

การศึกษาด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* sp.

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF *Metarhizium* sp.

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์
NARUMON TANGTHIRASUNUM

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาด้านหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-012

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* sp.

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF *Metarhizium* sp.



นฤมล ตั้งธีระสุนันท์

NARUMON TANGTHIRASUNUN

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 110306
วัน,เดือน,ปี..... - 1 พ.ย. 2553

b. 12262687
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2553

KMITL-2010-SC-M-020-012

STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF *Metarhizium* sp.

NARUMON TANGTHIRASUNUN

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2010
KMITL-2010-SC-M-020-012**

COPYRIGHT 2010

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* sp.
Study on Genetic Diversity of *Metarhizium* sp.
นักศึกษา นางสาวณมล ตั้งธีระสุนันท์
รหัสประจำตัว 50068302
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	
รศ.ดร.เกษม สร้อยทอง	
รศ.ดร.อรินทิพย์ ชรรรมชัยพิเนต	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 11 มีนาคม พ.ศ. 2553 เวลา 09.00-12.00 น.
KING MONKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬาราม 1 คณะวิทยาศาสตร์ ห้อง 424


คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว
(รองศาสตราจารย์ ดร.คุณฉวี ชนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 24 เดือน ๕๑ พ.ศ. 53

สำนักทะเบียนและประมวลผล สจล.
วันที่ส่งเล่มวิทยานิพนธ์ฉบับสมบูรณ์
วันที่ 25 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2553
ลงชื่อ.....

ประเทศอื่น และจากเทคนิค PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Vsp* I สามารถแยกเชื้อราในกลุ่ม B และกลุ่ม C จากกลุ่ม E และกลุ่ม F ได้

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

into two distinct groups that were in clade B and clade C were successfully distinguished from clade E and clade F.

Keywords: *Metarhizium*, entomopathogenic fungi, ITS1-5.8S-ITS2

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการสอบ รศ.ดร. เกษม สร้อยทอง อาจารย์บัณฑิตประจำ และ รศ.ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ซึ่งกรุณาสละเวลา ให้คำปรึกษาแนะนำ และความรู้ตลอดการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณหน่วยงานศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติ กลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ พี เพื่อน และน้องซึ่งไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ ที่คอยให้กำลังใจ และความช่วยเหลือสนับสนุนทุกสรรพสิ่ง

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว สำหรับโอกาสในการศึกษาอันมีค่ายิ่ง และการสนับสนุนให้ผ่านความสำเร็จไปอีกครั้ง

นฤมล ตั้งธีระสุนันท์

มีนาคม 2553

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	IX
สารบัญรูป.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
บทที่ 2 ทฤษฎี และหลักการ.....	5
2.1 เชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	5
2.2 การนำเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ไปใช้ประโยชน์.....	7
2.3 การเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	8
2.4 สารที่พบในเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	9
2.4.1 Destruxin.....	9
2.4.2 Cytochalasin.....	10
2.4.3 Swainsonine.....	10
2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	11
2.5.1 <i>M. anisopliae</i>	11
2.5.2 <i>M. flavoviride</i>	15
2.5.3 <i>M. album</i>	17
2.5.4 <i>M. brunneum</i>	18
2.5.5 <i>M. acridum</i> หรือ <i>M. anisopliar</i> var. <i>acridum</i>	19
2.5.6 <i>M. guizhouense</i>	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5.7 <i>M. globosum</i>	20
2.5.8 <i>M. lepidiotae</i> หรือ <i>M. anisopliae</i> var. <i>lepidiotae</i> (<i>lepidiotum</i>).....	20
2.5.9 <i>M. robertsii</i>	20
2.6 เทคนิคทางโมเลกุล.....	20
2.6.1 การศึกษาด้วยเทคนิค RAPD.....	21
2.6.2 การศึกษาด้วยเทคนิค SSR หรือ microsatellites.....	22
2.6.3 การศึกษาด้วยเทคนิค RFLP.....	22
2.6.4 การศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์.....	25
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง.....	27
3.1 วัสดุ อุปกรณ์.....	27
3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง.....	27
3.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	27
3.1.3 วัสดุ และสารเคมี.....	28
3.2 วิธีการทดลอง.....	29
3.2.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	29
3.2.1.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	29
3.2.1.2 ตัวอย่างดิน.....	29
3.2.1.3 ตัวอย่างเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่ขอความอนุเคราะห์.....	29
3.2.2 การศึกษาชนิดของอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	30
3.2.3 การคัดแยกเชื้อ และทำให้เชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> บริสุทธิ์.....	30
3.2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	31
3.2.4.1 ศึกษาลักษณะ และอัตราการเจริญของโคโคนี.....	31
3.2.4.2 ศึกษาลักษณะรูปร่างของ conidia.....	31
3.2.5 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	31
3.2.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ.....	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ.....	32
3.2.5.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	32
3.2.5.4 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ.....	33
3.2.5.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP.....	33
บทที่ 4 ผล และอภิปรายผลการทดลอง.....	36
4.1 แหล่งที่มา และการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	36
4.2 ผลการศึกษาของชนิดอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	41
4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	43
4.3.1 ลักษณะของโคโลนี และอัตราการเจริญ.....	43
4.3.2 ลักษณะรูปร่าง และขนาดของ conidia.....	51
4.4 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล.....	57
4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR.....	57
4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ.....	60
4.4.3 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP.....	64
4.4.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i>	66
บทที่ 5 สรุป และเสนอแนะ.....	72
บรรณานุกรม.....	74
ภาคผนวก.....	82

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ตัวอย่างชื่อผลิตภัณฑ์ บริษัท และประเทศผู้ผลิตเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ทางการค้า.....	7
3.1 รายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในเปรียบเทียบ หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม.....	34
3.2 แสดงชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจุดจำ และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา.....	35
4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดิน และจำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่คัดแยกได้..	38
4.2 รหัสเชื้อ แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล <i>Metarhizium</i> ที่ใช้ในการศึกษา.....	40
4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ <i>M. anisopliae</i> จำนวน และรหัสตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม....	46
4.4 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ที่เจริญบนอาหาร ชนิด PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน.....	50
4.5 ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตาม อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia.....	53
4.6 ชนิด และขนาดของซันดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0).....	62

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

2.1	ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราในสกุล <i>Metarhizium</i> หรือเชื้อราเขียวในด้กัแตน.....	5
2.2	แสดงลำดับ และกระบวนการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง.....	9
2.3	ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ destruxin B.....	10
2.4	ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin D.....	10
2.5	ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ swainsonine.....	10
2.6	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ <i>M. anisopliae</i> โดย A: ลักษณะของ phialophore และ conidia ที่ต่อกันเป็นสายยาว และ B: conidia เรียงต่อกันเป็นสายยาว และสายของ conidia อยู่อัดแน่นกัน.....	11
2.7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา <i>M. anisopliae</i> ; A: <i>M. anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> และ B: <i>M. anisopliae</i> var. <i>majus</i>	13
2.8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา <i>M. flavoviride</i> ; A: <i>M. flavoviride</i> var. <i>flavoviride</i> ; B: <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> ที่แยกจาก เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper) และ C: <i>M. flavoviride</i> var. <i>minus</i> ในอาหารเลี้ยงเชื้อSDAY.....	16
2.9	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา <i>M. album</i> ; A: คัดแยกจากเพลี้ยจักจั่น และ B: จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร.....	18
2.10	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialide และ conidia ของเชื้อรา <i>M. brunneum</i> ; A: คัดแยกจากเพลี้ยจักจั่น และ B: จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร.....	19
4.1	ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อ <i>Metarhizium</i> ; A: MA 018; B: MA 019 และ C: MA 029.....	36
4.2	แสดงพื้นที่การสุ่มเก็บตัวอย่างดินจาก 24 จังหวัดในประเทศไทย และรหัสของ ไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน 13 ไอโซเลต.....	37

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

- 4.3 การเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae* ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่จำลอง การเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเจือจางของสารละลายดิน ที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า; A-C: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล; D-F: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลที่เพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟต ร้อยละ 0.1; G-I: DG18; J-L: PDA และ M-O: PDA ที่เพิ่มยาปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05.....42
- 4.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ A: MA007; B: MA 012; C: MA014; D: MA 019 และ E: SWA 19.....47
- 4.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ A: MA 011; B: MA 015; C: MA 018 และ D: MA022.....47
- 4.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ไอโซเลต คือ A: MA 001; B: MA 025; C: MA 026; D: MA 029; E: TISTR 3158; F: TISTR 3607; G: SCB 04; H: SEC 04; I: SEC 07; J: SED 07; K: SNB 02; L: SNEB 17; M: SNEB 18 และ N: SWC 03.....48
- 4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ A: MA 004; B: MA 017; C: MA 021 และ D: MA 024.....49
- 4.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 5 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ A: MA 002; B: MA 003; C: SNA 01; D: SNB 03; E: SNB 07 และ F: SNB 08.....49
- 4.9 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง ของ conidia มีค่าต่ำ; A: MA 001; B: TISTR 3607 และ C: SEC 07.....54
- 4.10 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าปานกลาง; A: MA 007; B: MA 014; C: MA 015; D: MA 017; E: MA 018; F: MA 019; G: MA 022; H: TISTR 3158; I: SCB 04; J: SEC 04; K: SED 07; L: SNB 02; M: SNB 03; N: SNEB 17 และ O: SWA 19.....55

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่

- 4.11 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง; A: MA 002; B: MA 003; C: MA 004; D: MA 011; E: MA 012; F: MA 021; G: MA 024; H: MA 025; I: MA 026; J: MA 029; K: SNA 01; L: SNB 07; M: SNB 08; N: SNEB 18 และ O: SWC 03.....56
- 4.12 แสดงขนาดของ PCR product ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยใช้คู่มือ ITS 1/ITS 4, A: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และ Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ).....59
- 4.13 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Vsp I* ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 A: Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03; โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส, Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ใช่เอนไซม์).....66
- 4.14 phylogenetic tree ของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 28 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ ไอโซเลตจากฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000; ■ แสดง กลุ่มจากการแบ่งตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia โดย ■ มีค่าอัตราส่วนน้อย, ■ มีค่าอัตราส่วนปานกลาง และ ■ มีค่าอัตราส่วนมาก; ● แสดงกลุ่ม การแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย ● 1, ● 2, ● 3, ● 4 และ ● 5 และ ✦ แสดง ไอโซเลตที่เอนไซม์ *Vsp I* ตัดได้.....71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ และที่มาของงานวิจัย

เชื้อราสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียว (green muscardine fungi) เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproductive stage) หรือระยะ anamorph ที่มีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive stage) หรือระยะ teleomorph คือเชื้อราในสกุล *Cordyceps* spp. จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota อันดับ Hypocreales (Bidochka และคณะ, 2005 และ Bugeme และคณะ, 2009) สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบกระจายอยู่ทั้งในดิน แมลงหรือหนอนต่างๆ ที่ถูกเชื้อราเข้าทำลาย เนื่องจากเชื้อราสกุลนี้เป็นกลุ่มของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (Bridge และคณะ, 1997; Milner และคณะ, 1998 และ Iskandarov และคณะ, 2006) ปัจจุบันเชื้อราสกุล *Metarhizium* มีความสำคัญมากขึ้น เนื่องจากนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี (biological control) ทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง (chemical insecticide) เนื่องจากการสารเคมีก่อให้เกิดปัญหาด้านต่างๆ เช่น แมลงสร้างความต้านทานต่อสารเคมีเกิดการระบาดหรือกลับมาระบาดใหม่อีกครั้งหนึ่งของแมลง ปัญหาพิษตกค้างในผลผลิต เป็นต้น การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีน่าจะเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยต่อพืช สัตว์ และสิ่งแวดล้อม (Khetan, 2000 และ Iskandarov และคณะ, 2006) นอกจากนั้นยังสามารถลดค่าใช้จ่าย และทำให้เกิดความสมดุลในระบบนิเวศวิทยา และมีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมศัตรูพืชได้ในระยะยาว ดังนั้นการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีจึงมีบทบาท และมีความต้องการใช้ในปัจจุบันมากยิ่งขึ้น

เชื้อราสกุล *Metarhizium* มีคุณสมบัติในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด และตลอดทุกระยะการเจริญเติบโตของแมลง รวมทั้งกลไกในการเข้าทำลายแมลงศัตรูพืชนั้นเป็นแบบมีความจำเพาะเจาะจง (species-specificity) และมีประสิทธิภาพแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ (species) (Bridge และคณะ, 1997; Hughes และคณะ, 2004 และ Iskandarov และคณะ, 2006) *M. anisopliae* มีความสามารถเข้าอาศัยแมลงได้หลายอันดับ เช่น Coleoptera, Dermaptera, Orthoptera, Homoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera และ Hymenoptera เป็นต้น (Goettel และคณะ, 1990; Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005) โดยมีความสามารถในการเข้าทำลายอันดับ Coleoptera ได้เป็นส่วนใหญ่ แต่ในสปีชีส์และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* อื่นๆ นั้นมีความจำเพาะต่อแมลงที่เข้าอาศัยจำเพาะเจาะจงกว่า *M. anisopliae* โดยพบว่า *M. anisopliae* var. *majus* และ *M. flavoviride* var. *flavovirid* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Coleoptera ส่วน *M. flavoviride* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Orthoptera ในขณะที่ *M. flavoviride* var. *minus* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Homoptera และ *M. album* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ

