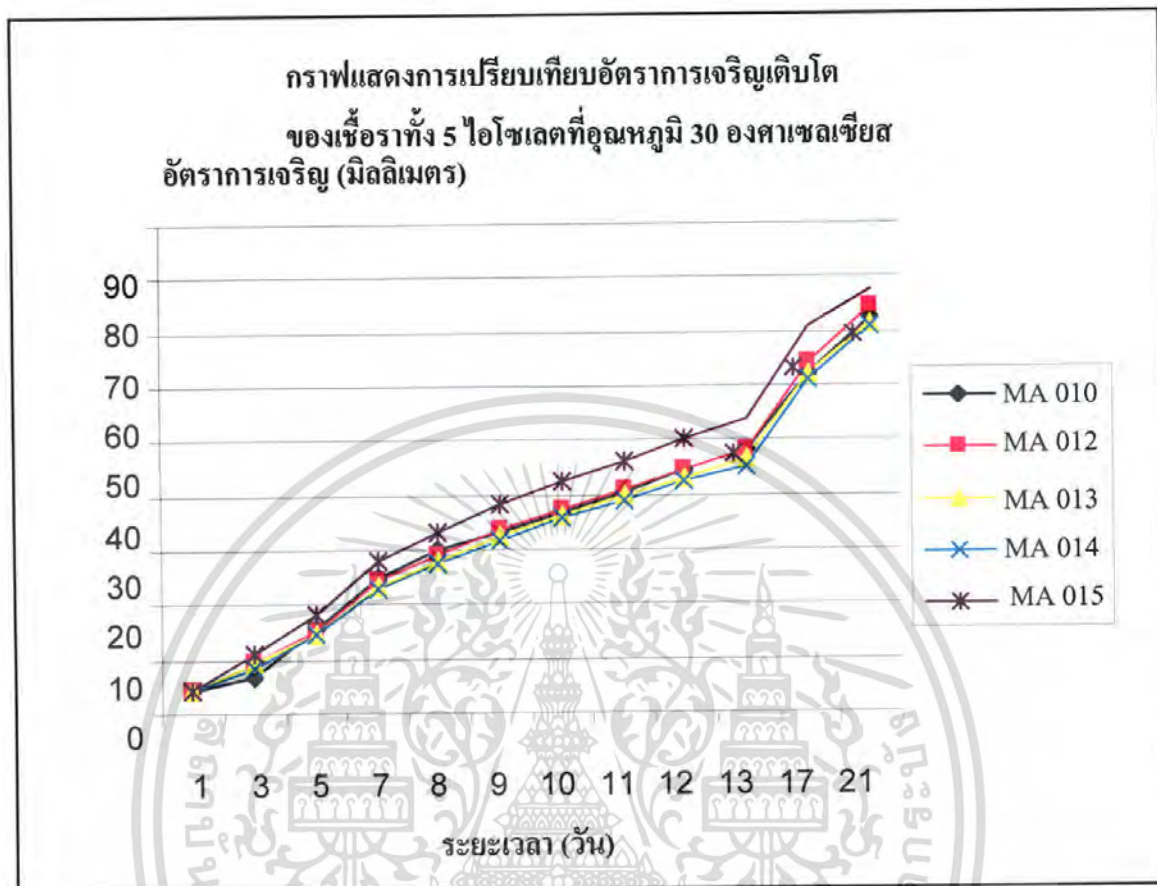
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้นมีอัตราการเจริญเติบโตที่สุดจึงนำข้อมูลในการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมาทำการเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่มีทั้ง 5 ไอโซเลต และอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นั้นดังแสดงในตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.12

ตารางที่ 4.7 แสดงอัตราการเจริญของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

วันที่	อัตราการเจริญของเชื้อรา (มิลลิเมตร)				
	Ma 010	Ma 012	Ma 013	Ma 014	Ma 015
1	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9
3	6.84	9.48	9.09	8.46	10.9
5	15.74	15.06	14.28	14.49	17.91
7	24.63	24.43	23.49	22.97	28.11
8	30.03	29.12	28.1	27.41	33.22
9	33.3	33.81	32.71	31.45	38.32
10	36.57	37.43	36.15	35.48	42.2
11	40.49	41.05	39.58	38.89	46.07
12	44.41	44.67	43.02	42.31	49.95
13	48.33	48.29	46.46	45.22	53.83
17	62.21	64.14	62.25	61.25	70.89
21	72.4	74.41	71.6	70.78	77.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

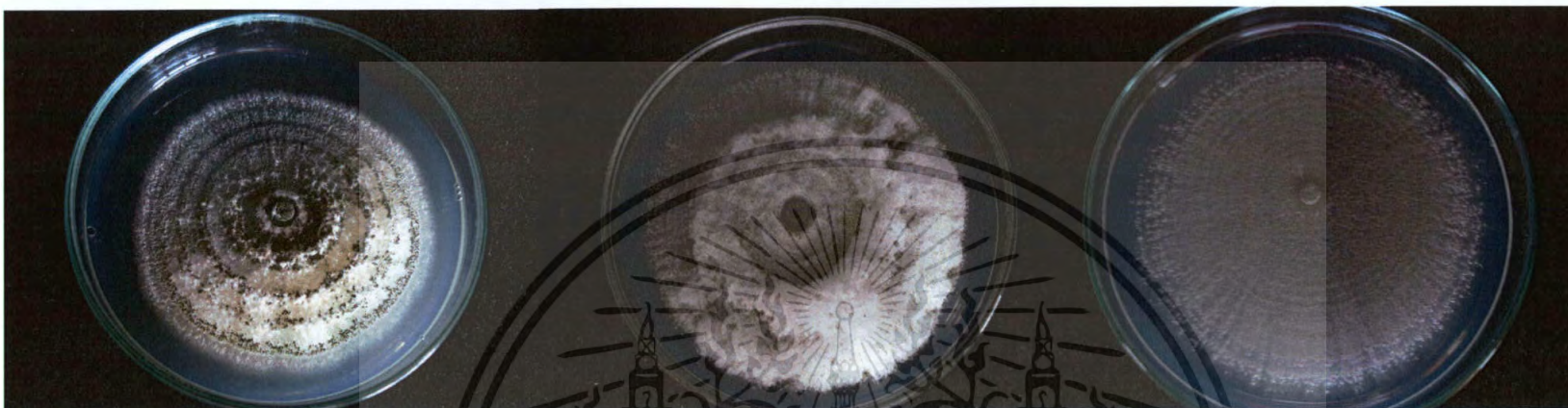


ภาพที่ 4.12 กราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

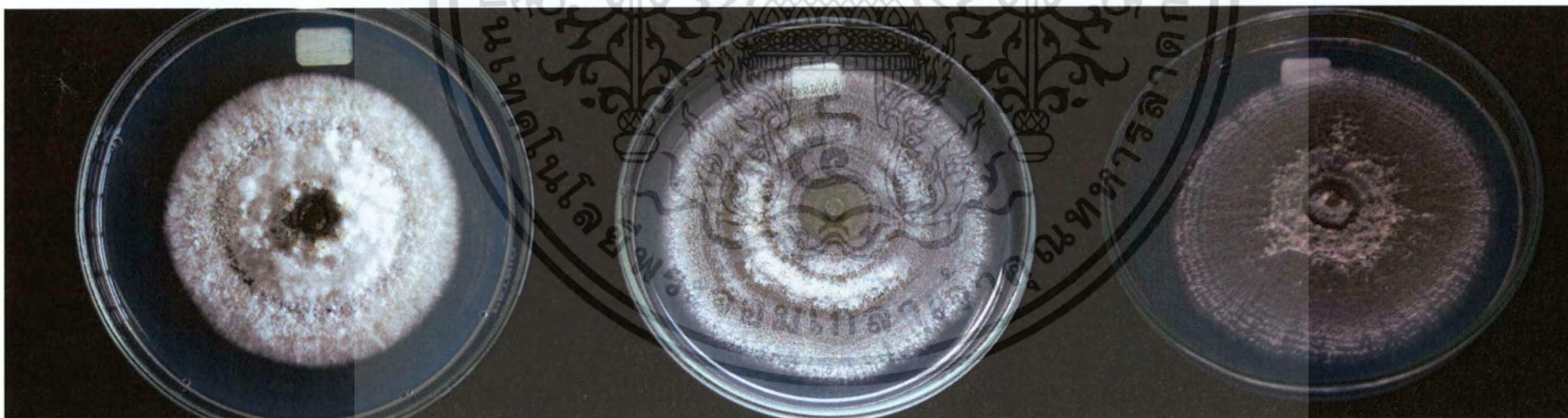
จากตารางแสดงอัตราการเจริญเติบโตและกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้น พบว่า เชื้อรา MA 015 มีอัตราการเจริญสูงสุด ส่วนเชื้อราที่เหลืออีก 4 ไอโซเลตนั้น มีอัตราการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันมาก แต่แนวโน้มอัตราการเจริญของเชื้อราทุกตัวนั้น มีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือ จะเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วเมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น

ผลที่ได้นั้นมีความใกล้เคียงกับการทดลองของ Farooq และคณะ (2005), Drauzio และคณะ (2005) พบว่า การเกิดสปอร์จะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราและสารอาหารที่ได้รับ นอกจากนี้ อุณหภูมิก็เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดต่อการเจริญของสปอร์ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. โดยการทดลองของ Farooq และคณะ (2005), Drauzio และคณะ (2005) นั้นพบว่าเชื้อรา *Metarhizium* sp. เจริญเติบโตได้ดีที่ 25 องศาเซลเซียส

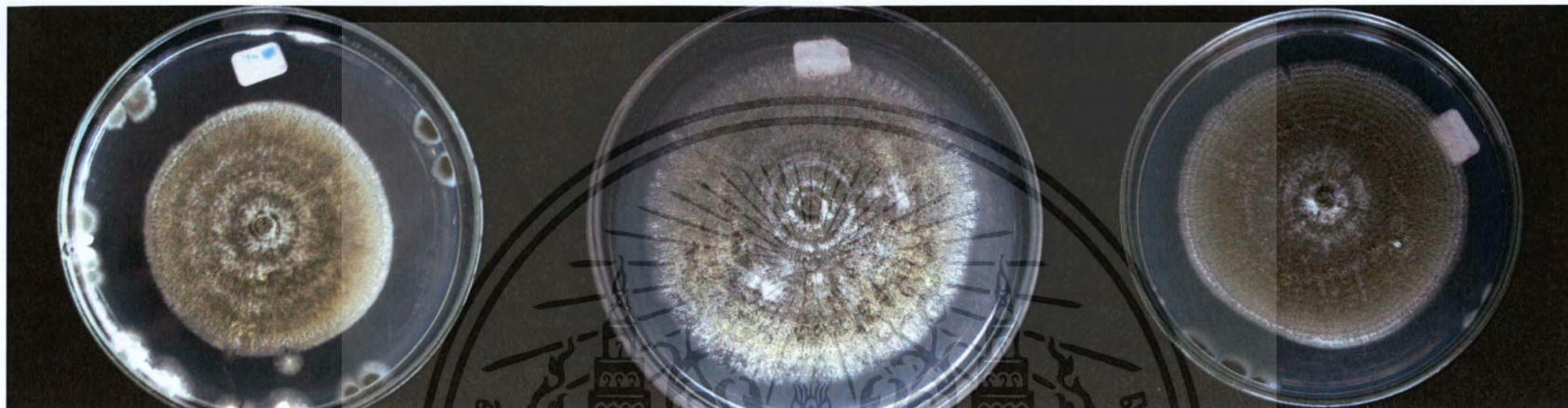
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA010 ในวันที่ 24 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ซ้าย) 30 องศาเซลเซียส (กลาง) และที่อุณหภูมิห้อง (ขวา)



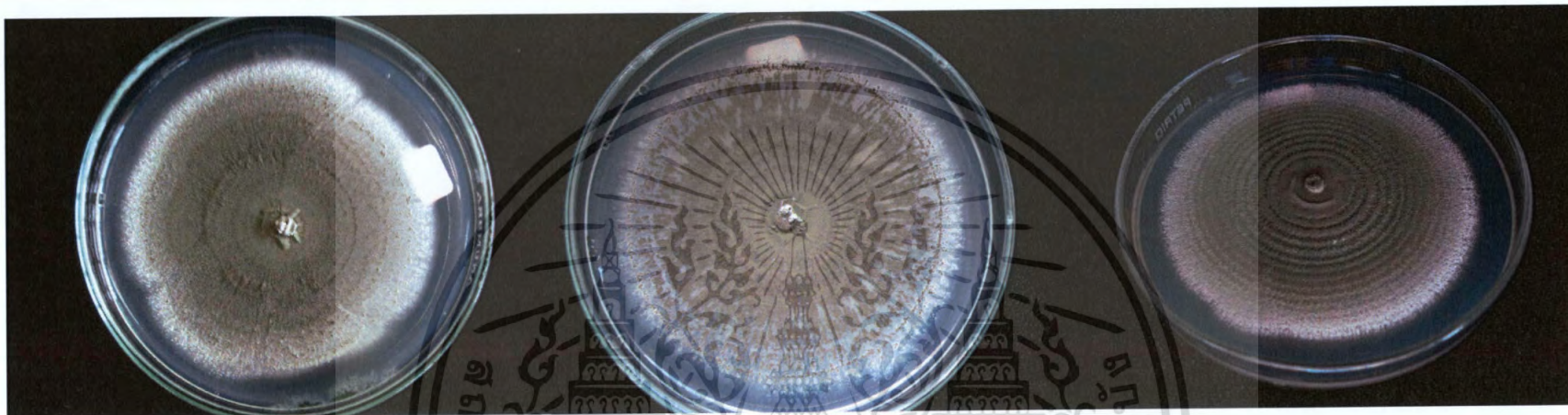
ภาพที่ 4.14 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA012 ในวันที่ 21 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ซ้าย) 30 องศาเซลเซียส (กลาง) และที่อุณหภูมิห้อง (ขวา)



ภาพที่ 4.15 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA013 ในวันที่ 21 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ซ้าย) 30 องศาเซลเซียส (กลาง) และที่อุณหภูมิห้อง (ขวา)



ภาพที่ 4.16 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA014 ในวันที่ 23 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ซ้าย) 30 องศาเซลเซียส (กลาง) และที่อุณหภูมิห้อง (ขวา)



ภาพที่ 4.17 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อราไอโซเลต MA015 ในวันที่ 21 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ซ้าย) 30 องศาเซลเซียส (กลาง) และที่อุณหภูมิห้อง (ขวา)

4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

4.4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปแล้ว นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการวัดความเข้มข้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 และ 260 นาโนเมตร พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอ ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ในแต่ละ ไอโซเลต

ไอโซเลต	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)
MA 010	0.250	1,250
MA 012	0.239	1,195
MA 013	0.321	1,605
MA 014	0.341	1,705
MA 015	0.279	1,395

เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสใช้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส ผลแสดงดังรูปที่ 4.18



ภาพที่ 4.18 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดีเอ็นเอของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต โดยที่
 เลนที่ 1 คือชุดควบคุม, เลนที่ 2 คือ MA 010, เลนที่ 3 คือ MA 012 , เลนที่ 4
 คือ MA 013, เลนที่ 5 คือ MA 014, เลนที่ 6 คือ MA 015 , เลนที่ 7 คือดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนมาตรฐานขนาด 1 กิโลเบส การศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้มีขนาดเล็กเกินไป ทำให้ไม่สามารถบอกได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอ นั้นมีขนาดเท่าใด ควรทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสใหม่โดยเพิ่มขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 10 กิโลเบส นอกจากนี้จะพบว่าบริเวณด้านล่างของแผ่นเจลจะมีลักษณะแถบสีขาวอยู่ นั่นคือ อาร์เอ็นเอที่ปนเปื้อนมา ซึ่งสามารถกำจัดได้โดยการเติมเอนไซม์ RNase เพื่อทำการย่อยอาร์เอ็นเอ

4.4.2 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR

จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' และ ITS4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' เป็นไพรเมอร์



ภาพที่ 4.19 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยที่ เลนที่ 1 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, เลนที่ 2 คือ MA 010, เลนที่ 3 คือ MA 012 , เลนที่ 4 คือ MA 013, เลนที่ 5 คือ MA 014, เลนที่ 6 คือ MA 015 , เลนที่ 7 คือชุดควบคุม

จากผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส ซึ่งพบว่า เชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้ จะได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ที่มีขนาดเท่ากัน ซึ่งในการใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณนี้ในการนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรมของเชื้อรา *Metarhizium* spp. นี้พบว่า ตรงกับการศึกษาของ Fouly และคณะ (1997), Argentina (1999), Ricardo (2004), Curran และคณะ (1994) และ Driver และคณะ (2000) ซึ่งพบว่า ข้อมูลลำดับเบสในส่วนของ ITS และ 5.8S rDNA สามารถนำมาใช้ในการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Metarhizium* spp. ได้ โดย Ricardo (2004) ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS4 ในการทำ PCR และได้ขึ้นส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 540 – 600 คู่เบส

4.4.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP

จากการนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 12 ชนิด จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR-RFLP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*H I และ *Eco*R I ไปทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ผลแสดงดังภาพที่ 4.23 ส่วนผลการทดลองในเอนไซม์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.8 พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 12 ชนิด ดังตารางที่ 9 ไม่สามารถแยกความแตกต่างทางด้านพันธุกรรมบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตได้ ซึ่งผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP ดังแสดงในภาพที่ 4.20

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต

ลำดับ	ชื่อเอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ	บริษัท	ผลการตัด	ขนาด (คู่เบส)
1	<i>Alu</i> I	5'AG*CT 3' 3' TC*GA 5'	Vivantis	X	650
2	<i>Bam</i> H I	5'G*GATCC 3' 3' CCTAG*G 5'	Vivantis	X	650
3	<i>Bgl</i> II	5'A*GATCT 3' 3' TCTAG*A 5'	Vivantis	X	650
4	<i>Eco</i> R I	5' G*AATTC 3' 3' CTTAA*G 5'	Vivantis	/	300,350
5	<i>Hae</i> III (<i>Bsn</i> I)	5' GG*CC 3' 3' CC*GG 5'	Vivantis	/	450,200
6	<i>Hha</i> I (<i>Asp</i> LE I)	5' GCG*C 3' 3' C*GCG 5'	Vivantis	/	320

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) แสดงผลการหาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิค RFLP ของเชื้อราทั้ง 5
ไอโซเลต

ลำดับ	ชื่อเอนไซม์	ตำแหน่งจดจำ	บริษัท	ผลการตัด	ขนาด (คู่เบส)
7	<i>Hpa</i> II (<i>Msp</i> I)	5' C*CGG 3' 3' GGC*C 5'	Vivantis	/	400,200
8	<i>Sac</i> I (<i>Psp</i> 124B I)	5' GAGCT*C 3' 3' C*TCGAG 5'	Vivantis	X	650
9	<i>Tag</i> I	5' T*CGA 3' 3' AGC*T 5'	Vivantis	/	340
10	<i>Hind</i> III	5' A*AGCTT 3' 3' TTCGA*A 5'	Promega	X	650
11	<i>Pst</i> I	5' CTGCA*G 3' 3' G*ACGTC 5'	Promega	X	650
12	<i>BstE</i> II	5' G*GTNACC 3' 3' CCANTG*G 5'	Promega	X	650

(X คือ ไม่สามารถตัดดีเอ็นเอได้, / คือสามารถตัดดีเอ็นเอได้, * คือตำแหน่งในการตัดดีเอ็นเอ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



รูปที่ 4.20 แสดงผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP, เลขที่ 1 คือ MA 010, เลขที่ 2 คือ MA 012, เลขที่ 3 คือ MA 013, เลขที่ 4 คือ MA 014, เลขที่ 5 คือ MA 015, เลขที่ 6 คือชุดควบคุม, เลขที่ 7 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, เลขที่ 8 คือ MA 010, เลขที่ 9 คือ MA 012, เลขที่ 10 คือ MA 013, เลขที่ 11 คือ MA 014, เลขที่ 12 คือ MA 015, เลขที่ 13 คือชุดควบคุม โดยในเลขที่ 1-6 นั้นใช้เอนไซม์ *BamH* I และเลขที่ 8-13 ใช้เอนไซม์ *EcoR* I

จากผลการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RFLP ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ตัวคือ *Hpa* II และ *Hae* III พบว่า สามารถตัดชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากการทำ PCR ได้ ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ Ricardo (2004) ที่พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ของเชื้อรา *M. anisopliae* โดยเอนไซม์ *Hpa* II ตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 100 และ 360 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Hae* III สามารถตัดผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 120 และ 410 คู่เบส

จากผลการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค RFLP ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อชิงรางวัลเท่านั้น เมื่อผู้เอาต์เห็นประโยชน์ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งสิ้น 12 ตัว พบว่า ไม่สามารถคัดแยกเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตจากกันได้เลย จึงได้มีการส่งผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR ไปทำการหาลำดับเบสเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อราต่อไป

4.4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากการวิเคราะห์ในโปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสทั้งหมด 650 เบสของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีความคล้ายคลึงกับลำดับเบสบน ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา *M. anisopliae* 98% ซึ่งเป็นข้อพิสูจน์ว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* จากนั้นนำมาทำการเปรียบเทียบความแตกต่าง (alignment) ของลำดับเบสของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตกับเชื้อราอื่น ๆ ทั้งในสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ ตามตารางที่ 4.10 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างดังกล่าวแสดงในภาพที่ 4.21

ตารางที่ 4.10 แสดงรายละเอียดของลำดับเบสที่นำมาทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม กับเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต

ชื่อย่อ	ชื่อเต็ม	ประเทศ	อ้างอิง
MF	<i>Metarhizium flavoviride</i>	ฝรั่งเศส	Ricardo และคณะ, 2006
14	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> isolate 14	ออสเตรเลีย	Ricardo และคณะ, 2006
CG 515	<i>Metarhizium album</i> CG515	บราซิล	Dall และคณะ, 2004
m	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>majus</i>	บราซิล	Arruda และคณะ, 2006
K 5	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> isolate K5	โคลัมเบีย	Inglis และคณะ, 2008
E 9	<i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> isolate E9	บราซิล	Ricardo และคณะ, 2006
Bb	<i>Beauveria bassiana</i>	สหรัฐอเมริกา	Cardoza และคณะ, 2008
Cb	<i>Cordyceps brongnairtii</i>	ญี่ปุ่น	Sasaki และคณะ, 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CLUSTAL X (1.83) MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT

File: J:\alignok1.ps
Page 1 of 2

Date: Sun Mar 16 01:32:06 2008

```

14  GGAAACCGGGACCGCGCCCGCGGGATCTAGTAACTCTGGAATCTCTATATAATATGGCATCTCTGAGTGG--TG 79
MF  -----TTTCTATCT-----ATAGCATGT-CTGAGGGGAACTC 30
E9  CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 122
K5  CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 383
CG515 -----CGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 52
MA014 CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 109
MA015 CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 110
MA012 CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 109
MA010 CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 108
MA013 CTTCCGGCGGGACTTCGCGCCCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGTATCTCTGAGTGGTTAA 110
m  -----GACTCCGCGCGCGGGGACCCGAAACCTTCGAAATTTTAAATA-----AGGATCTCTGAGTGGTTAA 65
Bb  -GCGGACTGGACCA-GCGGCGCGGGGACCCGAAACCTCTGTATTATCAGCATC-TTCGAAATACCGCCCAAGCCAAA 77
Cb  -GCGGACTGGACCA-GCGGCGCGGGGACCCGAAACCTCTGTATTATCAGCATC-TTCGAAATACCGCCCAAGCCAAA 97
ruler  .....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.