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

เนื่องจากเชื้อราสกุล *Metarhizium* ประกอบด้วยหลายสปีชีส์ และหลายสายพันธุ์ (varieties) ดังรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดย Tulloch (1976) ยอมรับการจัดกลุ่มเพียง 2 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* และในกลุ่ม *M. anisopliae* ยังสามารถแบ่งได้อีก 2 สายพันธุ์ คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่มีขนาด conidia สั้น และ *M. anisopliae* var. *major* ที่มีขนาด conidia ยาว ต่อมาได้เปลี่ยนชื่อ var. *major* เป็น var. *majus* (Rombach และคณะ, 1986) หลังจากนั้นเริ่มมีการศึกษา และจัดกลุ่มทั้งในระดับสปีชีส์ และสายพันธุ์ ซึ่งไม่สามารถแบ่งแยกกันได้อย่างชัดเจน (cryptic varieties) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งในเรื่องของขนาด และรูปร่างของ phialide, phialophore และ phialo spore (หรือ conidia) ลักษณะหรือสีของ โคลโลนี เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ที่สามารถสังเกตเห็นได้ในแต่ละสปีชีส์หรือในสายพันธุ์เดียวกันนั้นของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่มีความคล้ายคลึงกัน และยังสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง ทำให้การระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ไม่ได้ชัดเจน และสับสน ซึ่งมีผลกระทบต่อการจัดจำแนก และบ่งชี้สปีชีส์หรือสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* และเพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดในการนำไปใช้ จึงมีการใช้และพัฒนาเทคนิคต่างๆ รวมถึงเทคนิคทางโมเลกุล (molecular genetic) เพื่อช่วยในการจัดจำแนก และบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น ได้แก่ เทคนิคการวิเคราะห์ isoenzyme (St. Leger และคณะ, 1992; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Bidochka และคณะ, 2001 และ Dong และคณะ, 2007) เทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) รวมทั้งเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) (Bridge และคณะ, 1993; Neuvéglise และคณะ, 1994; Pipe และคณะ, 1995; Mavridou และ Typas, 1998;

Bidochka และคณะ, 2001; Small และคณะ, 2004 และ Enkerli และคณะ, 2009) เทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Fegan และคณะ, 1993; Bidochka และคณะ, 1994, 2001; Leal และคณะ, 1994; Tigano-Milani และคณะ, 1995; Fungaro และคณะ, 1996; De Cavalho Freire และคณะ, 2001 และ Velásquez และคณะ, 2007) เทคนิค simple sequence repeat (SSR) หรือ microsatellites (Enkerli และคณะ, 2005 และ Velásquez และคณะ, 2007) เทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP) (Inglis และคณะ, 2008) รวมถึงการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) (Curran และคณะ, 1994; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Driver และคณะ, 2000; Pantou และคณะ, 2003; Small และคณะ, 2004; Destéfano และคณะ, 2004 และ Bischoff และคณะ, 2009) โดยตำแหน่งที่ได้รับความนิยมใช้ในการศึกษา และจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา คือ ตำแหน่ง internal transcribed spacer (ITS) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 (Driver และคณะ, 2000; Liu และคณะ, 2002; Pantou และคณะ, 2003; Destéfano และคณะ, 2004; Inglis และคณะ, 2008 และ Velásquez และคณะ, 2007) ตำแหน่ง intergenic spacer (IGS) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ IGS1-5S rDNA-IGS2 (Pantou และคณะ, 2003 และ Hughes และคณะ, 2004) ที่ทั้งสองตำแหน่งอยู่ในบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งมีความหลากหลาย (variation) ทางพันธุกรรมสูง (Kennedy และ Clipson, 2003 และ Mitchell และ Zuccaro, 2006) จึงสามารถใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสปีชีส์ และภายในสปีชีส์เดียวกันได้ โดยการจัดจำแนกอนุกรมวิธานที่มีความสำคัญ และเป็นที่ยอมรับนำมาใช้ในการเปรียบเทียบสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* คือ การศึกษาของ Driver และคณะ (2000) ได้จัดแบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมด 123 ไอโซเลตที่ได้มาจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก (มีตัวอย่างจากประเทศไทยเพียง 1 ไอโซเลต) โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในบริเวณ ITS และ D3 ในตำแหน่ง 28S rDNA และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ รวมถึงเทคนิค RAPD สามารถแบ่งเชื้อราสกุล *Metarhizium* ออกเป็น 10 กลุ่ม (Clade) คือ *M. album*, *M. flavoviride* Type E, *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. flavoviride* var. *minus*, *M. flavoviride* var. *flavovirid*, *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ต่อมาในปี ค.ศ. 2009 การรายงานการจัดอนุกรมวิธานของ Bischoff และคณะที่จัดกลุ่มเชื้อรา *M. anisopliae* สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน รวมถึงพิสูจน์ให้เห็นความสัมพันธ์ของ *M. taii*, *M. pingshaense* และ *M. guizhouense* รวมตัวอย่างทั้งหมด 57 ไอโซเลต โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง EF-1 α , RPB 1, RPB 2, Bt และตำแหน่ง IGS สามารถแบ่งกลุ่มใหม่ได้เป็น 9 สปีชีส์ คือ *M. acridum*, *M. majus*, *M. anisopliae*, *M. lepidiotae*, *M. pingshaense* และ *M. guizhouense* (สปีชีส์เดิม คือ *M. taii*) และรวม 2 สปีชีส์ใหม่เพิ่มขึ้นมา คือ *M. globosum* และ *M. robertsii* รวมทั้ง *M. brunneum* ที่นำชื่อเดิมกลับมาใช้ใหม่

จากรายงานการจัดอนุกรมวิธานที่กล่าวมาแล้วนั้น มีเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากประเทศไทยเพียง 1 ไอโซเลตในรายงานของ Driver และคณะ (2000) และรายงานของศิริลัษ และคณะ (2551) ที่ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จำนวน 3 ไอโซเลตที่เข้าทำลายเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และด้วงแรดมะพร้าว ซึ่งพบว่าเป็น *M. anisopliae* ซึ่งเห็นได้ว่ามีตัวอย่างจำนวนน้อยที่นำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลาย แต่ในปัจจุบันประเทศไทยมีการรณรงค์ และใช้เชื้อราในสกุล *Metarhizium* โดยเฉพาะ *M. anisopliae* มากขึ้นในเกษตรกร จึงควรมีข้อมูลในการจัดจำแนก และบ่งชี้สายพันธุ์ รวมทั้งการศึกษากความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนการนำไปใช้ และการติดตามเชื้อในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

- 1.2.1 บ่งชี้และจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* ที่แยกได้จากแมลง และดินทั้งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุล
- 1.2.2 ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่พบในประเทศไทย
- 1.2.3 ค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อราสกุล *Metarhizium*
- 1.2.4 รวบรวมสายพันธุ์เชื้อราในสกุล *Metarhizium* เพื่อการนำมาใช้ประโยชน์ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีต่อไป

บทที่ 2

ทฤษฎี และหลักการ

2.1 เชื้อราสกุล *Metarhizium*

เชื้อราสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียวจัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) หรือที่เรียกโดยทั่วไปว่าโรคมัสคาร์ดินีสีเขียว (green muscardine) เนื่องจากเมื่อเชื้อราเข้าทำลายหนอนหรือแมลงแล้วตายในลักษณะที่แห้งแข็ง และมีเส้นใยปกคลุม เมื่อมีการสร้าง conidia จะเห็นหนอนหรือแมลงมีสีเขียวดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดย Metschnikoff (1879) เป็นบุคคลแรกที่บันทึกข้อมูลของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยตั้งชื่อว่า *Entomophthora anisopliae* เนื่องจากพบการเข้าทำลายในแมลงปีกแข็ง (wheat cockchafer: *Anisopliae austriaca* Herbst.) ในประเทศรัสเซีย และต่อมาในปี ค.ศ. 1880 ได้เปลี่ยนชื่อเป็น *Isaria destructor* หลังจากนั้น Sorokin (1883) เป็นคนแรกที่เรียกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ว่าโรคมัสคาร์ดินีเขียว พร้อมทั้งบันทึก และแก้ไขชื่อตาม Metschnikoff และตั้งชื่อใหม่ว่า *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin ต่อมา Tulloch (1976) ทำการทบทวน และแก้ไขชื่อทั้งการเขียน และการเรียกชื่อให้ถูกต้องอย่างเป็นทางการ โดยการเลือกใช้พยัญชนะ “r” เพียงหนึ่งตัว คือ *Metarhizium* (อ้างใน Zimmermann, 2007 และ Roberts และ St. Lager, 2004)



รูปที่ 2.1 ลักษณะการเข้าทำลายของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* หรือเชื้อราเขียวในตั๊กแตน (ที่มา: <http://www.bath.ac.uk/bio-sci/research/profiles/chamley.html>)

ในอดีตไม่มีการค้นพบระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproductive stage) หรือระยะ teleomorph จึงจัดเชื้อรานี้ไว้ในไฟลัม Deuteromycota จนกระทั่ง Liang และคณะ (1991) ตรวจสอบและแสดงให้เห็นว่า *Cordyceps taii* เป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *M. taii* รวมทั้งแสดงให้เห็นว่า *C. brittlebankisoides* มีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual

reproductive stage) หรือระยะ anamorph เป็น *M. anisopliae* var. *majus* (Liu และคณะ, 2001, 2002) ดังนั้นในปัจจุบันการจำแนกตามอนุกรมวิธานซึ่งจัดให้เชื้อรา *Metarhizium* ที่มีลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศอยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น (class) Sordariomycetes อันดับ Hypocroales วงศ์ (family) Clavicipitaceae สกุล (genus) *Metarhizium* และยังมีควมสับสนในการจัดแบ่งในระดับสปีชีส์และสายพันธุ์ ดังเช่น การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่สำคัญได้แก่ Tulloch (1976) จัดกลุ่ม *Metarhizium* ออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* โดยจัดให้ *M. album* และ *M. brunneum* เป็น *M. anisopliae* พร้อมทั้งจัดแบ่ง *M. anisopliae* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ตามขนาดของ conidia หลังจากนั้นในปี ค.ศ. 2000 Driver และคณะ จัดอนุกรมวิธานเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมดจำนวน 123 ไอโซเลตที่ได้ตัวอย่างมาจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก โดยใช้ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) บริเวณ ITS และ D3 expansion ในตำแหน่ง 28S ribosomal DNA (rDNA) และเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) สามารถแบ่งเป็น 3 สปีชีส์ รวมจำนวน 10 สายพันธุ์หรือ 10 กลุ่ม คือ *M. album*, *M. flavoviride* จำนวน 5 สายพันธุ์ (*M. flavoviride* Type E, *M. flavoviride* var. *novazealandicum*, *M. flavoviride* var. *pemphigum*, *M. flavoviride* var. *minus* และ *M. flavoviride* var. *flavoviride*) และ *M. anisopliae* จำนวน 4 สายพันธุ์ (*M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *lepidiotum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus*) และ Bischoff และคณะ (2009) ได้ศึกษาเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวนทั้งหมด 57 ไอโซเลต ซึ่งเป็นไอโซเลตที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษา โดยคัดแยกได้จากแมลง และดินในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลก และเก็บรวบรวมไว้ที่แหล่งรวบรวมสายพันธุ์เชื้อรา ARS collection of entomopathogenic fungal cultures (ARSEF) และ centraalbureau voor schimmelcultures (CBS) ในประเทศอเมริกา และเนเธอร์แลนด์ตามลำดับ เพื่อจัดอนุกรมวิธานเชื้อรา *M. anisopliae* ทั้ง var. *anisopliae*, var. *acridum*, var. *lepidiotae* และ var. *majus* ซึ่งเมื่อแบ่งโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความใกล้เคียงกันทำให้เกิดความสับสน รวมทั้ง *M. guizhouense*, *M. pingshaense* และ *M. taii* ที่มีการศึกษาเฉพาะในประเทศจีน เพื่อให้มีความชัดเจนสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น โดยอาศัยข้อมูลทั้งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม สามารถจัดอนุกรมวิธานใหม่ได้เป็น 9 สปีชีส์ คือ *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov., *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok., *Metarhizium majus* (J.R. Johnst.) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov., *Metarhizium brunneum* Petch., *Metarhizium globosum* J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov., *Metarhizium guizhouense* Q.T. Chen & H.L. Guo., *Metarhizium lepidiotae* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov., *Metarhizium pingshaense* Q.T. Chen & H.L. Guo. และ *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov.