```



```

14  GGAAAAAA--TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 158
MF  ATACACAAA--TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGA--GAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 108
E9  AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 197
K5  AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 458
CG515 -----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 127
MA014 AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 189
MA015 AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 188
MA012 AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 187
MA010 AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 186
MA013 AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 189
m  AAAAAA----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 143
Bb  ACAA-----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 152
Cb  ACAA-----TGAATCAAAACTTTCACACACCGGATCTCTGGTTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 172
ruler  .....400.....410.....420.....430.....440.....450.....460.....470.

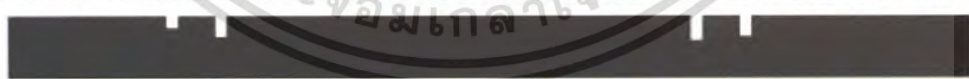
```



```

14  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 238
MF  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGA--GAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 188
E9  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 277
K5  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 538
CG515 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 207
MA014 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 269
MA015 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 268
MA012 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 267
MA010 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 266
MA013 TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 269
m  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 223
Bb  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 232
Cb  TAAATGTGAATTCAGAAATTCAGTGAATCTCCGAACTCTGGAATTCGCGCATCGATGAAGAAACCGAGCGAAATGCGGATAAG 252
ruler  .....480.....490.....500.....510.....520.....530.....540.....550.

```



```

14  GTTTCGAAACCGTCAATTACGCCCTCAAG---CCCCCTGGGGGTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAAACCTTTCAGC-ACG 310
MF  GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 266
E9  GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 351
K5  GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 612
CG515 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 281
MA014 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 343
MA015 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 342
MA012 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 341
MA010 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 340
MA013 GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 343
m  GTTTCGA-GCGTCAATTACGCCCTCAAG-TCCCCGTGGGACTTG---GTGTTGGGGATCGCGGAGGCTGGTTTCCAGCA 297
Bb  GTTTCGA-GCGTCAATTCAACCTTCGACCTTCCCTTTGGGGAAAT--CGGCTTGGGGACCGGCAAGC-----ACA 297
Cb  GTTTCGA-GCGTCAATTCAACCTTCGACCTTCCCTTTGGGGAAAT--CGGCTTGGGGACCGGCAAGC-----ACA 317
ruler  .....560.....570.....580.....590.....600.....610.....620.....630.

```



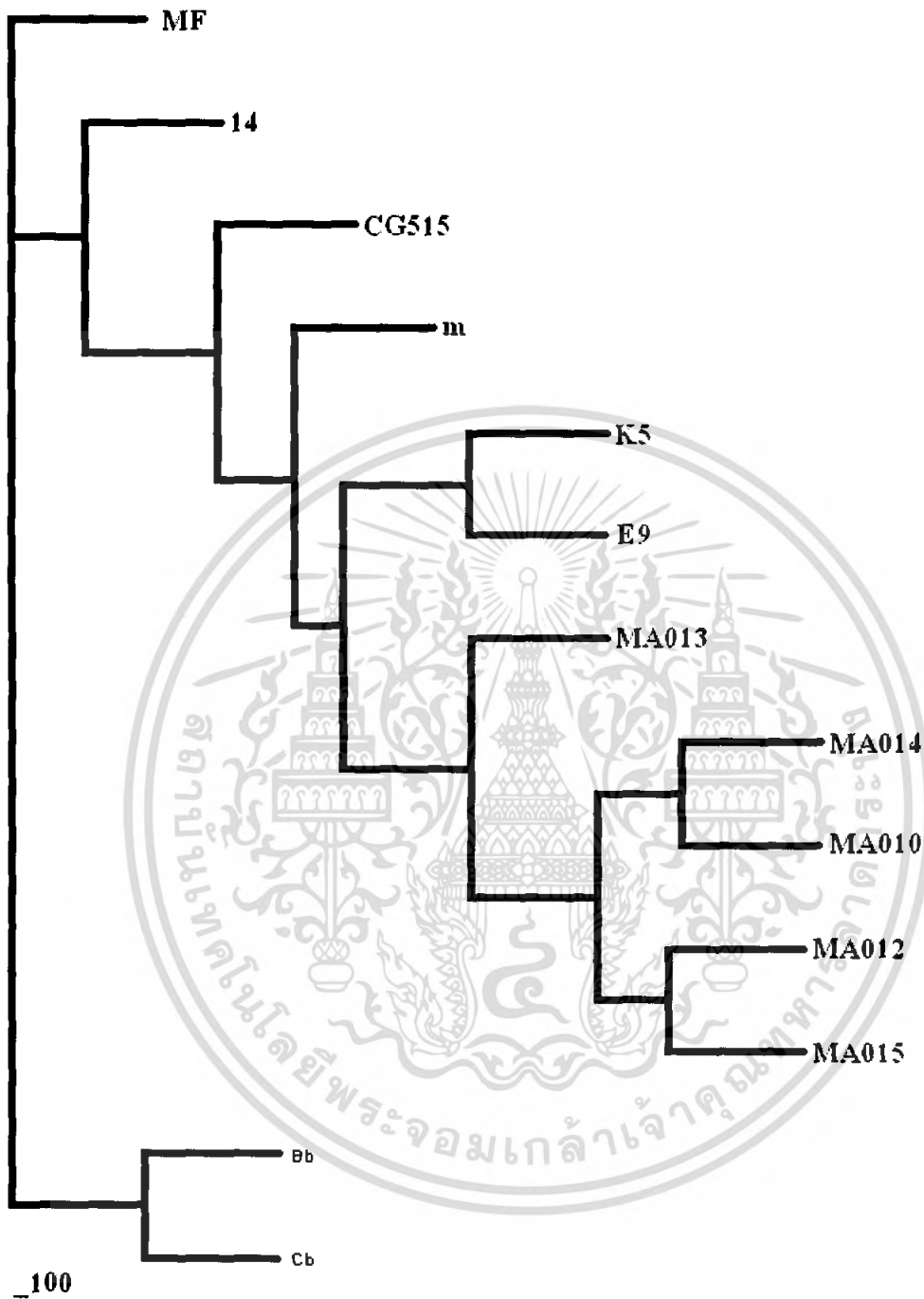
เอกสารนี้เป็นภาพที่ 4.21 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อราทั้ง 5 โกลโคกกับเชื้อราอื่น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.5 การทำแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในการทดลองนี้จะใช้บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในการวิเคราะห์ ซึ่งจะใช้โปรแกรม PHYLIP ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในแมลงสาบพันธุ์ *Metarhizium* sp., *B. bassiana* และ *Cordyceps brongniartii* ว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไรใกล้เคียงกับเชื้อ *M. anisopliae* ทั้ง 5 ไอโซเลต ดังภาพที่ 4.22

ซึ่งพบว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนั้น มีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมมาก และมีความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* มากที่สุด ซึ่งสัดส่วนที่ 100 แสดงถึงระยะห่างของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ยิ่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมมากก็จะมีระยะห่างเพิ่มมากขึ้น





ภาพที่ 4.22 แสดงแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลต กับเชื้อรา *Metarhizium* spp., *B. bassiana* และ *Cordyceps brongniartii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ที่มีต่อปลวก *Termitidae* sp.

Yendol และ Paschke (1965) ได้เริ่มมีการศึกษาเชื้อราที่มีผลต่อการควบคุมปลวก เช่น การศึกษาเกี่ยวกับผลของสภาวะแวดล้อมและการลดใช้สารเคมีที่มีผลในการกำจัดปลวกที่มีขายตามท้องตลาด และเริ่มให้ความสนใจในการใช้เชื้อราในการควบคุมปลวก (Neves และ Alves, 2000 ; Osbrink และคณะ, 2001)

จากผลการทดสอบผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ที่มีต่อปลวก *Termitidae* sp. โดยให้สารละลายสปอร์ของเชื้อราในแต่ละไอโซเลตเป็นดังตารางที่ 4.11 ผลการทดลองการเปรียบเทียบผลของเชื้อราในแต่ละไอโซเลต เป็นดังตารางที่ 4.12 และผลการศึกษาอัตราการความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ส่งผลกระทบต่อปลวกดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.11 แสดงความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ที่ใช้ในการทดสอบ

ไอโซเลตเชื้อรา	ความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)
MA 010	1.7×10^8
MA 012	5.7×10^7
MA 013	3×10^7
MA 014	6.8×10^7
MA 015	2.8×10^7

ตารางที่ 4.12 แสดงอัตราการตายของปลวกในการทดสอบผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลต ที่มีต่อปลวก *Termitidae* sp.

จำนวนปลวกที่ตาย (ตัว)	MA 010		MA 012		MA 013		MA 014		MA 015		หูดควบคุม	
	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ1	ซ้ำ2	ซ้ำ1	ซ้ำ2
วันที่ 3	6	0	7	0	2	1	8	0	5	1	2	0
วันที่ 7	8	4	8	2	6	4	8	0	10	2	3	0

จากผลการทดลองที่ได้ นั้นปลวกมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นในทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นใกล้เคียงกัน นั้นแสดงว่าสปอร์ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นมีผลต่อการดำรงชีวิตของปลวก แต่เนื่องจากความเข้มข้นสปอร์ของทั้ง 5 ไอโซเลตนั้นไม่เท่ากันเราจึงคัดเลือก 2 ไอโซเลต เพื่อมาทำการเปรียบเทียบความสามารถในไอโซเลตเดียวกันแต่ความเข้มข้นต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงอัตราการตายของปลวกในการทดสอบผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ไอโซเลต MA013 และ MA015 มีต่อปลวก *Termitidae* sp. ที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ต่างกัน

ไอโซเลต	MA013					ชุดควบคุม
	3×10^7	3×10^6	3×10^5	3×10^4	3×10^3	
การเจือจาง						
จำนวนปลวกตายในวันที่ 3	2	2	2	1	1	0
จำนวนปลวกตายวันที่ 7	4	5	3	2	2	0

ไอโซเลต	MA015					ชุดควบคุม
	2.8×10^7	2.8×10^6	2.8×10^5	2.8×10^4	2.8×10^3	
การเจือจาง						
จำนวนปลวกตายวันที่ 3	2	1	1	1	1	0
จำนวนปลวกตายวันที่ 7	6	4	3	2	1	0

ผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเข้าทำลายปลวกที่ความเข้มข้นสปอร์ที่ต่างกันชี้ให้เห็นว่า อัตราการตายของปลวกนั้นเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสปอร์เพิ่มขึ้น และเมื่อดูจากผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 3 กับวันที่ 7 นั้นปลวกมีอัตราการตายเพิ่มขึ้นนั้นแสดงว่าเวลานั้นมีผลต่อการเข้าทำลายของสปอร์

ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Changjin และคณะ (2007) ที่ว่าเชื้อ *M. anisopliae* สามารถทำให้เกิดโรคในปลวก (*O. formosanus*) ได้ โดยทดลองที่ความเข้มข้นสปอร์ 3×10^7 และ 3×10^8 อัตราการตายของปลวกจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อราเพิ่มขึ้น หรือเมื่อมีการเพิ่มระยะเวลามากขึ้นก็จะทำให้จำนวนปลวกที่ตายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ความรุนแรงของเชื้อ *M. anisopliae* ที่มีผลต่อปลวกนั้นแตกต่างกันเมื่อปลวกได้รับชุดการทดลอง (treatment) ที่แตกต่างกันทั้งความเข้มข้นของสปอร์ที่ได้รับหรือความแตกต่างกันของสายพันธุ์ของเชื้อรา *M. anisopliae*

บทที่ 5

สรุปการทดลอง

5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium* sp.

จากการศึกษาทางด้านลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Metarhizium* sp. โดยการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต บนอาหารเลี้ยงเชื้อรา 2 ชนิด คือ PDA และ DG 18 ซึ่งพบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราบนอาหารต่างชนิดกันที่อุณหภูมิเดียวกัน ก็จะได้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราในแต่ละไอโซเลตไม่เหมือนกันเพราะในอาหารแต่ละชนิดจะมีส่วนประกอบของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในปริมาณที่แตกต่างกัน จึงส่งผลต่อการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ของเชื้อรา จึงส่งผลแสดงออกมาในรูปของลักษณะเส้นใยที่แตกต่างกันหรือระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตที่ไม่เท่ากัน

ส่วนในด้านการศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนั้น พบว่าสปอร์ของเชื้อรามีลักษณะ ขาว รี คล้ายเมล็ดข้าวสาร มีสีเขียว การงอกของสปอร์จะงอกจากเส้นใยทางด้านข้าง และสปอร์จะสร้างต่อกันไปเรื่อย ๆ เป็นสาย และเมื่อมีการสร้างสปอร์ในปริมาณที่มากขึ้น สปอร์ก็จะอัดตัวกันอย่างแน่นหนากลายเป็นกลุ่มก้อนของสปอร์

5.2 การคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* sp.

ในการคัดแยกเชื้อราจากธรรมชาตินั้น พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อการคัดแยกเชื้อราทั้งจากในดินและจากสิ่งมีชีวิต เช่น แมลง ซึ่งในการทดลองนี้ ไม่ประสบความสำเร็จในการคัดแยกเชื้อราจากธรรมชาติ ซึ่งอาจเกิดจากการขาดความชำนาญของผู้ทำการทดลองและยังมีความรู้ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้ไม่สามารถคัดแยกเชื้อราจากธรรมชาติได้

5.3 การศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

จากการทดลองในการศึกษาถึงอัตราการเจริญของเชื้อ *Metarhizium* sp. พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนั้นเชื้อ *Metarhizium* sp. มีอัตราการเจริญสูงสุดแต่เส้นใยขึ้นฟูหนาไม่เหมาะแก่การนำไปใช้หรือเพิ่มจำนวนเนื่องจากในการเพิ่มปริมาณหรือการนำไปใช้นั้นเราจะใช้รูปของสปอร์ ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มปริมาณสปอร์นั้นคืออุณหภูมิห้องซึ่งจะมีการเจริญของเส้นใยและสปอร์ค่อนข้างเหมาะสมที่จะนำมาใช้และจากการทดสอบการเลี้ยงในแบบคว่ำและหงายงานทดลองนั้นก็มีส่วนในการเจริญหรือการสร้างสปอร์ด้วยเช่นกัน เนื่องจากเมื่อทำการคว่ำงานทดลองนั้นจะทำให้เชื้อ *Metarhizium* sp. มีการสร้างเส้นใยมากกว่าและสปอร์ยังคงตกลงมาเกาะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฝาจานทดลองอีกถ้วย

จากข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาวิเคราะห์แล้วคาดว่าแสงน่าจะมีส่วนในการเจริญของเชื้อ *Metarhizium* sp. ด้วยเช่นกันเนื่องจากจานทดลองที่หงายหรือจานที่โดนแสงมากกว่านั้นจะมีการสร้างสปอร์ได้ดีกว่าจานทดลองอื่น ๆ

ซึ่งการวัดอัตราการเจริญเติบโตนี้ สามารถนำไปใช้เป็นคุณสมบัติในการคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราได้อย่างคร่าว ๆ เพราะเชื้อราแต่ละไอโซเลต มีอัตราการเจริญเติบโต และลักษณะในการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน และนอกจากนี้ การศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อรายังมีส่วนช่วยให้สามารถเพาะเลี้ยงเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นการประหยัดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเชื้อราอีกด้วย

5.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนั้น ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งจำได้ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ rDNA ตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12 ชนิด พบว่า เอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 12 ตัวนั้นไม่สามารถใช้แยกความแตกต่างของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตได้

จากการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR แล้วนำมาทำการเทียบเคียงกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อรา *Metarhizium* sp. พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 98% จึงแสดงว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้เป็นเชื้อรา *M. anisopliae* นอกจากนี้ ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสยังพบว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้ไม่ใช่เชื้อราตัวเดียวกัน และเมื่อนำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตมาทำการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับเชื้อรา *Metarhizium* spp., *B. bassiana* และ *Cordyceps brongnairtii* พบว่าเชื้อราทั้ง 3 สกุลนี้มีความสัมพันธ์กันทางด้านพันธุกรรมและเป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการเข้าเจาะทำลายตัวหนอนหรือแมลงได้ และเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับเชื้อรา *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* มากที่สุด และเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมมาก ซึ่งสังเกตได้จากเมื่อเทียบระยะห่างของแผนภูมิ

5.5 การศึกษาผลของเชื้อรา *Metarhizium* sp. ต่อปลวก *Termitidae* sp.

เชื้อ *Metarhizium* sp. นั้นมีความสามารถในการเข้าทำลายปลวกได้ โดยในการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ส่งผลต่ออัตราการตายของปลวกที่ใกล้เคียงกันจนอาจกล่าวได้ว่า ไอโซเลตของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตนี้ให้ผลในการตายของปลวกเท่ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนในความเข้มข้นของสปอร์ของเชื้อราที่ปลวกได้รับนั้น พบว่า เมื่อปลวกได้รับสารละลายสปอร์ที่มีความเข้มข้นมาก ๆ พบว่าอัตราการตายของปลวกจะเพิ่มมากขึ้น และเมื่อระยะเวลาที่ปลวกได้รับสารละลายสปอร์เพิ่มมากขึ้น พบว่า อัตราการตายของปลวกก็จะเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ทิพย์วดี อรรถธรรม, กรรณิการ์ สีนวลมาก และจีรภา ปัญญาศิริ. 2546. เชื้อราของแมลงและ
ศักยภาพในการใช้ควบคุมกำจัดเพลี้ยไฟ. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัย-
เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- มลิวัดย์ ปันยารชุน. 2544. การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยใช้เชื้อรา. เอกสารวิชาการการควบคุม
แมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. 279-288.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2548. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- หัทธยา กาวิวงศ์. 2546. อนุพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่ : บุญไชยการพิมพ์.
- วสันต์ จันทราพิศย์, วีระพงศ์ ลูธิตานนท์, พุทธภูมิ ลำเจียกเทศ, สมหญิง พรหมโส, วงศกร พูน
พิริยะ, เอกวัฒน์ ผสมทรัพย์, สยาม คุณเศษ. 2547. เรียนรู้โปรแกรมชีวสารสนเทศด้วย
ตนเอง. สถาบันบัณฑิตวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งชาติ.
- Anna L., Sharon C., Tania S., Dee C., Richard M., Patricia M. and Catriona H. 2007.
Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify
fungal DNA in tissue specimens. *Clinical Microb.* 45 : 380 – 385.
- Argentina S.C. 1999. Taxonomia polifsica de *Neurospora* produtoras de aromas. PhD Thesis,
UNICAMP, Campinas, Brazil.
- Arruda W., Baratto C.M., Gonzalez-Hernandez G.A., Torres G.J.C., Schrank A. and Vainstein
M.H. 2006. Direct Submission. Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul. Brasil
- Changjin D., Jiamin Z., Wuguo C., Hai H. and Yuanyang H. 2007. Characterization of a newly
discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for
virulence to termites, isoenzyme and phylogenic analysis. *Mycol. Res.* 162 : 53 - 61.
- Chengshu W., Typas M.A. and Butt T.M. 2002. Detection and characterization of Prl virulent
gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS
Microbiol. Lett.* 213 : 251–255.
- Cardoza Y.J., Suazo A., Vasanthakumar A. and Raffa K.F. 2008. Direct Submission. Entomology.
University of Wisconsin-Madison. USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Curran I., Driver F., Ballard J.W.O. and Milner R.J. 1994. Phylogeny of *Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycol. Res.* 98(5): 547-552.
- Dall O.L.P., Yanaka F.Y., Fagundes N.J.R., Mendes R.G., Panichi M.C., Franco G.S., Leal S.M.C. and Bogo M.R. 2004. Direct Submission. Centro de Biologia Genomicae Molecular. Pontificia Universidade Catolica do Rio Grande do Sul. Brazil
- Driver F., Milner R.J. and Trueman J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol. Res.* 104(2): 134-150.
- Durbin R., Eddy S., Krogh A. and Mitchison G. 1998. Biological sequence analysis: Probabilistic models of proteins and nucleic acids. *Cambridge University Press*. Cambridge.
- Fouly H., Wilkinson H.T. and Chen W. 1997. Restriction analysis of internal transcribed spacers and the small subunit gene of ribosomal DNA among four *Gaeumannomyces* species. *Mycol.* 89:590-597.
- Farooq A.S., Cheng S.W. and Tariq M.B. 2005. Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology.* 251 : 259-266.
- Fumio I., Masatoshi T. and Takeru S. 2003. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* to the chestnut weevil larvae under laboratory and field conditions. *Appl. Entomol. Zool.* 38 (4) : 461-465
- Hernandez V.M. and Gutierrez R.L. 2000. Formulation Y application de cepas natives de *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* para el control de *Schistocerca piceifrons* en Mexico In : Memoirs XXIII Congreso National de Control Biologico. Guanajuato, Mexico, pp. 194 - 196.
- Hughes W.O.H. and Thomsen L. 2004. Diversity of entomopathogenic fungi near leaf-cutting ant nests in a neotropical forest, with particular reference to *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Invertebr Pathol.* 85 : 46-53
- Hunter D.M., Milner R.J., Scanlan J.C. and Spurgin P.A. 1999. Aerial treatment of the migratory locust, *Locusta migratoria* (L.) (Orthoptera : Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) in Australia. *Crop Prot.* 18 : 699-704.
- Hunter D.M., Milner R.J. and Spurgin P.A. 2001. Aerial treatment of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Orthoptera : Acrididae) with *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) *Bull. Ent. Res.* 91 : 93-99.