2.2 การนำเชื้อราสกุล *Metarhizium* มาใช้ประโยชน์

ในปัจจุบันนิยมใช้การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีมากขึ้น เนื่องจากมีข้อดีทั้งในเรื่องไม่มีสารพิษตกค้าง ใช้ได้ในทุกระยะการเจริญเติบโตของต้นพืช และให้ผลที่ยั่งยืน ประหยัดค่าใช้จ่าย มีความจำเพาะต่อแมลงเป้าหมายที่ต้องการควบคุม ไม่ทำลายแมลงที่มีประโยชน์หรือสัตว์ชนิดอื่นๆ และมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก จึงเกิดความสมดุลธรรมชาติในระบบนิเวศวิทยา ช่วยในการลดปัญหาการเกิดศัตรูพืชชนิดใหม่ๆ และการระบาดของแมลงศัตรูพืช ดังนั้นเชื้อราสกุล *Metarhizium* เป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งในหลายประเทศได้พัฒนาให้อยู่ในรูปการค้าในชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังตารางที่ 2.1 โดยมีตัวอย่างงานวิจัยที่ศึกษาการนำไปใช้ในการควบคุมแมลงดังนี้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างชื่อผลิตภัณฑ์ บริษัท และประเทศผู้ผลิตเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทางการค้า

ชื่อผลิตภัณฑ์	บริษัท/ผู้ผลิต	ประเทศ
BioBlast	EcoScience	อเมริกา
Bio-Cane Granules	Becker Underwood	ออสเตรเลีย
Bio-Catch-M	Stanes	อินเดีย
Bio-Green Granules	Becker Underwood	ออสเตรเลีย
BioPath	EcoScience	อเมริกา
Cobican	Probioagro	เวเนซุเอลา
Gran Met-P	Kwizda/Agrifutur	ออสเตรเลีย/อิตาลี
Green Guard	Becker-Underwood	ออสเตรเลีย
Green Muscle	CABI Bioscience/NPP	อังกฤษ/ฝรั่งเศส
Metaquino	-	บราซิล
Metarhizium Schweizer	Lbu (formerly Eric Schweizer Seeds)	สวิตเซอร์แลนด์
Metathripol	ICIPE	เคนย่า
Pacer	SOM Phytopharma	อินเดีย

ที่มา: Zimmermann (2007)

Veen (1968) บันทึกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเข้าอาศัยหรือทำลายแมลงได้มากถึง 7 อันดับหรือ 204 ชนิด เช่น Coleoptera, Dermaptera, Orthoptera, Homoptera, Diptera, Lepidoptera, Hemiptera และ Hymenoptera เป็นต้น

Mnyone และคณะ (2009) ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *M. anisopliae* IP 46 ในการควบคุมยุง (*Anopheles gambiae* และ *A. arabiensis*) พบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าร้อยละ 95 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการควบคุมยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคมalariaต่อไปในอนาคต และการทดลองของ Milner และคณะ (1998) ที่คัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากปลวกเพื่อใช้ในการควบคุมปลวก (*Nasutitermes exitus* และ *Coptotermes frenchi* หรือ *C. acinaciformis*) ในประเทศออสเตรเลีย และพบว่าไอโซเลต *M. anisopliae* FI-610 มีประสิทธิภาพมากที่สุด และเมื่อนำไปทดลองในพื้นที่พบว่าต้องใช้ 10 กรัม (3×10^{11} conidia) หรือมากกว่าเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากพอในการควบคุม *C. acinaciformis* หรือในการใช้ควบคุมด้กแตนโดยเชื้อ *M. anisopliae* var. *acidum* (Peng และคณะ, 2008) และ *M. flavoviride* (Lomer และคณะ, 1997 และ Shah และคณะ, 1998)

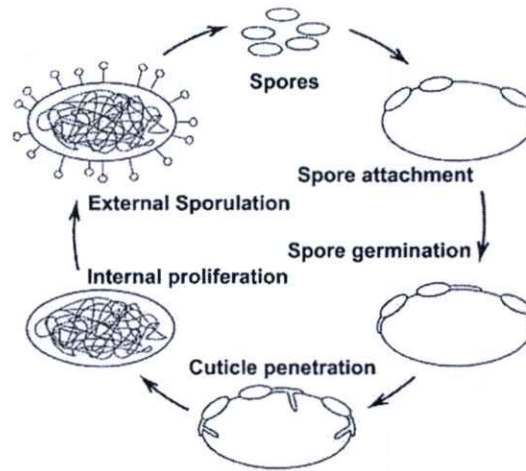
ในประเทศไทยใช้ *M. anisopliae* ในการควบคุมด้วงหนวดยาวเจาะลำต้นอ้อย (<http://www.thaibiocontrol.org/main.php?filename=Metarhizium>) หนอนด้วงแรดมะพร้าว แมลงค้ำหนามมะพร้าวในพื้นที่การเกษตร โดยศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติ และกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร เช่นเดียวกับ Maketon และคณะ (2007) ทดลองใช้ *M. anisopliae* จำนวน 8 ไอโซเลตเพื่อหาประสิทธิภาพในการควบคุมปลวกใต้ดิน (*C. gestrio*) พบว่า *M. anisopliae* CKM-048 ที่ความเข้มข้น 3×10^8 conidia ต่อมิลลิลิตรมีประสิทธิภาพสูงสุดโดยทำลายปลวกได้ร้อยละ 89 ในระยะเวลา 14 วัน

2.3 การเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง

กระบวนการในการเข้าทำลายของเชื้อราสกุล *Metarhizium* นั้นคล้ายคลึงกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอื่นๆ คือ เมื่อเชื้อรามีการสร้าง conidia และ conidia ไปสัมผัสหรือเกาะติดกับผนังลำตัวของแมลง (spore attachment) แล้วเข้าสู่ระยะเชื้อรางอก และเจริญบนผนังลำตัวของแมลง (spore germination) ซึ่งสามารถแทงทะลุผิวผนังลำตัวแมลงหรือบริเวณรอยต่อเข้าไป (cuticle penetration) โดยเชื้อราสร้าง germ tube สั้นๆ จาก conidia แทงทะลุผิวผนังแมลงเข้าไปได้ แล้วเชื้อราจะเจริญและเพิ่มปริมาณในตัวแมลง (internal proliferation) โดยเชื้อราสร้างเส้นใยไปตามระบบไหลเวียนโลหิต โดยเส้นใยอาจหักออกเป็นท่อนสั้นๆ และเข้าทำลายอวัยวะต่างๆ ภายหลังที่แมลงตายลงหรือก่อนตายเส้นใยจะเจริญไปทั่วภายในลำตัวแมลงจนลำตัวเต็มไปด้วยเชื้อรา ซึ่งมีผลทำให้แมลงแห้ง และแข็ง ในระยะต่อมาเชื้อราสร้าง phialophore และแทงทะลุออกมานอกลำตัวแมลง และสร้าง conidia ใหม่ (external sporulation) ดังแสดงลำดับการเข้าทำลายแมลงในรูปที่ 2.2 (Zimmermann, 2007)

การเกิดโรคของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคแมลงนั้นเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวดเร็วเมื่อแมลงอ่อนแอพร้อมทั้งได้ถูกสัมผัสโดยตรงกับเชื้อราที่มีฤทธิ์ก่อโรครุนแรง รวมทั้งมีสภาพ

สิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตของเชื้อราอื่นๆ (สำรวจ ดอกไม้หอม และ ผนังศักดิ์ โพรธิ์ ไพฑูรย์, 2526)



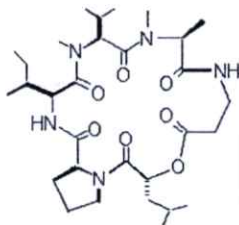
รูปที่ 2.2 แสดงลำดับ และกระบวนการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลง (ที่มา: <http://www.invasive.org/hwa/images/Figure16.jpg>)

2.4 สารที่พบในเชื้อราสกุล *Metarhizium*

เชื้อราสกุล *Metarhizium* สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (biologically active compound) ได้อย่างกว้างขวาง ที่ส่วนมากจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) เช่นเดียวกับเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอื่นๆ โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้ในการเข้าทำลายแมลงหรือเป็นยาปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อช่วยในการมีชีวิตอยู่รอด โดยสารที่เชื้อราสกุล *Metarhizium* สร้างขึ้นสามารถยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลงทำให้แมลงตาย ซึ่งสารหลักที่พบได้บ่อยจากการรวบรวมของ Zimmerman (2007) ได้แก่

2.4.1 Destruxin

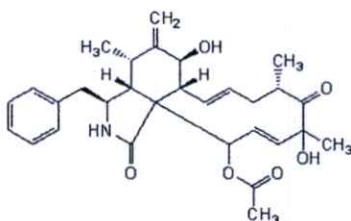
เป็นสารสำคัญที่ *M. anisopliae* สร้างขึ้น แบ่งออกได้เป็นหลายชนิดดังรายงานของ Liu และคณะ (2004) ที่พบสาร destruxin มากกว่า 35 ชนิด แต่ที่รู้จักกันดีมี 5 ชนิด ได้แก่ destruxin A, B, C, D และ desmethyldestruxin B โดยโครงสร้างทางเคมีของ destruxin B แสดงดังรูปที่ 2.3 ซึ่งในแต่ละสปีชีส์มีการสร้าง destruxins ได้แตกต่างกันทั้งในด้านชนิด และปริมาณ ดังเช่น *M. anisopliae* var. *anisopliae* สร้างสาร destruxin A, B, และ E ในขณะที่ *M. anisopliae* var. *majus*, *M. flavoviride* และ *M. album* สร้างสาร destruxin หลากหลายแต่มี destruxin A มากกว่าสารชนิดอื่นๆ และสาร destruxin สามารถพบได้ในเชื้อราสกุลอื่นด้วยเช่นกัน เช่น destruxin B พบได้ใน *Beauveria felina* (Kim และคณะ, 2002)



รูปที่ 2.3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ destruxin B
(ที่มา <http://www.regional.org.au/au/gcirc/3/139.htm>)

2.4.2 Cytochalasin

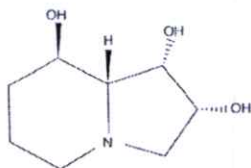
เชื้อราหลายชนิดสามารถสร้างสาร cytochalasin ได้หลากหลาย เช่น cytochalasin A, B, C และ E แต่ Roberts (1981) พบว่า *M. anisopliae* สร้าง cytochalasin 2 ชนิด คือ C และ D ซึ่งสารนี้มีความสำคัญในด้านยา และทางด้านชีววิทยาของเซลล์ (cell biology) โดยมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin D ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของ cytochalasin D
(ที่มา: http://www.fermentek.co.il/cytochalasin_D.htm)

2.4.3 Swainsonine

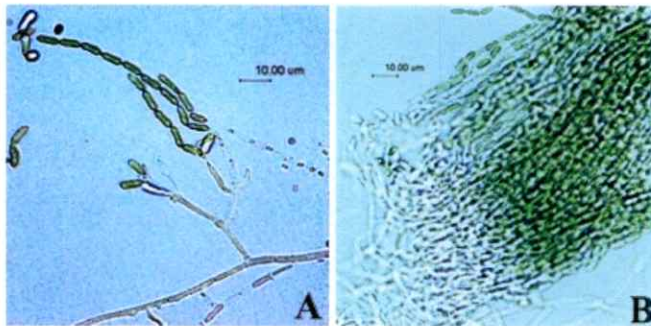
เป็นสารประกอบพวกอัลคาลอยด์ (alkaloid) และยังสามารถพบได้ในพืชสกุล *Oxytropi*, *Astragalus*, *Swainsona*, *Sphaerophysa*, *Ipomea* และ *Sida* นิยมนำมาใช้ในด้านยาและการบำบัดผู้ป่วยโรคมะเร็ง โดยมีลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของ swainsonine ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของ swainsonine
(ที่มา: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Swainsonine.png>)

2.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปของเชื้อราสกุล *Metarhizium* พบเส้นใย (hypha) มีผนังกันเป็นปล้อง ไม่มีสี เมื่อเจริญเต็มที่สร้าง phialophore ชูขึ้นจากเส้นใย และ phialophore แยกเป็นกิ่งๆ พร้อมอัดกันแน่น ส่วนตรงปลายสร้าง phialide ซึ่งเป็นเซลล์ที่ผลิต phialospore หรือ conidia ที่มีทั้งขนาดความยาวสั้น และขนาดยาว อยู่เป็นลูกโซ่ต่อกันเป็นสายยาว (รูปที่ 2.6A) และสายของ conidia มารวมกันอัดอยู่กันแน่น (รูปที่ 2.6B) และสีของ conidia ที่เกิดใหม่มีสีขาว และเปลี่ยนเป็นเฉดสีเขียว และจะหลุดออกเมื่อแก่มาขึ้น



รูปที่ 2.6 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. anisopliae* โดย A: ลักษณะของ phialophore และ conidia ที่ต่อกันเป็นสายยาว และ B: conidia เรียงต่อกันเป็นสายยาว และสายของ conidia อยู่อัดแน่นกัน

จากที่กล่าวมาแล้วว่าการอนุกรมวิธานมีความสับสนในการจัดจำแนก และบ่งชี้สายพันธุ์ของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่คล้ายคลึงกัน และมีความเหลื่อมล้ำกันทั้งขนาดและสีของ conidia ลักษณะรูปร่างของ phialide และ phialophore อีกทั้งเป็นการยากที่จะแยกข้อแตกต่างของทั้ง phialide และ phialophore ออกจากกัน นอกจากนั้นการแพร่กระจายของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ในสถานที่หรือประเทศที่แตกต่างกันทำให้มีการรายงานชื่อที่แตกต่างกันออกไป สีของ conidia นั้นอาจเปลี่ยนแปลงไปตามชนิดของอาหารที่เพาะเลี้ยง และอุณหภูมิ เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามสปีชีส์ที่พบได้โดยทั่วไปมี 3 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae*, *M. album* และ *M. flavoviride* ซึ่งในปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้ในการจัดจำแนก ทำให้เชื้อราสกุลนี้มีความหลากหลายของสายพันธุ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งสรุปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่พบโดยทั่วไปดังนี้

2.5.1 *M. anisopliae*

M. anisopliae มี phialophore จากปลายของเส้นใย โดย phialide และ conidia ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก (cylindrical) โดย conidia มีทั้งความยาวขนาดสั้น และยาว

แตกต่างกัน โคลนินี้ในระยะเริ่มแรกมีสีขาว (white) และเมื่อมีการสร้าง conidia จะเห็น โคลนินี้เป็นสีตามสีของ conidia ซึ่งมีผลทำให้โคลนินี้มีเฉดสีเขียว (green) ตั้งแต่เขียวอ่อน (lighter green) เขียวเข้ม (dark green) เขียวขี้ม้า (olive) หรือบางครั้งเป็นสีเขียวจนถึงดำ (black) โดยมีรายงานที่อ้างใน Zimmermann, 2007 และ Roberts และ St. Lager, 2004 เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังนี้

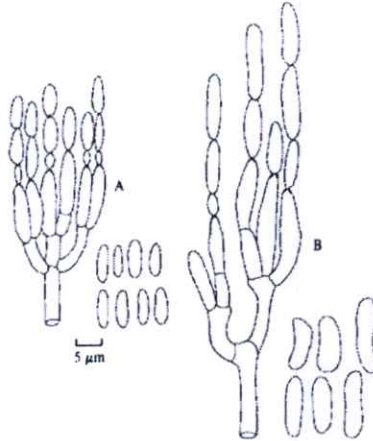
Metschnikoff (1879) อธิบายลักษณะของเชื้อรา *M. anisopliae* มี conidia เป็นรูปทรงกระบอกยาวโดยเฉลี่ยเท่ากับ 4.8 ไมโครเมตร เช่นเดียวกับรายงานของ Sorokin (1883) ซึ่งพบว่า conidia มีความกว้าง และยาวเฉลี่ยคือ 1.6 x 4.8 ไมโครเมตร และขนาด conidia ของเชื้อรา *Metarhizium* ที่คัดแยกได้จากแมลงสกุลด้วง (*Melolontha* sp.) มีความกว้างของ conidia 2.5-3.25 ไมโครเมตร และความยาว 7-15 ไมโครเมตรซึ่งจัดเป็น conidia ขนาดยาว (Delacroix, 1893)

Johnston (1915) แบ่งกลุ่ม *M. anisopliae* ออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดความยาวของ conidia คือ กลุ่ม *minor* มีลักษณะ conidia สั้นประมาณ 2-3 x 3.5 ไมโครเมตร และ conidia มีสีเขียวอ่อน และกลุ่ม conidia ยาว คือ *major* มีขนาด conidia เท่ากับ 3.0 x 11.9 ไมโครเมตร และมีสีเขียวสว่าง (bright green) ต่อมา Feriderichs (1920) แบ่งกลุ่ม *M. anisopliae* คล้ายคลึงกับ Johnston (1915) ที่มีทั้งกลุ่ม conidia สั้น และยาว โดย conidia สั้นคัดแยกได้จากเกาะมาดากัสการ์มีขนาดของ conidia เท่ากับ 2.5 x 6-8 ไมโครเมตร และกลุ่ม conidia ยาวที่คัดแยกได้จากด้วงแรดมะพร้าว (*Oryctes rhinoceros*) มีขนาดของ conidia เท่ากับ 3.3 x 9-14 ไมโครเมตร

Petch (1931) ขอมรับการศึกษารายงานของ Delacroix ในปี ค.ศ. 1893 ที่กล่าวว่า conidia ขนาดสั้น และขนาดยาวเนื่องจากสายพันธุ์ที่ต่างกันในปีซีส์เดียวกัน (sub-species) และพบว่า *M. anisopliae* ที่คัดแยกจากแมลงสกุล *Lamproporus* มีขนาด conidia เฉลี่ยเท่ากับ 2.5-3 x 5-6.5 ไมโครเมตร และ *M. anisopliae* ที่คัดแยกได้จากด้วงแรดมะพร้าวมีขนาด conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3-4 x 10-14 ไมโครเมตร Veen (1968) ซึ่งขอมรับการแบ่งสายพันธุ์ของ Johnston (1915) ที่พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* มีทั้งขนาด conidia สั้น และยาวซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดของ conidia เช่นเดียวกับการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ และได้รายงานว่ conidia ขนาดสั้น และยาวนั้นมีความยาวไม่เกิน 7.6 และ 9.8 ไมโครเมตร ตามลำดับ

ต่อมา Tulloch (1976) ได้นำเสนอการจัดแบ่งกลุ่มของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ออกเป็น 2 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* จากลักษณะ phialide และ conidia ซึ่ง conidia ของ *M. anisopliae* เป็นรูปทรงกระบอกหรือบางครั้งอาจเป็นรูปทรงไข่ (oval) ต่อกันเป็นสายยาว และบ่อยครั้งที่สังเกตเห็นด้านข้างบริเวณกลางของ conidia แคบ โคลนินี้มีหลายสีที่อยู่ในเฉดสีเขียวหรือสีน้ำตาลอมแดง (sepia) พร้อมทั้งจัดแบ่ง *M. anisopliae* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ตามขนาด conidia ตามรายงานของ Johnston (1915) คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่มีขนาดของ conidia สั้นคือมีความยาวระหว่าง 3.5-9.0 ไมโครเมตร โดยขนาดที่พบได้บ่อยจะมีความยาวเท่ากับ 5.0-8.0 ไมโครเมตร และ *M. anisopliae* var. *major* ที่มีขนาดของ conidia ยาว โดยมีความยาว

ระหว่าง 9.0-18.0 ไมโครเมตร โดยขนาดที่พบได้บ่อยมีความยาวเท่ากับ 10.0-14.0 ไมโครเมตร ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ conidia ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของสีของ conidia และในปี 1987 Rombach ได้เปลี่ยนชื่อ *M. anisopliae* var. *major* เป็น *M. anisopliae* var. *majus* เนื่องจากคำว่า major เป็นส่วนหนึ่งในการเปรียบเทียบคำคุณศัพท์ในหลักไวยากรณ์ภาษาอังกฤษ ซึ่งจะทำให้เกิดการนำไปใช้ผิด พร้อมนำเสนอลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทั้ง *M. anisopliae* var. *anisopliae* (รูปที่ 2.7 A) และ *M. anisopliae* var. *major* (รูปที่ 2.7 B)



รูปที่ 2.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา *M. anisopliae*; A: *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ B: *M. anisopliae* var. *majus* (ที่มา Rombach และคณะ, 1987)

Radha และคณะ (1956) กล่าวว่า conidia ขนาดยาวมีความสามารถในการเข้าทำลาย หนอนด้วงแรดมะพร้าว ได้ดีมากจึงควรเปลี่ยนชื่อเป็น var. *rhinoceros* แต่ไม่ได้ใช้เป็นภาษาลาติน และไม่ได้ใช้อย่างเป็นทางการ และยังมีนักวิจัยอีกหลายท่านที่กล่าวว่า *M. anisopliae* var. *majus* ที่มีขนาดของ conidia ยาวนั้นสามารถแยกได้จากแมลงสปีชีส์ *Oryctes* หรือมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงสปีชีส์ *Oryctes* แต่ *M. anisopliae* ที่ขนาด conidia สั้นนั้นจำเพาะเจาะจงต่อแมลงสปีชีส์ *Oryctes* น้อยกว่า (Ferron และคณะ, 1972 และ Tulloch, 1976) ดังนั้นนิยมใช้ชื่อ *M. anisopliae* var. *majus* อย่างกว้างขวางในการควบคุมหนอนด้วงแรดมะพร้าวในสวนมะพร้าวหรือสวนปาล์ม (Ferron และคณะ, 1975 และ Latch และ Fallon, 1976)

Driver และคณะ (2000) ศึกษาและจัดแบ่งกลุ่มเชื้อรา *Metarhizium* ทั้งหมด 123 ไอโซเลตเป็น 10 กลุ่มโดยใช้ชื่อเดิม และจัด *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่รายงานว่ามีสีเขียว conidia เป็นรูปทรงกระบอกความยาวประมาณ 5-7 ไมโครเมตรอยู่ต่อกันเป็นสายยาว สามารถเจริญเติบโตได้ในอุณหภูมิระหว่าง 15-32 องศาเซลเซียส อยู่ในกลุ่มที่ 9 แยกกับ *M. anisopliae* var.

majus ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ 10 ซึ่งมี conidia ขนาดยาว โดยทั่วไปมีขนาดมากกว่า 10 ไมโครเมตร โคลโคนี เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และมีสีเขียวเข้ม และพบว่ามีความจำเพาะเจาะจงสูงในการเข้าทำลาย แมลงคิ้วแดงในเขตประเทศเมืองร้อน ซึ่งผลการศึกษานี้สนับสนุนข้อมูลโดยนักวิจัยผู้อื่น (St. Leger และคณะ, 1992 และ Leal และคณะ, 1994) พร้อมทั้งอธิบายไว้ว่าเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* สามารถพบกระจายได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมีความหลากหลายทางพันธุกรรม

Luangsa-ard และคณะ (2007) เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* บนอาหาร PDA ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาก คือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ โคลโคนีระหว่าง 50-60 มิลลิเมตรใน 14 วัน ลักษณะของ phialide เป็นรูปทรงกระบอกมีความยาว เท่ากับ 2 x 5-7 ไมโครเมตร conidia เป็นรูปทรงรี (ellipsoidal) ถึงทรงกระบอกอยู่ค่อนเป็นสายยาว มี สีเขียวถึงเขียวเข้ม

Bischoff และคณะ (2009) ศึกษาและจัดกลุ่มเชื้อราในสกุล *Metarhizium* โดยอาศัย ทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลในยีนหลายๆตำแหน่ง โดยสามารถแบ่งสาย พันธุ์ทั้งสองของ *M. anisopliae* ออกเป็นสองสปีชีส์ คือ กลุ่ม *M. anisopliae* var. *anisopliae* อยู่ใน ชื่อใหม่ว่า *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok มีสีโคลโคนีเริ่มต้นสีขาว และค่อยเกิดการ เปลี่ยนสีเหลือง (yellow) ภายใน 4-7 วัน และเปลี่ยนเป็นสีแกมเขียว (greenish) เฉดสีเขียวจืดมาอ่อน ถึงเข้ม ซึ่งมาจากการพัฒนาของ conidia โดยขนาดของ conidia เท่ากับ 2.0-3.5 x 5.0-7.0 ไมโครเมตร และ *M. anisopliae* var. *majus* เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *Metarhizium majus* (J.R. Johnst.) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov. มี conidia เป็นรูปทรงกระบอกขนาด 2.5-5.0 x 8.5-14.5 ไมโครเมตร โดยทั่วไปมีขนาดไม่ต่ำกว่า 10 ไมโครเมตร และพบมากที่สุดที่ขนาด 12-13 ไมโครเมตรซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีขนาด conidia ใหญ่ที่สุด

สำหรับประเทศไทยมีการศึกษาของศิริวิทย์ และคณะ (2551) ศึกษาลักษณะทาง สัณฐานวิทยา และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 18s rDNA ของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 3 ไอโซเลต โดยศึกษาการเจริญเติบโตบนอาหาร 4 ชนิด ได้แก่ sabouraud dextrose agar (SDA), potato dextrose agar (PDA), mungbean agar (MA) และ sorghum agar (SA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน และเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละไอโซเลตโดยวัดเส้น ผ่านศูนย์กลางทุกวัน พบว่าอัตราการเจริญแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์และในแต่ละอาหาร โดยใน อาหาร PDA พบว่า TISTR 3185 (*M. anisopliae* var. *anisopliae*) เจริญเร็วที่สุดมีเส้นผ่านศูนย์กลาง บนอาหารเท่ากับ 3.83 เซนติเมตร และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร SDA พบว่า conidia มีทั้งรูปทรงกลม และทรงกระบอกโดย conidia รูปทรงกระบอกตรงที่มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 2.52 x 5.85 ไมโครเมตร และรูปทรงค่อนข้างกลมที่มีขนาด conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3.03 x 4.25 ไมโครเมตร ลักษณะโคลโคนีมีการสร้างเส้นใยสีขาวฟู ต่อมาเจริญเป็นร่องลึกลงไป ในอาหาร โดยมี บางส่วนฟูและบางส่วนยุบลง จึงเกิดเป็นริ้วและร่องออกจากกลางโคลโคนีโดยรอบ

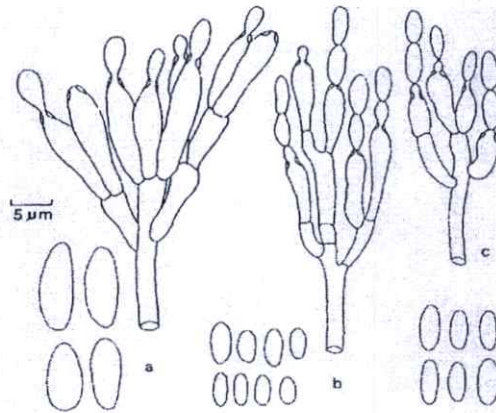
ในส่วนกลางโคโลนีจะฟูมากที่สุด และ conidia มีสีเขียวปนเทา และไอโซเลต BPH 1 (*M. anisopliae* var. *majus*) เจริญเติบโตช้าที่สุดในอาหารทุกชนิด และลักษณะรูปร่างของ conidia เป็นรูปทรงกระบอก และคอดตรงกลาง โดยมีขนาด conidia เฉลี่ยเท่ากับ 3.09×12.15 ไมโครเมตร และเส้นใยที่ยังอ่อนมีสีขาว ลักษณะโคโลนีบนแผ่นคล้ายกำมะหยี่ ต่อมาสีขาวปนเหลืองในบางบริเวณของโคโลนี และเป็นคลื่นออกจากกลางโคโลนี บริเวณที่สร้าง conidia มีสีเขียวเข้มอมฟ้า และการศึกษาของ Maketon และคณะ (2007) คัดแยกเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงจากดิน และแมลงในภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย ได้นำตัวอย่างแต่ละสปีชีส์มาทำการทดลองหาประสิทธิภาพในการควบคุมปลวก โดยพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* CKM-048 มีประสิทธิภาพสูงที่สุด และได้ส่งไอโซเลตของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่มีความรุนแรงในการควบคุมปลวกนี้ไปเก็บรักษาที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) ที่ได้รับรหัสใหม่เป็น TISTR 3607 และจากผลการทดลอง ในเรื่องการศึกษาอัตราการเจริญบนอาหาร ได้แก่ sabouraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY) ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 5 อุณหภูมิ คือ 10, 20, 27, 30 และ 40 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้รวดเร็วที่สุดที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิห้องที่ใช้ในการศึกษา โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางในวันที่ 14 เท่ากับ 6.88 เซนติเมตร