- Inglis G.D., Duke G.M., Goettel M.S. and Kabaluk J.T. 2008. Genetic diversity of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* in southwestern British Columbia. *Invertebr. Pathol.* In press
- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M. and Strasser H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insectpests. In : Butt, T.M., Jachsen, C., Magan, N. (Eds.), *Fungi as Biocontrol Agents : Progress, Problems and Potential.* CBI Publishing, Wallingford, UK, pp. 23–69.
- Lomer C.J. and Prior C. 1992. *Biological control of locusts and grasshoppers.* CAB International, Wallingford, UK.
- Lomer C.J., Prior C. and Kooyman C. 1997. Development of *Metarhizium* spp. for the control of grasshopper and locusts. *Mem. Entomol. Soc. Canada.* 171 : 265–286.
- Lomer C.J., Bateman R.P., Johnson D.L., Langewald J. and Thomas M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu. Rev. Ent.* 46 : 667–702.
- Magalhaes B.P., Lecoq M., Defaria M.R., Schmidt F.G.V. and Guerra W.D. 2000. Field trial with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* against bands of the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* in Brazil. *Biocontrol Sci. Technol.* 10 : 427–441.
- Marcela M., Enrique A.I., Enrique Q.M., Cándido S.A., Enrique M. and Rosa H. 2006. Detection of potentially valuable polymorphisms in four group I intron insertion sites at the 3'-end of the LSU rDNA genes in biocontrol isolates of *Metarhizium anisopliae*. *BioMed Central Microb.* 6(77).
- Michael J.B., Andrena M.K., Michael L., Jason D. and Amritha D.C.J.N.. 2000. Habitat Association in Two Genetic Groups of the Insect - Pathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* : Uncovering Cryptic Species?. *Appl Environ Microb.* 67(3) : 1335-1342.
- Milner R.J. 1997. Insect pathogens how effective are they against soil insect pests? In: Allsopp, P.G., Rogers, D.J., Robetson, L.N. (Eds.), *Soil Invertebrates in 1997.* In: Proceedings of the Third Brisbane Workshop on Soil Invertebrates. Bureau of Sugar Experiment Station. *Brisbane Paddington, Australia,* pp. 63–67.
- Milner R.J. 2003. Application of biological control agents in mound building termites experiences with *Metarhizium* in Australia. *Sociobiol.* 41 : 419–428.
- Milner R.J. and Pereire R.M. 2000. Microbial control of urban pests cockroaches, ants and termites. In : Lacey, L.A., Kaya, H.K. (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate*

- Pathology. *Kluwer Academic Publisher, Boston*, pp. 721–740.
- Milner R.J. and Staples J.A. 1996. Biological control of termites : results and experiences within a CSIRO project in Australia. *Biocontrol Sci. Technol.* 6 : 3–9.
- Neves P.J. and Alves S.B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Buill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Braz. Arch. Biol. Technol.* 43 : 373–378.
- Osbrink W.L.A., Williams K.S., Connick Jr.W.J., Wright M.S. and Lax A.R. 2001. Virulence of bacteria associated with the Formosan subterranean termite (Isoptera : Rhinotermitidae) in New Orleans, LA. *Environ. Entomol.* 30 : 443–448.
- Ricardo H. R. D., Suzete A.D. and Claudio L. M. 2004. Detection of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* within infected sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae) using specific primers. *Gene and Molecular Biol.* 2(27) : 245-252.
- Sasaki F., Miyamoto T., Tamai Y. and Yajima T. 2007. Note on *Cordyceps brongniartii* Shimazu collected from the wild in Japan. *Mycosci.* 48 : 312-315.
- Smith T.F. and Waterman M.S. 1981. Identification of common molecular subsequences. *Molecular Biol.* 147 : 195-197.
- Yendol W.G. and Paschke J.D. 1965. Pathology of an entomophthora infection in the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* (Kollar). *Invertebr. Pathol.* 7 : 414–422.
- [Online]. Available : http://a32.lehman.cuny.edu/molbio_course/agarose1.htm
- [Online]. Available : <http://bip.weizmann.ac.il/edu.html>
- [Online]. Available : <http://dna.kps.ku.ac.th/mcrop/linkageMap/genomeMapping.doc>
- [Online]. Available : <http://web.ku.ac.th/schoolnet/snet4/anatomy/bug.htm>
- [Online]. Available : <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/charm2.htm>
- [Online]. Available : <http://www.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>
- [Online]. Available : <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>
- [Online]. Available : <http://www.embl-heidelberg.de/>
- [Online]. Available : <http://www.invasive.org/hwa/pathogens.cfm>
- [Online]. Available : http://www.ipst.ac.th/ThaiVersion/publications/in_sci/termite.html
- [Online]. Available : <http://www.irm.pdx.edu/~newman1/SynRRNA.GIF>
- [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online].Available : <http://www.school.net.th/library/snet4/genetics/pcr.htm>

[Online].Available : <http://www.thirawat.com/moodle/mod/resource/view.php?id=43>



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

การนับจำนวนสปอร์

ก่อนการเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อ ควรทราบวิธีการใช้เครื่องมือวัดความเข้มข้นที่เรียกว่า haemocytometer ซึ่งเป็นอุปกรณ์ขนาดเล็กมีรูปร่างลักษณะของ haemocytometer คล้ายสไลด์ที่มีความหนามากกว่าสไลด์แก้วธรรมดา ดังภาพที่ 6.1 ตรงกลางมีร่องเป็นรูปตัว H ซึ่งทำให้เกิดบริเวณที่ใช้ในการตรวจนับขึ้น 2 บริเวณ ตรงกลางตัว H ซึ่งทำเป็นสเกลที่ใช้ในการตรวจนับเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารแขวนลอย เช่น สปอร์ หรือเซลล์ต่าง ๆ



ภาพที่ 6.1 แสดงลักษณะและขนาด (แท้จริง) ของ Haemocytometer

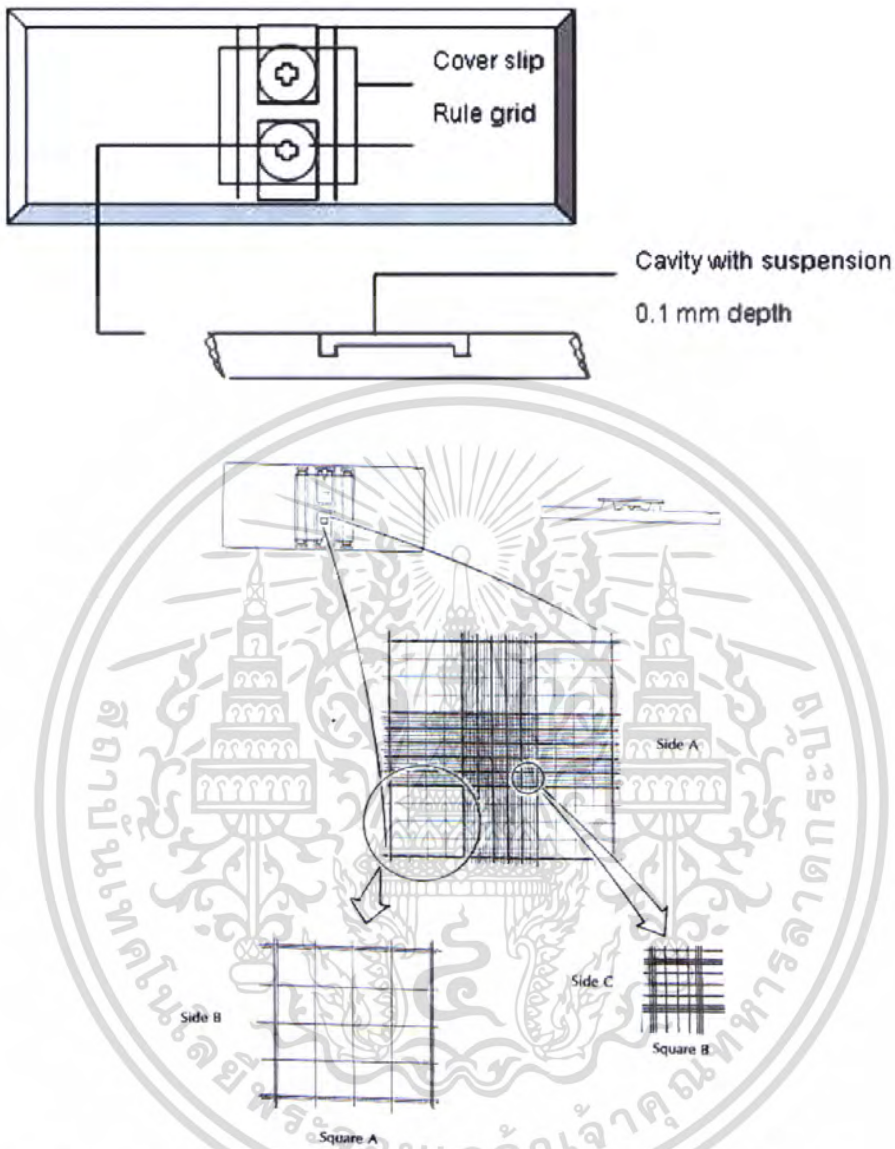
1 ลักษณะของ Haemocytometer ดังภาพที่ 6.2

เป็นแผ่นแก้ว มีความหนา ใส และบริเวณกลางแผ่นเป็นพื้นที่เรียบ เรียกว่า floor pieces มีขอบสำหรับวางกระจกปิดสไลด์เพื่อให้ความลึก 0.1 ตารางมิลลิเมตร

พื้นที่เรียบตรงกลาง chamber แบ่งเป็น 2 ด้าน สามารถนับจำนวนสปอร์ได้ 2 ค่า (double counting)

พื้นที่เรียบประกอบด้วย ตาราง 3 x 3 ตารางมิลลิเมตร แบ่งเป็น 9 ช่อง ช่องละ 1 x 1 ตารางมิลลิเมตร พื้นที่มุมบนซ้ายขวา และล่างซ้ายขวา ทั้งหมด 4 ช่อง แต่ละช่องแบ่งออกเป็น 16 ช่องเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6.2 แสดงลักษณะ และตำแหน่ง สำหรับการตรวจนับจำนวนตัวอย่าง เช่น สปอร์ของ เชื้อรา ด้วย Haemacytometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียม และการวัดความเข้มข้นของสารละลายสปอร์

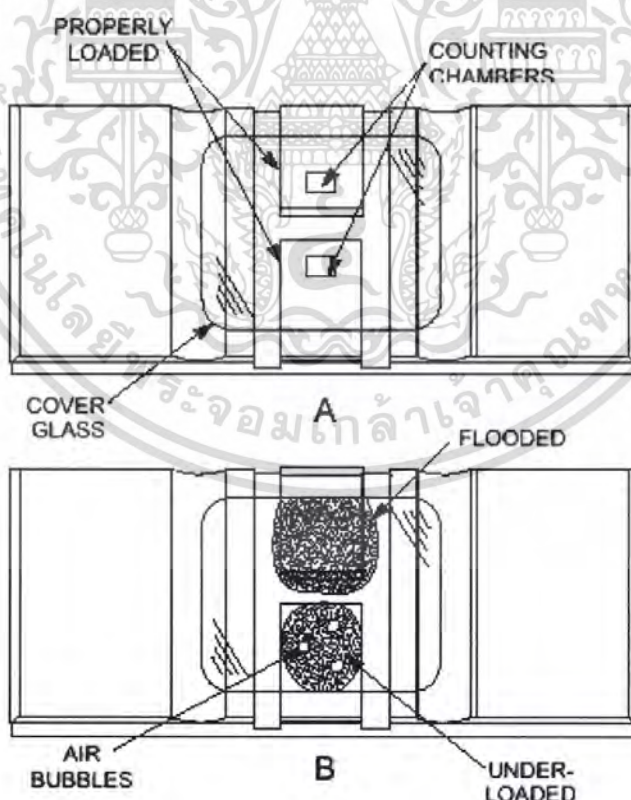
2.1 ทำการเลี้ยงเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลตลงบนอาหารเยิง (PDA) เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องประมาณ 2 สัปดาห์

2.2 ใช้น้ำกลั่นที่ผสม tween 80 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการละลายสปอร์ โดยการเทน้ำกลั่นลงในหลอดอาหารเยิง จากนั้นใช้ลูปชุคเบา ๆ บริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้สปอร์มาละลายอยู่ในน้ำกลั่น