2.5.2 *M. flavoviride*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยรวมแตกต่างจาก *M. anisopliae* ทั้งขนาด conidia รูปร่างของ phialophore และ phialide โดยลักษณะ phialide มีรูปร่างเหมือนกระบอกที่ด้านหนึ่งกว้าง และอีกด้านหนึ่งจะเรียวเล็กกว่า conidia เป็นรูปทรงกลมรีหรือทรงไข่ต่อกันเป็นสายยาวติดกันแน่น และ conidia มีขนาดเล็กเฉลี่ย $1.75 \times 3-4$ ไมโครเมตร สีของโคโลนีหรือเส้นใยเป็นมีสีเขียวอมเหลือง (yellow green) เขียวจาง (pale green) เขียวปนเทา (gray green) สีขาวหรือน้ำตาล (brown) และลักษณะโคโลนีแบบแบนราบ (flat) มีอัตราการเจริญเติบโต และการสร้าง conidia ช้า (Petch 1931; 1934; Tulloch, 1976; Rombach, 1987) โดย *M. flavoviride* แยกได้จากด้วงวงศ์ Curculionidae (Gams และ Rozsypal, 1973 และ Marchal, 1997) จากด้กัแตน (Evans และ Samsom, 1982 และ Milner, 1997) และจากดินในพื้นที่การเกษตรในประเทศเยอรมัน และเนเธอร์แลนด์ (Gams และ Rozsypal, 1973) เชื้อราสปีชีส์นี้มีความจำเพาะเจาะจงกับด้วงวงงุ่นสีดำ (black vine weevils, *Otiorrhynchus sulcatus* F.) (Marchal, 1997 และ Soares และคณะ, 1983) หนอนแมลงวันเจาะรากหัวหอม (onion root maggot, *Delia antiqua*) (Poprawski และคณะ, 1985) และด้กัแตน และในปัจจุบันส่วนใหญ่นิยมใช้เป็นสารชีววิธีในการควบคุมการแพร่ระบาดของแมลงจำพวกด้กัแตนต่างๆ (Milner, 1997)

Tulloch (1976) ได้นำเสนอและจัดกลุ่ม *Metarhizium* ออกเป็น 2 สายพันธุ์ คือ *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* จากลักษณะ conidia ซึ่ง *M. flavoviride* มีลักษณะ conidia เป็น

รูปทรงรี สีของโคโลนีสีตั้งแต่สีอ่อนขำงเทา (grayish/greyish) เชื้อวอมเหลืองจนถึงสีเขียวซีมัว และสีเนื้อ (buff) ต่อมา Rombach และคณะ (1986) ได้ค้นพบลักษณะใหม่ของ *M. flavoviride* จึงแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *M. flavoviride* var. *flavoviride* และ *M. flavoviride* var. *minus* เมื่อนำมาศึกษาและเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDAY ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าลักษณะ phialide เป็นรูปร่างเหมือนกระบองที่มีด้านหนึ่งกว้างออกและอีกด้านเรียวเล็กกว่า ลักษณะ conidia มีรูปไข่และรี แต่มีความแตกต่างในเรื่องขนาดของ conidia โดยพบว่า *M. flavoviride* var. *flavoviride* มี conidia ขนาด 3.8-5.5 x 7-11 ไมโครเมตร และมีสีเขียวอมเหลือง (รูปที่ 2.8 A) แต่ *M. flavoviride* var. *minus* ที่คัดแยกได้จากด้กแตนมีขนาด conidia เล็กกว่า *M. flavoviride* var. *flavoviride* โดยมีขนาด conidia อยู่ในช่วง 2.3-2.7 x 4.6-5.9 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.8 B) และเมื่อสีเชื้อวปนเทา เมื่อนำ *M. flavoviride* var. *minus* ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร SDAY พบว่าขนาด และรูปร่างของ phialide และ conidia เกิดการเปลี่ยนแปลงไป (รูปที่ 2.8 C) จากที่พบว่า *M. flavoviride* var. *minus* มี conidia ขนาดเล็กกว่านั้นทำให้มีลักษณะ conidia คล้ายคลึงกับ *M. anisopliae* และ var. *minus* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร SDAY มีขนาดของ phialophore เท่ากับ 2.8 x 8.4 ไมโครเมตร โดยมีลักษณะโคโลนีแบนราบ และ conidia เกาะติดแน่น ในขณะที่ var. *flavoviride* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร malt extract และ oatmeal agar มีขนาด phialophore อยู่ในช่วง 3-4.5 x 9-14 ไมโครเมตร จากลักษณะของ phialophore และลักษณะ phialide ที่เป็นรูปร่างเหมือนกระบองที่ด้านหนึ่งกว้างและอีกด้านเรียวกว่า และ conidia ที่เป็นรูปทรงรีหรือไข่นั้นทำให้ *M. flavoviride* var. *minus* มีลักษณะคล้าย *M. album*



รูปที่ 2.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา *M. flavoviride*; A: *M. flavoviride* var. *flavoviride*; B: *M. flavoviride* var. *minus* ที่แยกจากเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (brown planthopper) และ C: *M. flavoviride* var. *minus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDAY (ที่มา Rombach และคณะ, 1986)

Driver และคณะ (2000) ได้จัดแบ่งแยกกลุ่มเชื้อรา *M. flavoviride* var. *flavoviride* และ *M. flavoviride* var. *minus* ที่ใช้ในการศึกษามาก่อนอยู่ในกลุ่ม 4 และกลุ่ม 5 ตามลำดับ และพบว่า var. *flavoviride* เจริญเติบโตดีในที่อุณหภูมิต่ำ conidia สีเขียวจางเกาะแน่นเป็นแผ่น

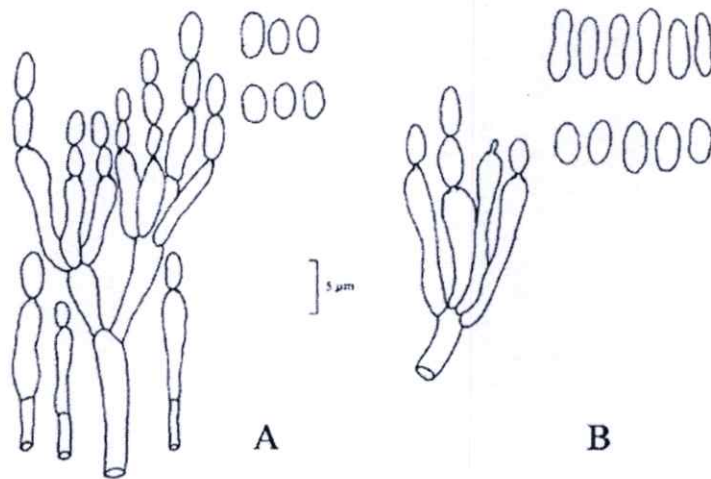
Luangsa-ard และคณะ (2007) เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. flavoviride* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว คือ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30-40 มิลลิเมตรใน 14 วัน โคลนินในระยะแรกมีสีขาวหลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสีเขียวอมเหลือง ลักษณะ conidia เป็นรูปทรงกระบอกหรือยาวรีขนาดประมาณ 2 x 5-7 ไมโครเมตร phialide เป็นรูปทรงกระบอกยาวขนาด 2 x 4-8 ไมโครเมตร

2.5.3 *M. album*

มีลักษณะคล้าย *M. flavoviride* var. *minus* เนื่องจากลักษณะของ phialophore และ phialide ที่เป็นรูปร่างเหมือนกระบอกปลายด้านหนึ่งกว้าง และอีกด้านหนึ่งจะเรียวกว่า และลักษณะ conidia ที่เป็นรูปทรงรีหรือไข่ แต่มีความแตกต่างจาก *M. flavoviride* var. *minus* โดย *M. album* มี conidia สีขาวหรือน้ำตาล (Rombach และคณะ, 1986)

Petch (1931) คัดแยกเชื้อรา *M. album* จากเพลี้ยจักจั่น (Leafhopper: *Cofana* (*Tettigoniella*) *spectra*) จากประเทศศรีลังกา พบว่า *M. album* มีลักษณะรูปร่างของ phialophore ขนาดและสี conidia แตกต่างจาก *M. anisopliae* คือมีขนาดเล็กเป็นรูปทรงไข่ และมีสีขาวซึ่งลักษณะต่างๆ นั้นใกล้เคียงกับ *M. brunneum* แต่ Tulloch (1976) จัดกลุ่มให้ *M. album* และ *M. brunneum* รวมอยู่ในกลุ่ม *M. anisopliae* หลังจากนั้น Rombach และคณะ (1986, 1987) ศึกษาตัวอย่างของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่มี conidia เป็นรูปทรงรีขนาดเล็ก และสีน้ำตาลหรือค่อนข้างขาว phialide รูปร่างเหมือนกระบอกที่ปลายด้านหนึ่งจะกว้าง และปลายอีกด้านหนึ่งจะเรียวกว่า ซึ่งคัดแยกได้จากเพลี้ยจักจั่นในแปลงข้าวแถบเอเชีย ซึ่งคล้ายกับการรายงานของ Petch (1931, 1935) จึงแยก *M. album* ออกจากกลุ่ม *M. anisopliae* และเห็นด้วยที่ *M. brunneum* คือ *M. album* โดยมีลักษณะของ phialophore, phialide และ conidia คล้าย *M. flavoviride* var. *minus* มีความแตกต่างอย่างชัดเจนซึ่ง *M. album* มี conidia สีขาวหรือน้ำตาล และลักษณะโคโลนินบนอาหารจะมีเส้นใยจำนวนมากเจริญขึ้นมาเหนือผิวหน้าอาหาร และ conidia มีลักษณะร่วนซุยไม่เกาะกันแน่น ซึ่งแตกต่างกับ *M. flavoviride* var. *minus* ที่โคโลนินมีผิวราบเรียบไม่มีเส้นใยฟู และ conidia จะเกาะกันแน่น โดย Rombach และคณะ (1987) ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. album* ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 4 ชนิด (PDA, SDAY, Malt Extract และ Emerson's YpSs Agar) พบลักษณะโคโลนินของเชื้อรามีลักษณะแตกต่างกันไปในอาหารที่แตกต่างกัน เช่น ในอาหารเลี้ยงชนิด PDA ที่ด้านหลังจานเพาะเลี้ยงพบโคโลนินมีสีเหลืองอ่อนหรือไม่มีสี phialophore มีขนาด 2-3.5 x 15-80 ไมโครเมตร และมีการแตกกิ่งของ phialide จำนวน 2-5 กิ่งต่อก้าน phialophore โดย conidia ที่แยกมาจากแมลงที่ถูกเข้าทำลายเป็นทรงรีแคบหรือไข่ ที่มีขนาด 1.5-2.5 x (3-) 4-6 ไมโครเมตร

(รูปที่ 2.9 A) และถ้านำมาเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงขนาดของ conidia มีขนาด 1.5-2 x 5-7.5 ไมโครเมตร และ conidia มีลักษณะเป็นรูปวงรียาวเกือบเป็นทรงกระบอกซึ่งอาจพบความยาวได้ถึง 8-11 ไมโครเมตร (รูปที่ 2.9 B) โดย conidia อยู่ต่อกันเป็นสายซึ่งมีสีขาว สีออกน้ำตาล หรือสีน้ำตาลอ่อน ส่วนในการเพาะเลี้ยงในอาหาร SDAY หรือ Emerson's YpSs Agar พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตช้า ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ประมาณ 1-1.5 เซนติเมตร อาจสรุปลักษณะของ *M. album* ได้ว่า conidia เป็นรูปวงรีหรือรูปไข่ที่มีขนาด ≤ 7 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลอมเหลือง (Fawn) ถึงสีน้ำตาลหรือสีขาว ลักษณะโคโลนีบนมีเส้นใยฟูเหมือนปุยนุ่ม โผล่ขึ้นเหนือผิวหน้าอาหารเป็นจำนวนมาก โดยเส้นใยมีสีขาวหรือสีออกน้ำตาลเนื่องมาจากสีของ conidia ที่ต่อกันเป็นสายแบบไม่เกาะแน่นมาก ดังนั้น conidia หรือ โคโลนีจึงร่วงเป็นผง (Rombach และคณะ, 1987) ต่อมา Driver และคณะ (2000) ได้คัดแยกเชื้อ *M. album* ได้จากเปลือกจิ้งจกในประเทศฟิลิปปินส์ซึ่งเป็นประเทศที่พบสปิซีส์นี้ได้ในอัตราสูง และได้จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 จากจำนวนใน 10 กลุ่ม ซึ่ง *M. album* มีลักษณะ conidia มีสีน้ำตาลเป็นรูปทรงไข่ขนาดเล็กจนถึงรูปวงรีมีขนาดโดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 1.5-2.5 x 4.6-6 ไมโครเมตร

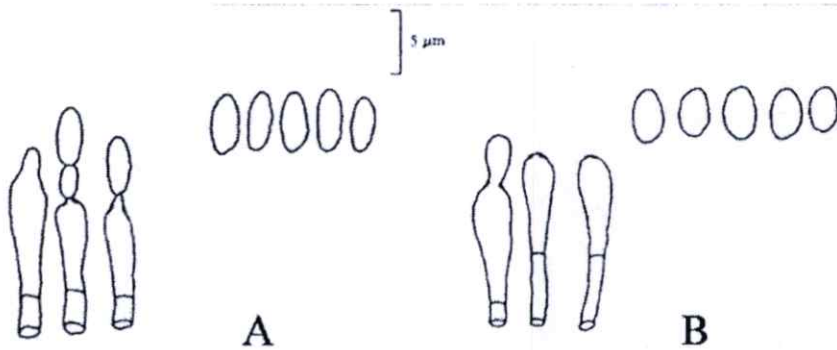


รูปที่ 2.9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialophore, phialide และ conidia ของเชื้อรา *M. album*; A: คัดแยกจากเปลือกจิ้งจก และ B: จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร (ที่มา Rombach และคณะ, 1987)

2.5.4 *M. brunneum*

Petch (1935) ได้อธิบายสายพันธุ์ใหม่ที่คัดแยกได้จากแมลงพวก Homoptera ในประเทศฟิลิปปินส์ ลักษณะ phialide เป็นรูปเหมือนกระบองที่ปลายด้านหนึ่งจะกว้างและปลายอีกด้านหนึ่งจะเรียกว่า ลักษณะ conidia มีรูปทรงกลมรีหรือทรงไข่ขนาดเล็ก และมีสีเหลืองอ่อน แต่

ถ้าอยู่เป็นกลุ่มก้อนปริมาณมากเห็นเป็นสีน้ำตาลหรือน้ำตาลอ่อน ต่อมาในปี 1964 Latch สรุปผลการศึกษาว่า *M. brunneum* ไม่มีความแตกต่างจากสปีชีส์อื่นจัดอยู่ในสปีชีส์ *M. anisopliae* หลังจากนั้น Tulloch (1976) ที่ยอมรับเพียง *M. anisopliae* และ *M. flavoviride* จึงจัดให้ *M. brunneum* เป็นชนิดเดียวกัน *M. album* และเป็นสปีชีส์เดียวกันกับ *M. anisopliae* ซึ่ง Rombach (1987) มีความคิดเห็นสอดคล้องกันเฉพาะที่จัดกลุ่มให้ *M. brunneum* เป็นชนิดเดียวกับ *M. album* ซึ่งมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน (รูปที่ 2.10) Bischoff และคณะ (2009) นำชื่อกลับมาใช้ใหม่โดยตั้งเป็นสปีชีส์ *Metarhizium brunneum* Petch. โดยมี conidia ขนาด 2.0-3.0 x 4.5-8.0 ไมโครเมตร สีเขียวจืด และสีเหลืองจาง (pale yellow)



รูปที่ 2.10 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ phialide และ conidia ของเชื้อรา *M. brunneum*, A: คัดแยกจากเพลี้ยจักจั่น และ B: จากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร (ที่มา: Rombach และคณะ, 1987)

2.5.5 *M. acridum* หรือ *M. anisopliae* var. *acridum*

Driver และคณะ (2000) เเพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* บนอาหาร SDAY พบว่ามีการเจริญรวดเร็ว คือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีประมาณ 30 มิลลิเมตร หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส phialide เป็นรูปทรงกระบอกขนาดค่อนข้างใหญ่ขนาด 2.5 x 7.3 ไมโครเมตร และ conidia เป็นรูปทรงไข่ขนาด 2.6 x 4.5 ไมโครเมตรสีเขียวมเหลืองเข้ม (munsell 10Y 4/2) รวมทั้ง Lomer และคณะ (2001) รายงานว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาในด้านขนาด และรูปร่างของ conidia ไม่สามารถคัดแยก *M. anisopliae* var. *acridum* ออกจาก *M. anisopliae* สายพันธุ์อื่นๆ ได้ ต่อมา Bischoff และคณะ (2009) ได้จัดกลุ่มอยู่ในชื่อใหม่ว่า *Metarhizium acridum* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov. โดยมี conidia รูปไข่ขนาดเล็ก 2.0-4.5 x 4.0-7.5 ไมโครเมตรสีเหลืองปนเทาหรือสีเขียวนเทา และ phialilide ขนาด 2.0-4.5 x 4.5-13.0 ไมโครเมตร

2.5.6 *M. guizhouense*

Liang และคณะ (1991) พบว่า *C. taii* เป็นระยะอาศัยเพศของ *M. taii* ต่อมา Bischoff และคณะ (2009) ได้จัดกลุ่ม และตั้งชื่อใหม่ว่า *Metarhizium guizhouense* Q.T. Chen & H.L. Guo มี conidia ขนาด 2.0-3.5 x 5.5-10 ไมโครเมตร สีเขียวเข้ม และ phialide ขนาด 2.0-3.5 x 6.0-20.0 ไมโครเมตร

2.5.7 *M. globosum*

Bischoff และคณะ (2009) เพิ่มเป็นสปีชีส์ใหม่ โดยโคโลนีบนอาหาร SDAY/4 ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เริ่มแรกโคโลนีมีสีขาว และเปลี่ยนเป็นสีเขียวปนเทา เส้นใยแบนราบมีขนาด 2.0-4.0 ไมโครเมตร phialophore ตั้งตรง มีการแตกของ phialide 2-3 phialide ต่อก้าน ซึ่ง phialide เป็นรูปกระบอกที่ปลายด้านหนึ่งจะกว้าง และปลายอีกด้านหนึ่งจะเรียกว่า มีความยาว 5.0-12.0 ไมโครเมตร ความกว้าง 3.0-4.0 ไมโครเมตร แต่มี conidia เป็นทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 4.0-5.0 ไมโครเมตร

2.5.8 *M. lepidiotae* หรือ *M. anisopliae* var. *lepidiotae* (*lepidiotum*)

การเจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงชนิด SDAY เป็นไปอย่างรวดเร็ว คือ มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 70 มิลลิเมตร ใน 14 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เส้นใยมีความกว้าง 2 ไมโครเมตร phialide เป็นรูปทรงกระบอกขนาด 3-4.1 x 7.3-10.6 ไมโครเมตร conidia เป็นรูปทรงกระบอก สีเขียวอมเหลืองเข้ม (Munsell 7.5Y 4/2) (Driver และคณะ, 2000) ต่อมา Bischoff และคณะ (2009) จัดกลุ่มตั้งชื่อใหม่เป็น *Metarhizium lepidiotae* (Driver & Milner) J.F. Bisch., Rehner & Humber stat. nov. ซึ่ง phialide มีขนาด 2.0-3.5 x 6.5-12 ไมโครเมตร และ conidia ขนาด 2.0-4.0 x 5.0-7.5 ไมโครเมตร มีสีเขียวเข้ม

2.5.9 *M. robertsii*

Bischoff และคณะ (2009) เพิ่มเป็นสปีชีส์ใหม่ ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. robertsii* มีความแตกต่างจาก *M. anisopliae* ไม่ชัดเจนจึงเคยจัดอยู่ในกลุ่ม *M. anisopliae* โดยพบว่า phialide ขนาด 2.0-3.5 x 6.0-14.5 ไมโครเมตร และ conidia มีขนาด 2.0-3.5 x 5.0-7.5 ไมโครเมตร มีสีเขียวเข้มหรือเขียวปนเทา แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความแตกต่างกันจึงแบ่งเป็นอีกสปีชีส์หนึ่ง

2.6 เทคนิคทางโมเลกุล

ใช้หลักการพื้นฐานของการจำลองดีเอ็นเอ (DNA Replication) เพื่อสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่จากสายดีเอ็นเอต้นแบบให้ได้จำนวนมากด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรส (DNA polymerase) ในหลอดทดลอง โดยนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุลได้หลายเทคนิค เช่น เทคนิค RAPD, RFLP, AFLP, SSR หรือ microsatellites และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ในส่วนของการศึกษาหาความหลากหลาย และเครื่องหมายทางโมเลกุลของเชื้อราสกุล *Metarhizium* นั้นมีผู้ทำการศึกษาไว้หลายเทคนิค โดยแบ่งตามเทคนิคดังนี้

2.6.1 การศึกษาด้วยเทคนิค RAPD

Fegan และคณะ (1993) ใช้เทคนิค RAPD ด้วยไพรเมอร์ F 06, F 07, F 08, F 10, H 01, H 02, CK 06, CK 09, CK 12 และ CK 16 เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จำนวน 30 ไอโซเลต และ *M. anisopliae* var. *majus* จำนวน 1 ไอโซเลตที่คัดแยกจากตัวอย่างของแมลง การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอมีรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะชัดเจนจำนวน 30 แถบ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบ่งได้ 10 กลุ่ม โดยในกลุ่มที่ 1 มี *M. anisopliae* var. *anisopliae* จำนวน 6 ไอโซเลตที่แสดงความใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* var. *majus* โดยมีค่าความคล้ายคลึง similarity ของรูปแบบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าร้อยละ 80 และไอโซเลตในกลุ่มนี้คัดแยกได้จากแหล่งที่อยู่ (geographical origin) เดียวกัน แต่ในกลุ่ม 1-9 นั้นมีความหลากหลายทั้งจากแมลงอาศัยหรือ โฮสต์ (host) และแหล่งที่อยู่ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแมลงอาศัย และแหล่งที่อยู่

Bidochka และคณะ (1994) ใช้เทคนิค RAPD ที่ใช้ไพรเมอร์ A (5'-TTATGTAAA ACGACGGCCAGT-3'), B 5'-(GACA)₄-3' และ C (5'-CGACTGTCGG-3') เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายในแต่ละสปีชีส์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* (*M. anisopliae* และ *M. flavoviride*) จำนวนทั้งหมด 21 ไอโซเลต และ *B. bassiana* จำนวน 3 ไอโซเลต ที่แยกจากแมลงพวกด้กั้กแตน พบว่าสามารถแยกกลุ่มของ *M. flavoviride*, *M. anisopliae* และ *B. bassiana* และรูปแบบแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของ *M. flavoviride* มีความหลากหลายในสปีชีส์น้อยกว่า *M. anisopliae* ซึ่งให้เห็นว่า *M. anisopliae* น่าจะมีสปีชีส์ที่ไม่สามารถแบ่งแยกกันได้ และความหลากหลายในแต่ละกลุ่มไม่ขึ้นกับแมลงอาศัย และแหล่งที่อยู่

Driver และคณะ (2000) คัดเลือกไอโซเลตของเชื้อราสกุล *Metarhizium* มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์เช่นเดียวกับ Fegan และคณะ (1993) คือ H 01, H 02, F 06, F 07, F 08 และ F 10 สามารถแยกกลุ่มได้และให้ผลสัมพันธ์กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS และสรุปว่า RAPD ขึ้นขึ้นกับการทดลองของ Fegan และคณะ (1993) และ Bidochka และคณะ (1994)

De Carvalho Freire และคณะ (2001) ใช้เทคนิค RAPD ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ไอโซเลต E₉ ที่ผ่านการกลายพันธุ์โดยรังสีแกมมา และแยกความแตกต่างได้ 5 สายพันธุ์ เมื่อใช้ไพรเมอร์จำนวน 7 ชนิดคือ OPW 01, OPW 02, OPW 03, OPW 04, OPW 09, OPW 12 และ OPW 13 พบว่ามีแถบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 113 แถบ เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า similarity ทั้ง 5 ไอโซเลตพบว่ามีค่าร้อยละ 75 และมีสองสายพันธุ์ที่มีค่า similarity สูงถึงร้อยละ 87.5 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน

Velásquez และคณะ (2007) ศึกษาหาเครื่องหมายทางโมเลกุลเพื่อใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค SSR, RAPD และ RFLP บริเวณ ITS เพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 39 ไอโซเลต ในประเทศชิลี โดยในส่วนเทคนิค RAPD ขึ้นแรกใช้ทั้งหมด 64 ไพร์เมอร์ และคัดเลือกเพื่อใช้ในการหาวิวัฒนาการ 20 ไพร์เมอร์ (OPA-03, 04, 08, 09, 10, 11, 12 และ 13; OPC-01; OPD-02, 03, 07, 08, 13, 17 และ 18; และ OPAB-03,04, 09 และ 11) เปรียบเทียบหาค่าความคล้ายคลึงได้เท่ากับร้อยละ 41 มีความแตกต่างเพียงเล็กน้อยระหว่างความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อ *Metarhizium* กับแหล่งที่อยู่ และสามารถหาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ และสามารถแยกแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้โดยใช้ไพร์เมอร์จำนวนน้อย และทั้งสามเทคนิคนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างที่ทดลองครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่อยู่