2.3 จากนั้นนำสารละลายสปอร์ถ่ายใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ (มาเชื้อแล้ว)

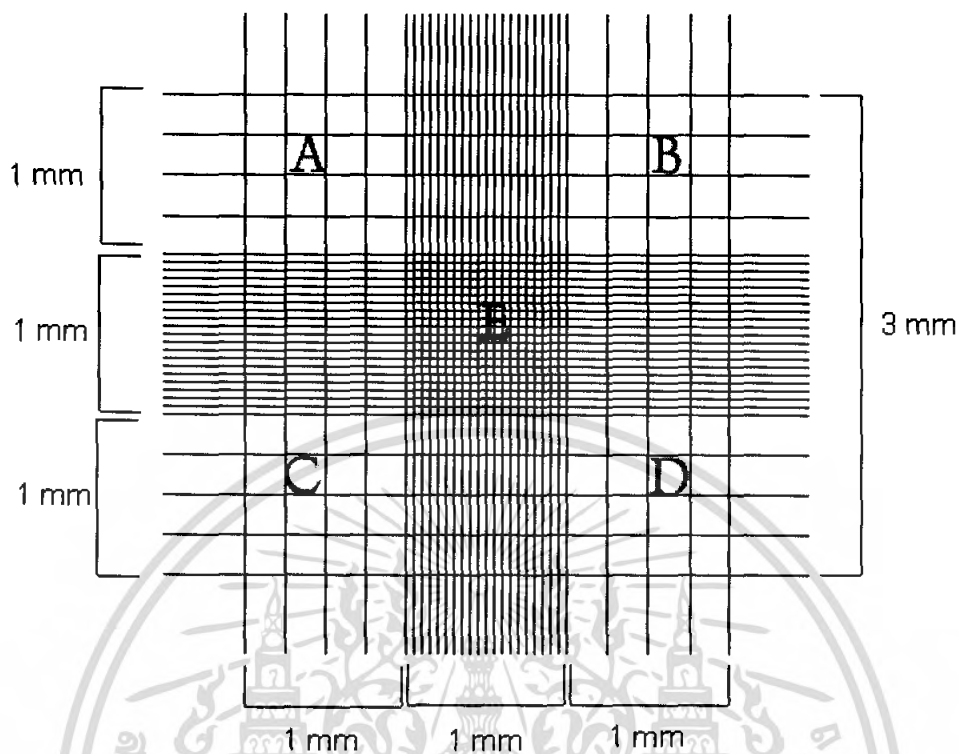
2.4 ทำการเจือจางสารละลายสปอร์ให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} และ 10^{-4}

2.5 ทำการนับจำนวนสปอร์ที่อัตราการเจือจาง 10^{-3} ด้วย Haemocytometer โดยใส่สารละลายสปอร์ลงใน haemocytometer ดังรูปที่ 6.3 แล้วคำนวณค่าความเข้มข้นของสารละลายสปอร์



ภาพที่ 6.3 แสดงบริเวณในการใส่สารละลายสปอร์ลงบน Haemocytometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6.4 แสดงบริเวณที่ใช้นับจำนวน A, B, C D และ E (Counting areas) ตัวอย่างที่ต้องการคำนวณหาความเข้มข้น

3 การคำนวณหาความเข้มข้น โดยใช้ Haemocytometer

3.1 ในกรณีทีสปอร์หรือเซลล์ที่ต้องการนับมีขนาดเล็กการนับควรใช้บริเวณ E ตรงกลาง ดังรูปที่ 6.4 ซึ่งประกอบด้วยช่องสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก (Small squares) ทั้งหมด 25 ช่อง และแต่ละช่องเล็กนั้นจะประกอบด้วยช่องขนาดเล็กที่สุด (Smallest squares) อยู่ 16 ช่อง การนับสปอร์จำนวนทั้งหมดที่อยู่ในบริเวณนี้ รวมทั้งสปอร์ที่อยู่ในขอบของตารางทุกช่องด้วย

3.2 พื้นที่บริเวณ E เท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400$ ตารางมิลลิเมตร

3.3 หากคิดเป็นปริมาตร (มีความลึก $1/10$ มิลลิเมตร) จะเท่ากับ $25 \times 16 \times 1/400 \times 1/10$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

3.4 สมมตินับสปอร์ในบริเวณ E ได้รวมทั้งหมดเท่ากับ Y สปอร์ ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

3.5 ต้องการเทียบความเข้มข้นในหน่วย 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรหรือ 1 มิลลิลิตร ซึ่ง 1 มิลลิลิตร . เท่ากับ 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตรดังนั้น ในปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิเมตร นับสปอร์ได้ = Y สปอร์ถ้าใน 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 มิลลิลิตร) จะมีสปอร์ = $Y \times 1000 \times 1/0.1$ สปอร์

= $Y \times 1 \times 10^4$ สปอร์ต่อ มิลลิลิตรในกรณีสปอร์ หรือ เซลล์มีขนาดใหญ่ ควรนับจำนวนสปอร์หรือ เซลล์ทุกบริเวณ A B C D และ E จากนั้นนำค่าที่ได้มารวมกัน และหาค่าเฉลี่ยโดยหารด้วย 5 อีกครั้ง ก่อนนำไปคำนวณความเข้มข้น เช่น สมมุติว่าจำนวนสปอร์ได้รวมกันเท่ากับ Z สปอร์ ดังนั้นความเข้มข้นของสปอร์ต่อ 1 มิลลิลิตร . = $Z/5 \times 1 \times 10^4$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.7 การตรวจนับความเข้มข้นจะให้ผลใกล้เคียงมากที่สุด จะต้องทำให้ สารละลายกระจายตัวมากที่สุด หรืออาจจำเป็นจะต้องมีการนับมากกว่าครั้งขึ้น เช่น 5-10 ครั้ง แล้วจึง นำมาหาค่าเฉลี่ยภายหลัง หรือบางครั้งอาจจำเป็นต้องเติมสารลดแรงตึงผิวเช่น tween 20 ลงไปเพื่อ ช่วยให้สปอร์ หรือ เซลล์ กระจายตัวได้ดีขึ้น (ทั้งนี้เพื่อให้การคำนวณความเข้มข้นถูกต้องแม่นยำ มากขึ้น) จากนั้นจึงใช้ หลอดหยดสาร หยดสารละลายของเชื้อลงบนสเกลของ haemocytometer ข้างละ 1 หยด จากนั้นใช้กระจกปิดสไลด์ปิดทับ กดเบา ๆ หากใส่หยดของสารละลายสปอร์พอดีจะ ไม่มีเชื้อเหลือล้นออกมาจากสไลด์

4 วิธีทำความสะอาด Haemocytometer และกระจกปิดสไลด์

ล้างด้วยน้ำเปล่าสะอาด และน้ำกลั่นเท่านั้น

เช็ดให้สะอาดด้วยผ้าผิวเรียบ ไม่มีขน ไม่ควรใช้กระดาษทิชชู เพราะจะมีเศษผง กระดาษติด ทำให้รบกวนสายตาวลานับเม็ดเลือด

ไม่ควรใช้นิ้วมือแตะบริเวณพื้นที่ใช้นับเม็ดเลือด เพราะจะทำให้เกิดรอยนิ้วมือ รบกวนการนับได้

ระมัดระวังอย่าให้บริเวณที่ใช้นับเม็ดเลือดมีรอยขีดข่วน

ภาคผนวก ข

1. โปรแกรม BioEdit (biological sequence editor)

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

นอกจากคุณสมบัติเด่นของตัวซอฟต์แวร์ที่เป็น freeware (สามารถดาวน์โหลดมาใช้งานได้โดยไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย) ที่มีวิธีการใช้งานไม่ยุ่งยากซับซ้อน อีกทั้งยังมีลักษณะของส่วนติดต่อกับผู้ใช้แบบ graphic interface ทำให้โปรแกรมง่ายต่อการใช้งานแล้ว โปรแกรม Bio Edit ยังได้รวบรวมเอาความสามารถและแอปพลิเคชันต่างๆ ที่ช่วยในการศึกษาวิเคราะห์ทั้งทางด้านนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอ/อาร์เอ็นเอ และโปรตีนซึ่งเป็นประโยชน์กับนักชีววิทยาเอาไว้เป็นจำนวนมากซึ่งในที่นี้จะยกตัวอย่างดังต่อไปนี้

โปรแกรม BioEdit สามารถรองรับ interput file ที่นำมาศึกษาได้หลายรูปแบบ (format) เช่น fasta phylip genbank เป็นต้น

มีคุณสมบัติ multiple document interface คือ สามารถเปิดหน้าต่างการทำงานขึ้นมาได้พร้อมๆกันได้เป็นจำนวนมากสุดถึง 20 หน้าต่างการทำงาน และสามารถทำงานกับจำนวนเบสมากกว่า 20000 เบสในคราวเดียว

โปรแกรมมีความยืดหยุ่นสูงในการศึกษาด้านลำดับเบส (Sequence) การเปรียบเทียบดีเอ็นเอ (Alignment) ยกตัวอย่างเช่น Select/Slide, Grab/Drag, Edit Mode ซึ่งทำให้สะดวกในการคัดแปลงแก้ไขผลของการทำ Manual หรือ Computational sequence alignment

ในการศึกษาการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ โปรแกรม Bio Edit ก็มีเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ในแง่ของ comparative analysis(covariation,potential pairing) และ mutual information analysis

ในการศึกษาการวิเคราะห์โปรตีน โปรแกรมสามารถช่วยวิเคราะห์ได้ทั้งการหาส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) คุณสมบัติการละลายน้ำของ โปรตีน

โปรแกรม Bio Edit ยังได้รวบรวมแอปพลิเคชันต่าง ๆ ที่นิยมใช้ทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์นี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมเทศเอาไว้ ซึ่งสามารถเชื่อมการทำงานผ่าน graphic interface ของโปรแกรม Bio Edit ได้โดยอัตโนมัติ เช่น Custal W ซึ่งช่วยในการศึกษาด้าน Computational sequence alignment หรือ PHYLIP application ซึ่งช่วยในการศึกษาด้านแผนภูมิวิวัฒนาการ นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ผู้ใช้สามารถกำหนดการเชื่อมต่อกับแอปพลิเคชันอื่นๆที่ต้องการโดยการกำหนดตามพารามิเตอร์ที่มีอยู่

ความสามารถในการเชื่อมต่อไปยังเว็บไซต์ทางด้านชีวสารสนเทศ (World Wide Web bookmark) ผ่านทางอินเทอร์เน็ตซึ่งผู้ใช้สามารถกำหนดได้

การใช้งานทั่วไปของโปรแกรม BioEdit

หน้าต่างการทำงานพื้นฐาน หรือเรียกว่า basic Bioedit alignment document window ซึ่งไม่ว่าจะเป็น แบบตัวอักษร(front) สีของพื้นหลัง (backgroundcolor) สีตัวอักษร (residues color) และชื่อของวินโดวส์ (title window) ผู้ใช้สามารถทำการเปลี่ยนรูปแบบให้เหมาะสมตามการใช้งานได้

ยกตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงทางคุณสมบัติ โดยผู้ใช้จะสังเกตได้ว่าเมื่อนำเมาส์ไปชี้ที่ตำแหน่งอักขรตัวใดตัวหนึ่งในลำดับเบส จะปรากฏกรอบข้อความสีเหลืองซึ่งจะมีรายละเอียดของชื่อ ลำดับเบสแต่ละตำแหน่ง (position) ระบุอยู่ซึ่งสร้างความสะดวกเมื่อทำการศึกษาด้านต่างๆ อย่างไรก็ตาม ผู้ใช้สามารถกำหนดคลิกฟังก์ชันดังกล่าวได้โดยเลือกเข้าไปที่คำสั่ง sequence position by mouse arrow เป็นต้น

ในส่วนของฟังก์ชันชุดคำสั่งที่เกี่ยวข้องกับการทำ manual alignment ประกอบไปด้วย

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

Edit mode: การใช้งานในโหมดนี้ ผู้ใช้สามารถเลื่อนเคอร์เซอร์ที่เกิดการคลิกซ้าย ไปยังบริเวณใดก็ได้ในช่วงใดก็ได้ในช่วงข้อมูลที่สนใจ และสามารถทำการเปลี่ยนแปลงแก้ไข หรือเพิ่มเติมข้อมูล ได้เช่นเดียวกับการพิมพ์ในโปรแกรม word processing อื่นๆ โดยประกอบไปด้วย 2 โหมดย่อยคือ insert และ overwrite

Grab & Drag mode: สามารถเลือกที่ speed button ที่ปุ่ม G/D ได้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โหมดที่ผู้ใช้สามารถเลือกการเคลื่อนที่ข้อมูล(residue) ครั้งละ 1 ตัวเท่านั้นเช่นกันสามารถใช้ shift key ในการเลือกให้ช่วงข้อมูลที่อยู่ด้านหลังตัวที่เลือกเคลื่อนที่ไปพร้อมๆกันได้

โปรแกรม PHYLIP

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม มีความสำคัญในการจัดจำแนกกลุ่มและศึกษาถึงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ในปัจจุบันนี้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมาก ในแง่ของ Phylogenetic tree building method ซึ่งในที่นี่จะยกตัวอย่างเครื่องมือชีวสารสนเทศ ซึ่งเป็นที่นิยมมากคือ PHYLIP Package ด้วยความสามารถของโปรแกรมที่ดาวน์โหลดมาใช้งานได้เต็มรูปแบบโดยที่ไม่ต้องเสียค่าใช้จ่าย อีกทั้งโปรแกรมยังถูกออกแบบมาให้ผู้ใช้สามารถปรับแต่งค่าพารามิเตอร์ ต่าง ๆ ได้ตามต้องการ ทำให้รองรับการศึกษาในด้านกรวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree analysis) ทุกรูปแบบ

2.1 รายละเอียดของโปรแกรม

โปรแกรม PHYLIP เป็นลักษณะของโปรแกรมที่ใช้งานได้โดยไม่เสียค่าบริการ ถูกเขียนขึ้นโดย Joe Felsenstein ซึ่งขณะนั้นศึกษาอยู่ในคณะ Genome Sciences ที่ Washington University ส่วนเวอร์ชัน ที่นำมายกตัวอย่างนี้คือ 3.6 alpha อัปเดตเมื่อ 29/07/02 สนับสนุนการทำงานในระบบปฏิบัติการ Windows 3.x/9x/Me/NT/XP, DOS, PowerMac, and 68k Macintosh systems

โปรแกรม PHYLIP ประกอบไปด้วย phylogenetic analysis method มากมาย เช่น distance matrix, parsimony, likelihood method อีกทั้งยังมีความยืดหยุ่นในการปรับค่าการทำงานอีกด้วย แต่เนื่องจากโปรแกรม PHYLIP ถูกออกแบบมาให้ทำงานในลักษณะของ DOS โหมดอีกทั้งรายละเอียดที่กำหนดยังมีเป็นจำนวนมาก เช่น ต้องทำการเปลี่ยนชื่อไฟล์ ที่จะนำมาใช้กับแอปพลิเคชันของ PHYLIP เป็นชื่อ infile ทุกครั้งทำให้ผู้เริ่มต้นใช้อาจเกิดความไม่คุ้นเคยได้ อย่างไรก็ตามก็ขอให้ผู้จัดทำการศึกษาจากตัวอย่างที่จะได้ทำการสาธิตในลำดับต่อไป

2.2 เนื่องจากตัวอย่างจะนำหลักการของ Phylogenetic tree construction ด้วยวิธี distance matrix method มาอธิบายจึงขอทำความเข้าใจในส่วนของขั้นตอนสำคัญซึ่งมีดังต่อไปนี้

2.2.1 การทำการเปรียบเทียบจัดเรียงลำดับ(alignment) ของข้อมูลทั้งหมด ด้วยโปรแกรมอื่นๆ เช่น ClustalW, ClustalX เป็นต้น

2.2.2 การเลือก substitution model ที่เหมาะสมกับข้อมูล ซึ่งในตัวอย่างจะเลือก Distance matrix method

2.2.3 ขั้นตอนของ tree construction โดยอาศัยแอปพลิเคชันของ PHYLIP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tree evaluation เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการปรับแต่งแผนภูมิวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม tree viewer / editor เช่น TreeView32

2.2.4 เพื่อให้การสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการสมบูรณ์แบบ ในขั้นตอนที่ 1 และ 4 จำเป็นต้องอาศัยโปรแกรมอื่นๆ มาทำหน้าที่ดังกล่าว (association tools) ซึ่งในตัวอย่างนี้จะประกอบไปด้วย

- ClustalX : ใช้ในการทำการจัดเรียงลำดับ ข้อมูลเริ่มต้นเป็นเวอร์ชันที่สามารถทำงานบนระบบปฏิบัติการ Windows ซึ่งสามารถหาดาวน์โหลดได้โดยไม่มีค่าใช้จ่ายที่ <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>
- TreeView32 : เป็นโปรแกรม Tree viewer/editor สามารถหาดาวน์โหลดได้โดยไม่มีค่าใช้จ่ายที่ <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>

การทำ HAND ON SECTION

ตัวอย่างที่จะทำการสาธิตต่อไปนี้เป็นกรนำข้อมูลลำดับเบสของยีนที่ใช้สร้าง envelope ของ immuno-deficient virus 3 กลุ่ม (HIV, SIV, FIV) มาศึกษาโดยใช้การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ในการจำแนกจัดกลุ่มจำนวนทั้งสิ้น 12 ลำดับ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : เริ่มต้นด้วยขั้นตอนการจัดเรียงลำดับเบส โดยใช้โปรแกรม ClustalX โดยการดับเบิลคลิกที่ไอคอน(ClustalX.exe) จากนั้นเลือกคำสั่งFile>Load Sequences เปิดไฟล์ที่ชื่อ virusenv.txt

ขั้นตอนที่ 2 : ใช้คำสั่งผ่านเมนู Edit>Select All Sequences เพื่อเลือกลำดับเบสทั้งหมดที่ต้องการทำงานด้วยจะเกิดแถบสีดำ จากนั้นเข้าไปคลิกในส่วนเมนูคำสั่ง Alignment>Output Format Option จะปรากฏหน้าต่างให้กำหนดค่าต่างๆ เนื่องจาก โปรแกรม PHYLIP ต้องอาศัยข้อมูลเริ่มต้นที่ผ่านการจัดเรียงลำดับเบสแล้ว และต้องอยู่ในรูปของ PHYLIP format จากนั้นกด CLOSE

ขั้นตอนที่ 3 : ใช้คำสั่งผ่านเมนู Alignment> Do Complete Alignment

ขั้นตอนที่ 4 : เมื่อเลือกจะปรากฏหน้าต่างขึ้นมาใหม่บอกตำแหน่งและชื่อไฟล์ ของผลที่จะได้จากการจัดเรียงลำดับเบสด้วยโปรแกรม ClustalX โดยอัตโนมัติโปรแกรมจะทำนาย phylogenetic guide tree ให้ด้วยซึ่งจะบันทึกอยู่ในไฟล์ที่มีนามสกุล dnd และไฟล์ Alignment ซึ่งจะมีนามสกุลเป็น phy

ขั้นตอนที่ 5 : เมื่อเลือกที่คำสั่ง ALIGN โปรแกรมจะเริ่มการทำงาน เมื่อเสร็จสมบูรณ์จะ

แสดงผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 6 : จากขั้นตอนที่ 5 เมื่อเข้าไปยัง folder ที่จัดเก็บผลการจัดเรียงลำดับเบสจะพบกับไฟล์ที่มี 2 แบบ คือ VirusEnv.phy และ VirusEnv.dnd ซึ่ง VirusEnv.phy จะสามารถเปิดดูได้โดยอาศัยโปรแกรม text editor เช่น notepad หรือ wordpad ส่วน VirusEnv.dnd ซึ่งเป็น guide tree สามารถเปิดได้ด้วยโปรแกรมประเภท tree viewer เช่น Tree View

ขั้นตอนที่ 7 : จากขั้นตอนที่ 6 ให้ใช้คำสั่ง rename (ใช้เมาส์คลิกขวาที่ชื่อไฟล์จะปรากฏเมนูคำสั่ง) ทำการเปลี่ยนชื่อ VirusEnv.phy เป็น infile โดยไม่ต้องใส่นามสกุลแล้วเลื่อนย้าย infile ไปไว้ในโฟลเดอร์ “exe” ของโปรแกรม PHYLIP เพื่อเตรียมพร้อมในการนำไปใช้กับชุดโปรแกรม PHYLIP

ขั้นตอนที่ 8 : จากขั้นตอนที่ 7 จะเริ่มการทำงานจากโปรแกรม seqboot.exe เป็นการทำ bootstrapping ทำให้เกิดชุดข้อมูลจำนวนมาก เป็นประโยชน์นำไปใช้ในการคำนวณเพื่อการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) วิธีการคือ คัดเบิ้ลคลิกที่ไอคอน seqboot จะปรากฏหน้าต่าง

ซึ่งวิธีการเปลี่ยนแปลงค่าต่างๆ สามารถทำได้โดยการพิมพ์ตัวอักษรนำหน้าในแต่ละแถวที่ต้องการเปลี่ยน ยกตัวอย่าง ยกตัวอย่างเช่นต้องการเปลี่ยนจำนวนชุดข้อมูล replicates ในแถว R จาก 100 เป็น 1000 ชุด ให้ผู้ใช้พิมพ์อักษรนำหน้าแถวคือ R แล้วกด enter โปรแกรมจะขึ้นคำถามให้ใส่จำนวน 1000 แล้วกด enter จะสังเกตตัวเลขเปลี่ยนเป็น 1000

จากนั้นให้ใช้วิธีเดิมเปลี่ยนค่ากลับเป็น 100 ดังเก่า จากนั้นตอบตกลงค่าที่ตั้งไว้โดยการกด y แล้ว enter โปรแกรมจะถามค่า random number seed (เป็นค่าตัวเลขสุ่ม) ให้ใส่ 777 แล้ว enter เริ่มการทำงานโดยอัตโนมัติ (ความเร็ว-ช้า จะขึ้นกับจำนวนและขนาดของข้อมูลที่นำมาศึกษา) เมื่อเสร็จหน้าต่างสีฟ้าจะหายไป ก่อนจะปรากฏผลที่ได้เป็นไฟล์ที่ชื่อ outfile

ขั้นตอนที่ 9 : จากขั้นตอนที่ 8 ถ้าต้องการบันทึก input เดิมเก็บไว้ให้ใช้คำสั่ง cut / paste ไปไว้ในโฟลเดอร์อื่นที่ต้องการ จากนั้นอาจใช้คำสั่ง rename เปลี่ยนไฟล์เป็นชื่ออื่นๆ ได้ส่วน outfile ที่ได้มาใหม่นั้น จะสามารถนำไปผ่านกระบวนการต่อไปได้จะต้องทำการเปลี่ยนชื่อเป็น infile จากนั้นจึงเรียกใช้โปรแกรมต่อไปคือ “dnadist.exe”