2.6.2 การศึกษาด้วยเทคนิค SSR หรือ microsatellites

Enkerli และคณะ (2005) สามารถใช้เทคนิค microsatellites ในการหาความหลากหลายของ *M. anisopliae* ทั้งหมด 34 ไอโซเลตโดยใช้ไพร์เมอร์ 14 คู่ และไพร์เมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้กับทุกไอโซเลต

Velásquez และคณะ (2007) ศึกษาหาเครื่องหมายทางโมเลกุล โดยเทคนิค SSR, RAPD และ RFLP เพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 39 ไอโซเลต ในประเทศชิลี โดยในส่วนเทคนิค SSR ที่ใช้ไพร์เมอร์จำนวน 12 คู่ และเปรียบเทียบค่า similarity ได้เท่ากับร้อยละ 45.2 เนื่องจากไพร์เมอร์ที่มีจำนวนน้อยจึงไม่สามารถแยกจีโนไทป์ (genotype) ออกจากกันได้อย่างชัดเจน และจำนวนอัลลีล (allele) ที่ได้ต่อตำแหน่งที่ได้มีน้อย ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการแยกแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ แต่มีข้อดี คือ มีความน่าเชื่อถือ และสะดวกต่อการตรวจผลมากกว่าเทคนิค RAPD และทั้งสามเทคนิคนั้นแสดงให้เห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมในตัวอย่างที่ทดลองครั้งนี้ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งที่อยู่

2.6.3 การศึกษาด้วยเทคนิค RFLP

Pipe และคณะ (1995) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จำนวน 33 ตัวอย่าง กับแมลงอาศัย และแหล่งที่อยู่ของเชื้อ ด้วยเทคนิค RFLP จากเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 8 ชนิด โดยใช้ดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) และใช้ตัวติดตาม (DNA probe) บริเวณ rDNA ของ *Saccharomyces cerevisiae*: SCP 7 พบว่ารูปแบบการตัดของเอนไซม์ *BamH* I, *Hind* III, *Pst* I และ *Xho* I สามารถแยก *M. album* และ *M. flavoviride* ออกจากสปีชีส์อื่นๆของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* โดย *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ไม่มีตำแหน่งจดจำต่อเอนไซม์ *BamH* I หรือ *Hind* III ทำให้รูปแบบการตัดของ *M. anisopliae* แตกต่างไปจากสปีชีส์อื่นๆ ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยมีเพียง *M. album* เท่านั้นที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III และในตำแหน่งของ rDNA ของทุกสปีชีส์ไม่สามารถตัดด้วย

เอนไซม์ *Xho* I ได้ และพบว่า *M. anisopliae* var. *anisopliae* สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่มย่อย โดย *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่คัดแยกจากยุโรป บราซิล ฟิลิปปีนส์ และอเมริกา ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการแบ่งกลุ่มตามแหล่งที่อยู่ แต่ให้ข้อมูลไม่ชัดเจนว่าสัมพันธ์กับแมลงอาศัย และแสดงให้เห็นว่า *M. anisopliae* var. *anisopliae* ที่คัดแยกจากประเทศนิวซีแลนด์นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

Mavridou และ Typas (1998) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 25 ไอโซเลตด้วยเทคนิค RFLP ในตำแหน่ง rDNA และ mitochondrial DNA (mt DNA) พบว่า การศึกษาในตำแหน่ง mtDNA มีความสามารถในการคัดแยกตัวอย่างได้ดีกว่าในตำแหน่งของ rDNA โดยในตำแหน่งของ mtDNA ใช้ไพรเมอร์ชนิด ML3/4 (ML3 5'-GTCGGTTTTCTACGAAACATATTTAAG-3' และ ML4 5'-GAGGATAATTTGCCGAGTTCC-3'), ML7/8 (ML7 5'-GACCCTATGCAGCTTCTACTG-3' และ ML8 5'-TTATCCCTAGCGTAACTTTTATC-3') และ NMS1/2 (NMS1 5'-CAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATG-3' และ NMS2 5'-GCGGATCATCGAATTAATAACAT-3') ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 870, 730 และ 670 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์ใดเอนไซม์หนึ่งจาก *Hae* III, *Cfo* I, *Hpa* II สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 10 กลุ่ม แต่เมื่อใช้เอนไซม์ *Kpn* I และ *Sac* I พร้อมกันสามารถแบ่งตัวอย่างจำนวน 16 ไอโซเลต ออกเป็น 4 กลุ่ม สำหรับในตำแหน่ง rDNA ใช้ไพรเมอร์ TW 81/AB 28 (TW81 5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3' และ AB28 5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') ที่สามารถเพิ่มบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 610 คู่เบส และเมื่อใช้เอนไซม์ชนิด *Bgl* I, *Bgl* II, *Xba* I, *EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, *BamH* I และ *Hae* III ตัด และติดตามด้วยตัวติดตามชนิด rDNA จาก *S. cerevisiae* พบว่าเอนไซม์ชนิด *Bgl* I, *Bgl* II, *Xba* I, *EcoR* I และ *Pst* I แสดงให้เห็นว่า *M. anisopliae* จำนวน 7 ไอโซเลตมีความแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ ยกเว้นสายพันธุ์ ITALY-12 ที่เอนไซม์ *BamH* I สามารถตัดได้

Bidochka และคณะ (2001) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* จำนวน 83 ไอโซเลตจากประเทศแคนาดาโดยใช้ทั้งเทคนิค allozymes, RAPD และ RFLP ในตำแหน่งยีน subtilisin-like protease-encoding gene: pr1 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด *Rsa* I และ *Dde* I โดยแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ และแมลงอาศัย

Destéfano และคณะ (2004) ใช้ไพรเมอร์ชนิด ITS 1/ITS 4 ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้มาตรวจสอบและบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้ โดยพบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศออสเตรเลีย (สายพันธุ์ 14), *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศบราซิล (E₉, B/Vi, C), *M. flavoviride* และ *M. album* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 600, 540, 600 และ 650 คู่เบส

ตามลำดับ แม้ว่าสามารถบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ได้ เนื่องจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน แต่ยังไม่สามารถนำข้อมูลด้านขนาดของชิ้นดีเอ็นเอมาใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ เนื่องจากขนาดของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ 14 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ *M. flavoviride* จึงต้องหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นร่วมด้วย คือ เทคนิค RFLP แสดงให้เห็นว่าเกิดรูปแบบแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ ในการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Afa* I, *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Hpa* II และ *Sau* 3A I รวมทั้งแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน โดย *Alu* I, *Hae* III และ *Hpa* II ตัดแล้วได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 100-650, 100-450 และ 100-370 คู่เบส ตามลำดับ โดยเอนไซม์ *Alu* I ไม่สามารถตัด *M. anisopliae* สายพันธุ์ E₉, B/Vi และ C ที่มาจากประเทศบราซิลได้

Velásquez และคณะ (2007) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จากประเทศชิลีจำนวน 39 ไอโซเลต จากพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ โดยอาศัยเทคนิคโมเลกุลทั้งเทคนิค RAPD, SSR รวมทั้ง PCR-RFLP พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งที่อยู่ โดยในเทคนิค RFLP ทำการศึกษาในตำแหน่ง ITS ของ rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง ITS 1, ITS 2, ITS 3, ITS 4 และ ITS 5 โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 17 ชนิด คือ *Acc* I, *Alu* I, *Dde* I, *Eco*R I, *Eco*R V, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* III, *Hpa* II, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Nde* II, *Rsa* I, *Sin* I, *Tru* 9I และ *Xho* I ผลการศึกษาพบว่าในตำแหน่งของ ITS1-5.8S-ITS2 ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ชนิด *Acc* I, *Dde* I, *Eco* RI, *Eco* RV, *Nde* II, *Sin* I และ *Xho* I และในตำแหน่ง ITS 1 มีตำแหน่งในการจดจำของเอนไซม์ *Hha* I, *Hinf* III, *Msp* I, *Alu* I, *Hae* III, *Rsa* I และ *Tru* 9I สามารถแบ่งกลุ่มได้ 12 จีโนไทป์ และในตำแหน่ง ITS 2 มีตำแหน่งในการจดจำของเอนไซม์ *Hinf* III, *Msp* I, *Tru* 9I, *Alu* I, *Hae* III และ *Hha* I สามารถแบ่งกลุ่มได้ 15 จีโนไทป์ จากตัวอย่าง 39 ไอโซเลต

Enkerli และคณะ (2009) ศึกษาความหลากหลายและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในตำแหน่งยีน chitinase (*Chit*) 3 ชนิด คือ *Chit* 1, *Chit* 2 และ *Chit* 4 ด้วยคู่ไพรเมอร์ชนิด *chit* 1f/*chit* 1r (5'-CTCTGCAGGCCACT CTCGGT-3'/5'-AGCCATCTGCTTCCTCATAT-3'), *chit*2f/*chit*2r (5'-GACAAGCACCCGGAGC GC-3'/5'-GCCTTGCTTGACACATTGGTAA-3') และ *chit*4f/*chit*4r (5'-ATCCGGCAGCACGGC TAC-3'/5'-CTTGATCCGTCCCAGTTG-3') ตามลำดับ โดยในตำแหน่ง *Chit* 1 และ *Chit* 2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตำแหน่งละ 6 ชนิด คือ *Bsa*J I, *Bst*U I, *Hha* I, *Scr*F I, *Sml* I และ *Tfi* I และ *Alu* I, *Bfa* I, *Hpy*CH4 IV, *Hpy*CH4 V, *Nae* I และ *Zra* I แต่ในตำแหน่ง *Chit* 4 ใช้ สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 4 ชนิด *Bst*U I, *Hae* III, *Mbo* I และ *Nco* I โดยศึกษาจาก *M. anisopliae* var. *anisopliae* จำนวน 22 ไอโซเลต และสปีชีส์อื่นอีกจำนวน 5 ไอโซเลต ผลการศึกษาด้วยเทคนิค PCR-RFLP สามารถแยกสปีชีส์ของเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ออกจากกันอย่างชัดเจน โดยสามารถแยกกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่ม 1 และ 2 เป็น *M. anisopliae* ซึ่งไม่สามารถแยกกลุ่มระหว่าง

M. anisopliae var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ได้ นอกจากนั้นยังสามารถแบ่ง *M. anisopliae* var. *anisopliae* ออกเป็น 14 จีโนไทป์ โดย *M. anisopliae* var. *acidum*, *M. flavoviride* var. *minus* และ *M. flavoviride* var. *flavoviride* แยกเป็นอีกกลุ่มหนึ่ง

2.6.4 การศึกษาด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

Pantou และคณะ (2003) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ไอโซเลต ME 1 (AF218207) โดยใช้ไพรเมอร์หลายชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณในตำแหน่ง rDNA ได้ทั้งหมด และพบว่ามีความยาวเท่ากับ 8,118 คู่เบส แบ่งขนาดได้เป็นบริเวณ 18S rDNA จำนวน 1,792 คู่เบส ITS1-5.8S-ITS2 จำนวน 2,466 คู่เบส, 28S rDNA จำนวน 3,337 คู่เบส และบริเวณ IGS จำนวน 2,523 คู่เบส

Hughes และคณะ (2004) คัดแยกเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จำนวน 45 ไอโซเลตรอบบริเวณรังมดกัดใบไม้ (leaf cutting ant) ที่มาจากพื้นที่ต่างๆ และใช้เทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 2 ชนิด คือ Ma-IGSspF และ Ma-IGSspR ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของตำแหน่ง IGS ได้จีนดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบส ซึ่งได้มาจากการศึกษาของ Pantou และคณะ (2003) ที่ไพรเมอร์จำเพาะนี้สามารถเพิ่มปริมาณจีนดีเอ็นเอได้เฉพาะเชื้อราสปีชีส์ *M. anisopliae* var. *anisopliae* แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ในสายพันธุ์อื่นหรือ *Metarhizium* สายพันธุ์อื่น จาก phylogenetic tree พบว่าไม่สามารถแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของแหล่งที่อยู่หรือวิธีการที่ได้ตัวอย่างเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae* มาไม่ว่าเป็นการใช้เทคนิค baiting หรือการคัดแยกจากดิน และลักษณะป่าที่อยู่อาศัยที่ทำการคัดเลือกมาในการทดลองนี้พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่าลักษณะทางพันธุกรรมขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของมดกัดใบไม้ที่ถูกอาศัย

Curran และคณะ (1994) หาแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ที่วิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างวิธี Parsimony และ Neighbor joining ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS 1-5.8s-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ TW 81 และ AB 28 ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมด 31 ไอโซเลต พบว่าสามารถแยกได้ออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มของ *M. anisopliae* และกลุ่มของ *M. flavoviride* ที่รวม *M. album* เข้าไปด้วย และข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ rDNA สามารถแยกวิวัฒนาการความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้ในระดับสปีชีส์

Driver และคณะ (2000) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* 123 ไอโซเลต ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ TW 81 และ AB 28 (Curran และคณะ, 1994) และเอาข้อมูลตำแหน่ง ITS มาเลือกไอโซเลตเพื่อทำในตำแหน่ง D 3 ด้วยคู่ไพรเมอร์ D 3 A และ D 3 B นำผลทั้งสองส่วนมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสามารถแยกสปีชีส์

ออกได้เป็น 10 กลุ่ม คือ *M. album* (กลุ่ม 1), *M. flavoviride* (กลุ่ม 2-6) และ *M. anisopliae* (กลุ่ม 7-10)