ให้ทำการเปลี่ยนแปลงค่าต่างดังต่อไปนี้

- เปลี่ยนค่า Distance จาก F84 เป็น Kimura 2-parameter โดยการกด D แล้ว enter
- เปลี่ยนค่า form matrix จาก Square เป็น Lower- triangular โดยการกด L แล้วกด enter

- กำหนด multiple data sets โดยการกด M แล้ว enter จากนั้น โปรแกรมจะถามว่าต้องการใช้ข้อมูลเป็น multiple data set จากนั้น โปรแกรมจะถามจำนวน data set ในตัวอย่างนี้ที่เรากำหนดในขั้นตอนที่ 8 มีค่า 100 จากนั้นกด enter
- เมื่อกำหนดค่าทั้งหมดจะได้ดังรูป หลังจากนั้นให้กด Y แล้ว enter เพื่อให้โปรแกรมเริ่มทำงาน เมื่อทำงานเสร็จแล้ว หน้าจอสีฟ้าก็จะหายไปแล้วได้ผลมาในรูปแบบ outfile อีกครั้งหนึ่ง

ขั้นตอนที่ 10 : Outfile จากขั้นตอนที่ 9 จะถูกคำนวณหาความสัมพันธ์ตาม distance matrix method โดยอาศัย Kimura 2-parameter ซึ่งผู้ใช้สามารถใช้ text editor เช่น notepad เปิดดูได้จะเห็นลักษณะของข้อมูลที่ปรากฏดังรูป 23 ซึ่งจะมีตัวเลขบอกความสัมพันธ์ระหว่างลำดับเบสกำหนดไว้ซึ่งจะนำไปใช้ในการสร้างเป็น phylogenetic tree ในลำดับต่อไป และดังที่จะเห็นจะเป็นลักษณะข้อมูลที่อยู่ในแบบ Lower triangular form ตามที่กำหนด และหากผู้ใช้ เลื่อนดูข้อมูลจะพบว่า มีจำนวนรูปแบบที่หลากหลาย แตกต่างกันไปทั้งหมด 100 data sets เช่นกัน

ขั้นตอนที่ 11 : ทำการเปลี่ยน outfile เป็นชื่อ infile อีกครั้ง (อย่าลืมลบ หรือย้าย infile ของเก่าออกไปเสียก่อน) จากนั้นเรียกใช้โปรแกรมต่อไปคือ neighbor.exe

ให้ทำการเปลี่ยนแปลงค่าต่างดังต่อไปนี้

- เปลี่ยนค่า outgroup จาก 1 เป็น 12 โดยการกด 0 แล้ว enter แล้วใส่ตัวเลข 12 enter
- กำหนดข้อมูลเริ่มต้น เป็น Lower-triangular โดยการกด L แล้ว enter
- กำหนด multiple data sets โดยการกด M แล้ว enter จากนั้น โปรแกรมจะถามจำนวน data sets ในตัวอย่างนี้ที่เรากำหนดในขั้นตอนที่ 8 มีค่า 100 จากนั้นกด enter แล้วตามด้วยเลข random number seed ที่ใช้คือ 777 แล้ว enter
- เมื่อกำหนดค่าทั้งหมดจะได้ดังรูป 25 หลังจากนั้นให้กด Y แล้ว enter เพื่อให้โปรแกรมเริ่มทำงานเสร็จแล้ว หน้าจอสีฟ้าก็จะหายไป

ผลที่ได้จากขั้นตอนที่ 10 นอกจาก outfile ตามปกติแล้วยังจะมีผลที่ชื่อ Outtree ออกมาด้วย ซึ่งในกรณีของ outfile เมื่อเปิดด้วย text editor เช่น notepad จะเป็นข้อมูลในลักษณะรายละเอียดข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

จากนั้นให้ลบหรือย้าย infile ของเก่าไปจากโฟลเดอร์แล้วใช้คำสั่ง rename เปลี่ยนชื่อจาก outfile เป็น infile

และ Outtree เป็น intree

ขั้นตอนที่ 12 : ผลที่ได้จาก ขั้นตอนที่ 11 จะนำมาผ่านขั้นตอนต่อมาคือการใช้โปรแกรม เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คัดเลือกรูปแบบ phylogenetic tree ที่น่าจะเป็นความเป็นไปได้ และถูกต้องมากที่สุดจาก multipleset 100 รูปแบบ ดังที่ดั่งไว้ โดยอาศัยโปรแกรม consense.exe โดยจำคำนวณจาก infile และ intree ที่เตรียมไว้แล้ว

ให้ทำการเปลี่ยนแปลงค่าต่างดังต่อไปนี้

- เปลี่ยนค่า outgroup จาก 1 เป็น 12 โดยการกด 0 แล้ว enter โดยใส่ตัวเลข 12 enter
- กำหนดข้อมูลเป็น root tree โดยการกด R แล้ว enter
- เมื่อกำหนดค่าทั้งหมดจะได้ดังรูป 29 หลังจากนั้นให้กด Y แล้ว enter เพื่อให้โปรแกรมเริ่มทำงาน เมื่อทำงานเสร็จแล้ว หน้าจอสีฟ้าก็จะหายไป

ผลที่ได้จะเป็น infile และ intree เช่นเดียวกับการใช้ neighbor.exe เมื่อลองเปิด outfile ด้วย text editor เช่น notepad จะเป็นข้อมูลในลักษณะรายละเอียดข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม คล้ายกับกรณีที่ได้จากการใช้ neighbor.exe แต่จะพบว่าข้อมูลมีความละเอียดมากขึ้นและแสดงเพียงรูปแบบเดียวเท่านั้น

ในส่วนของ Outtree นั้นสามารถใช้โปรแกรมประเภท tree editor/viewer เช่น TreeView32 จะได้ลักษณะของ tree จะเห็นได้ว่ามีเพียงรูปแบบเดียวซึ่งโปรแกรมจะทำการคัดเลือกรูปแบบ tree ที่ถูกต้อง และเป็นไปได้มากที่สุดมาแสดงซึ่งจะพบว่า virus ในกลุ่ม HIV subtype B ซึ่งแยกมาจากผู้ป่วยที่ต่างกันทั้งสิ้น 5 sequences ก็จะคล้ายคลึงอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ขณะที่ HIV subtype E ก็จะถูกแยกออกไป แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม immunodeficiency virus อื่นๆ แล้ว HIV ทั้งสอง subtype ก็มีความใกล้เคียงกันมากกว่า โดยดูจากของ branch tree ที่แสดงให้เห็น

ขั้นตอนที่ 13 : ผลที่ได้จากขั้นตอนที่ 12 ผู้ใช้สามารถที่จะตกแต่ง หรือเลือกรูปแบบของ tree ในลักษณะต่างๆ จากเมนูของโปรแกรม TreeView32 ได้ ดังที่แสดงให้เห็นในรูปด้านล่างทั้งหมด จากนั้นสามารถเลือกการบันทึกเพื่อเก็บเป็นข้อมูล หรือ เลือกคำสั่ง print เพื่อพิมพ์ข้อมูลออกมาในลักษณะของการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม(phylogenetic tree) ได้เป็นอันเสร็จสิ้น ขั้นตอนการใช้ชุด โปรแกรม PHYLIP

สรุป

ในการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเป็นการศึกษาหาความสัมพันธ์และจัดจำแนกกลุ่มของสิ่งมีชีวิต โปรแกรม PHYLIP ถูกออกแบบมาให้ทำงานร่วมกับแอฟพลิคชัน (เช่น ClustalX, TreeView32) ในขั้นตอนของการหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยที่จุดเด่นของโปรแกรมอยู่ที่รวบรวม methods และ parameter ทางด้านนี้เอาไว้อย่างมากมาย คลอบคลุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาในหลายรูปแบบ ดังที่ได้ยกตัวอย่างไว้ในที่นี้ ซึ่งเป็นลักษณะข้อมูลที่วิเคราะห์ด้วย distance matrix method ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่ผู้ใช้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ให้เหมาะสมได้

อย่างไรก็ดีเนื่องจากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการจัดหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิต มีรายละเอียดหลายอย่างที่ค่อนข้างซับซ้อน จึงไม่อาจอธิบายในที่นี้ได้ทั้งหมด จึงเป็นหน้าที่ของผู้ใช้ที่จำเป็นจะต้องศึกษาเพิ่มเติม โดยอาจหาอ่านได้จาก document ไฟล์ ของโปรแกรม เพื่อให้มีความเข้าใจและจะต้องศึกษาข้อมูลมาเป็นอย่างดี ก่อนที่จะนำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ทั้งนี้เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้องและน่าเชื่อถือมากที่สุด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

สูตรอาหาร

1. SDAY (Sabouraud Dextrose Agar with Yeast extract)

1.1 dextrose	10	กรัมต่อลิตร
1.2 peptone	2.5	กรัมต่อลิตร
1.3 yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
1.4 agar	20	กรัมต่อลิตร

2. SDB (Sabouraud Dextrose Broth)

2.1 dextrose	10	กรัมต่อลิตร
2.2 peptone	2.5	กรัมต่อลิตร
2.3 yeast extract	5	กรัมต่อลิตร

3. PDA (Potato Dextrose Agar)

3.1 potato infusion	200	กรัมต่อลิตร
3.2 glucose	20	กรัมต่อลิตร
3.3 agar	20	กรัมต่อลิตร

4. PDB (Potato Dextrose Broth)

4.1 potato infusion	200	กรัมต่อลิตร
4.2 glucose	20	กรัมต่อลิตร

5. Water Agar ผสมยาปฏิชีวนะ

5.1 agar	15	กรัมต่อลิตร
5.2 chloremphenycal	1	กรัมต่อลิตร
5.3 cyclohexamide	0.5	กรัมต่อลิตร

6. DG 18 ผสมกลีเซอรอล

7. วิธีการเตรียมน้ำกลั่นผสม tween 80

7.1. น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
7.2. tween 80	2	หยด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. วิธีการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- 8.1 ชั่งสาร Tris base ปริมาตร 108 กรัม
 - 8.2 ชั่งสาร Boric acid ปริมาตร 55 กรัม
 - 8.3 ละลายสารที่ชั่งทั้ง 2 ใน สารละลาย EDTA พีเอช 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
 - 8.4 ปรับปริมาตรจนครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น
 - 8.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

9. วิธีการเตรียมสารละลาย EDTA พีเอช 8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
- 9.1 ชั่ง EDTA 93.06 กรัม
 - 9.2 ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแม่เหล็ก (magnetic bar) ช่วยในการละลาย โดยสามารถให้ความร้อนได้เล็กน้อย
 - 9.3 ทำการปรับให้ได้พีเอช 8 และปรับปริมาตรจนมีปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร
 - 9.4 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

10. การเตรียมเอธิเดียมโบรไมด์
- 10.1 คุุคสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ลงในภาชนะที่เตรียมไว้
 - 10.2 คุุคสารละลาย บัฟเฟอร์TBE ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะแล้วทำการผสมให้เข้ากัน
 - 10.3 ทำการเก็บให้พ้นแสง

ภาคผนวก ง

บริษัทของสารที่ใช้ในแลป

1. primer ITS 1,4	invitrogen
2. PN 3,16	invitrogen
3. marker 50 bp	Biolaps
4. marker 100 bp	vivantis
5. marker 1000 bp	promega
6. dye	vivantis
7. chloramphenical	sigma
8. cyclohexamide	sigma
9. ชุด Tag DNA	vivantis
10. PDA	merck
11. PDA,PDB	scharlar
12. DG18	merck

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้