Entz และคณะ (2005) ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS ในการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง (specific primer) เพื่อพัฒนาวิธีการวิเคราะห์แบบจำเพาะเจาะจงโดยอาศัยพื้นฐานของเทคนิค PCR ในการตรวจสอบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงชนิด *M. anisopliae* var. *acridum* ซึ่งไพรเมอร์นี้จำเพาะเจาะจงต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อรา *M. anisopliae* var. *acridum* โดยเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ในสายได้ขนาด 420 คู่เบส แต่เชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. flavoviride* ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้

Yang และคณะ (2009) ค้นพบสปิซีสใหม่ของ *Cordyceps* ในประเทศจีน คือ *Cordyceps chongqingensis* sp. nov ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเทคนิควิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS และ 26S rDNA D 1-D 2 (ไพรเมอร์ 5'-GAGCGGATAACAAT TTCACAGG-3' และ 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3') โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร Czapek ที่เพิ่มผงแมลง และถั่วเหลืองร้อยละ 0.5 ที่ 25 องศาเซลเซียสได้ระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (*M. chongqingensis*) พบว่าในบริเวณ 26S rDNA D1/D2 มีขนาด 601 คู่เบส และบริเวณ ITS (ITS1-5.8S-ITS2) มีขนาด 553 คู่เบส และแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในบริเวณ 26S rDNA D1/D2 ของเชื้อมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *C. taii* (ค่า Bootstrap ร้อยละ 72) และในบริเวณ ITS มีความใกล้เคียงกับ *M. taii* (ค่าความคล้ายคลึงแบบ identity เท่ากับร้อยละ 98) ซึ่งเชื้อ *C. taii* นั้นเป็นระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อ *M. taii* และทั้ง 3 สปิซีสมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือน identity เท่ากับร้อยละ 100 สรุปจากบริเวณที่ศึกษาทั้ง 2 บริเวณนั้นสามารถคัดแยกและระบุสปิซีส *Cordyceps* หรือเชื้อราอื่นๆ ได้ ซึ่งผลการทดลองระบุได้ว่า *C. chongqingensis* มีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศกับ *M. taii* และตั้งชื่อใหม่ คือ *M. taii* var. *chongqingensis*

Bischoff และคณะ (2009) จัดอนุกรมวิธานโดยอาศัยพื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา และศึกษาหาความหลากหลายของ *M. anisopliae* ที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน 4 สายพันธุ์ พร้อมทั้งพิสูจน์ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของ *M. taii*, *M. pingshaense* และ *M. guizhouense* โดยหา phylogenetic tree ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 33 ไอโซเลตโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในหลายบริเวณ คือ Translation Elongation factor 1-alpha (EF-1 α) มีขนาด 1,700 คู่เบส, RNA polymerase II largest subunit (RPB 1) มีขนาด 2,783 คู่เบส, RNA polymerase second largest subunit (RPB 2) มีขนาด 1,799 คู่เบส, β -tubulin (Bt) มีขนาด 1,339 คู่เบส และตำแหน่ง IGS ซึ่งผลจากทั้งทางสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุลทำให้จัดอนุกรมวิธานใหม่ในระดับสปิซีส และเพิ่มสปิซีสใหม่อีกสองสปิซีส คือ *M. globosum* และ *M. robertsii*

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์

3.1.1 แหล่งที่มาของตัวอย่าง

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

3.1.2 เครื่องแก้ว อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.2.1 บีกเกอร์ (beaker)

3.1.2.2 กระบอกลม (cylinder)

3.1.2.3 ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)

3.1.2.4 ขวดแก้ว (bottle) ขนาดต่างๆ

3.1.2.5 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

3.1.2.6 แท่งแกว่ง (spreader)

3.1.2.7 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลม (needle)

3.1.2.8 เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมงอ (hook)

3.1.2.9 หัวงเขี่ยเชื้อปลายกลม (loop)

3.1.2.10 คอกบอร์เรอร์ (cock borer)

3.1.2.11 ปากคีบ (forcept)

3.1.2.12 หลอดทดลอง (tube) ขนาด 0.2, 0.5, 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

3.1.2.13 ลูกยาง (rubber bulb)

3.1.2.14 ช้อนตักสารเคมี (spatular)

3.1.2.15 โกร่ง และที่บด (mortar and pestle)

3.1.2.16 คาร์ลิเปอร์ชนิดอัตโนมัติ (digital caliper)

3.1.2.17 ปิเปตต์ (pipette)

3.1.2.18 ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

3.1.2.19 ทิป (tip) ขนาดต่างๆ

3.1.2.20 ตะเกียง (burner)

3.1.2.21 คิวเวท (cuvette)

- 3.1.2.22 สไลด์แก้ว (glass slide)
- 3.1.2.23 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
- 3.1.2.24 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- 3.1.2.25 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow cabinet)
- 3.1.2.26 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- 3.1.2.27 ตู้เย็น (refrigerator) หรือตู้แช่แข็ง (deep freeze)
- 3.1.2.28 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- 3.1.2.29 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
- 3.1.2.30 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope)
- 3.1.2.31 เครื่องชั่ง (balance)
- 3.1.2.32 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
- 3.1.2.33 เครื่องช่วยผสม (vortex)
- 3.1.2.34 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 3.1.2.35 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.1.2.36 เครื่องเขย่า (shaker or rotator)
- 3.1.2.37 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)
- 3.1.2.38 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler)
- 3.1.2.39 เครื่องอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)
- 3.1.2.40 เครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ (UV transilluminator)
- 3.1.2.41 ชุดถ่ายภาพเจล (gel document)

3.1.3 วัสดุและสารเคมี

3.1.3.1 ยาปฏิชีวนะ สเตรปโตไมซิน ซัลเฟต (streptomycin sulphate) ไซโคลเฮกซามาไมด์ (cycloheximide) และคลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol)

3.1.3.2 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB), dichloran-glycerin-(DG18)-agar และ sabouraud dextrose agar (SDA) ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลสำเร็จรูป

- 3.1.3.3 แอลกอฮอล์ (alcohol)
- 3.1.3.4 พาราฟินเหลว (paraffin liquid)
- 3.1.3.5 น้ำกลั่น (distilled water)
- 3.1.3.6 สีย้อมแลกโตฟีโนลคอตตอลบลู (lactophenol cotton blue)
- 3.1.3.7 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- 3.1.3.8 ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปชุด DNeasy plant mini kit ของบริษัท Qiagen

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

3.1.3.10 คีออกซีนิวคลีโอไทด์ (deoxynucleotide, dNTPs) ของบริษัท Roche

3.1.3.11 ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (Taq DNA polymerase) บริษัท New England Biolabs

3.1.3.12 ไพร์เมอร์ (primer) 2 ชนิด คือ ITS 1 (5'-TCGGTAGGTGAACCTGGG-3') และ ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ของบริษัท Invitrogen Corporation

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

3.1.3.14 ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

3.1.3.15 เจลอะกาโรส (agarose gel)

3.1.3.16 เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromid)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium*

3.2.1.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราสกุล *Metarhizium*

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

3.2.1.2 ตัวอย่างดิน

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

3.2.1.3 ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่ขอความอนุเคราะห์

ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium* จากศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติ จากกลุ่มงานวิจัยปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร และจากสถาบันวิจัย

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เมื่อได้รับแล้วนำมาทำการแยกเชื้อให้ได้เชื้อราบริสุทธิ์อีกครั้ง

3.2.2 การศึกษาชนิดของอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

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

3.2.3 การคัดแยกเชื้อ และทำให้เชื้อราสกุล *Metarhizium* บริสุทธิ์

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

นำจานเพาะเลี้ยงบ่มที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของโคโลนีทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน ถ้าพบว่าลักษณะโคโลนีมีเส้นใยสีขาว ขาวปนเหลือง หรือเหลือง และ conidia หรือสปอร์อยู่ในเจดสีเขียวให้เขี่ยย้ายเฉพาะเชื้อราสกุล *Metarhizium* ลงบนอาหาร PDA จนกว่าจะได้เชื้อราบริสุทธิ์ เมื่อได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้วทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเขี่ยเส้นใย และ conidia ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อม conidia ด้วยสีย้อมแลคโตฟีนอล-คอตตอลบลู ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ และทำการเก็บเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่บริสุทธิ์ในหลอดทดลองอย่างน้อยตัวอย่างละ 4 หลอด โดยเก็บรักษาไว้ 3 หลอด โดยแบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ

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

3.2.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

3.2.4.1 ศึกษาลักษณะ และอัตราการเจริญของโคโลนี

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

3.2.4.2 ศึกษาลักษณะรูปร่างของ conidia

เตรียมสไลด์เพื่อศึกษาลักษณะของ conidia ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ โดยใช้ปลายเข็มเขี่ยเส้นใยที่สร้าง conidia วางบนแผ่นสไลด์ที่หยดสีย้อมแลกโคฟีนออกคอตตอลบลู และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปศึกษาลักษณะรูปร่าง และวัดขนาดความกว้าง และความยาวของ conidia ในแต่ละตัวอย่างจำนวน 40 ซ้ำด้วยโปรแกรมถ่ายภาพ ACT 2U บันทึกผล และถ่ายภาพ นำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละด้านพร้อมด้วยหาค่าอัตราส่วนของความยาวต่อความกว้างของ conidia

3.2.5 การศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

3.2.5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

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

นำดีเอ็นเอมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอ็นเอทางด้านคุณภาพและปริมาณ โดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่ความเข้มข้นของวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลาย

บัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ พร้อมทั้งเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ขนาด 10,000 คู่เบส หรือ λ Hind III หลังจากนั้นนำแผ่นเจลมาข้อมด้วยเอซีเดียมโบรไมด์ และดูแผ่นเจลภายใต้แสงยูวีจากเครื่องส่องแถบดีเอ็นเอ สำหรับการวิเคราะห์ทางด้านปริมาณทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร นำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ เก็บรักษาตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในขั้นต่อไป

3.2.5.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทุกตัวอย่างถูกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่บริเวณ ITS ในตำแหน่ง rDNA ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 (White และคณะ, 1990) ปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 ความเข้มข้น 0.8 พิโคโมล คือออกซินิวคลีโอไทด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสความเข้มข้น 1 ยูนิต บัฟเฟอร์ PCR ความเข้มข้น 1 เท่า และน้ำนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้น initiation denaturing ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ขั้น denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที ขั้น annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 2 นาที ขั้น elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที รวมทั้งหมด 35 รอบ และตามด้วยขั้น final elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ ตรวจสอบ PCR product จากทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีความเข้มข้นวุ้นอะกาโรสร้อยละ 1 ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส เก็บรักษา PCR product ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.5.3 การศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำ PCR product ดังกล่าว ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Tech Dragon Limited เขตบริหารพิเศษฮ่องกงแห่งสาธารณรัฐประชาชนจีน นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาความคล้ายคลึงผ่านโปรแกรม BLAST (Altschul และคณะ, 1990) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank และจัดจำแนกกลุ่ม วิเคราะห์หา phylogenetic tree ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ภายในสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ และความสัมพันธ์กับ outgroup คือ เชื้อราสกุล *Beauveria* จากฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 3.1) โดยใช้โปรแกรม BioEdit version 7.0.5.2 ในการตรวจสอบและแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตแบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.83 และเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตโดยโปรแกรม Phylip package version 3.6 ที่รวมการใช้งานหลายโปรแกรม คือ Seqboot, Dnadist, Neighbor และ Consense ซึ่งใน

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

3.2.5.4 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ผ่านแก้ไขตรวจสอบมาจำลองหาการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะในสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) เพื่อศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยชีวสารสนเทศ หลังจากนั้นนำผลมาวิเคราะห์และคัดเลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถจำแนกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ระหว่างสายพันธุ์ได้เพื่อนำไปทดลองขั้นต่อไป

3.2.5.5 การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยเทคนิค PCR-RFLP

นำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมาทำศึกษาความหลากหลายของการกลาย โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่คัดเลือกมาจากวิธีชีวสารสนเทศทั้งหมด 15 ชนิด คือ *Acc I (Fbl I)*, *Alu I*, *BamH I*, *Bsn I (Hae III)*, *Dra I (Aha III)*, *EcoR I*, *EcoR V*, *Eco 31 I (Bso 31 I)*, *Hind III*, *Hpa II*, *Hph I (Asu HP I)*, *Pvu II*, *Sfr 274 I (Xho I)*, *Taq I* และ *Vsp I* โดยมีตำแหน่งจดจำ อุณหภูมิที่ใช้ในการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ และหยุดการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังตารางที่ 3.2 โดยปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการทำ PCR-RFLP ทั้งหมดปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR product 2 ไมโครกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ บัฟเฟอร์ตามคู่มือการใช้งานของเอนไซม์แต่ละชนิด และวิเคราะห์ผลโดยใช้เทคนิคอะกาโรส-เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรสเจลร้อยละ 2 ในบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 50 คู่เบส

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ที่นำไปใช้ในเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

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

ที่มา: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ตารางที่ 3.2 แสดงชื่อเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตำแหน่งจดจำ และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

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

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

บทที่ 4

ผล และอภิปรายผลการทดลอง

4.1 แหล่งที่มา และการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ตัวอย่างเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาทดลองครั้งนี้มีตัวอย่างทั้งหมด 33 ไอโซเลต โดยแยกได้จากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต และได้จากดินจำนวน 15 ไอโซเลต ซึ่งแบ่งเป็นคัดแยกใหม่จำนวน 16 ไอโซเลต และขอความอนุเคราะห์จำนวน 17 ไอโซเลต โดยมีรายละเอียด คือ

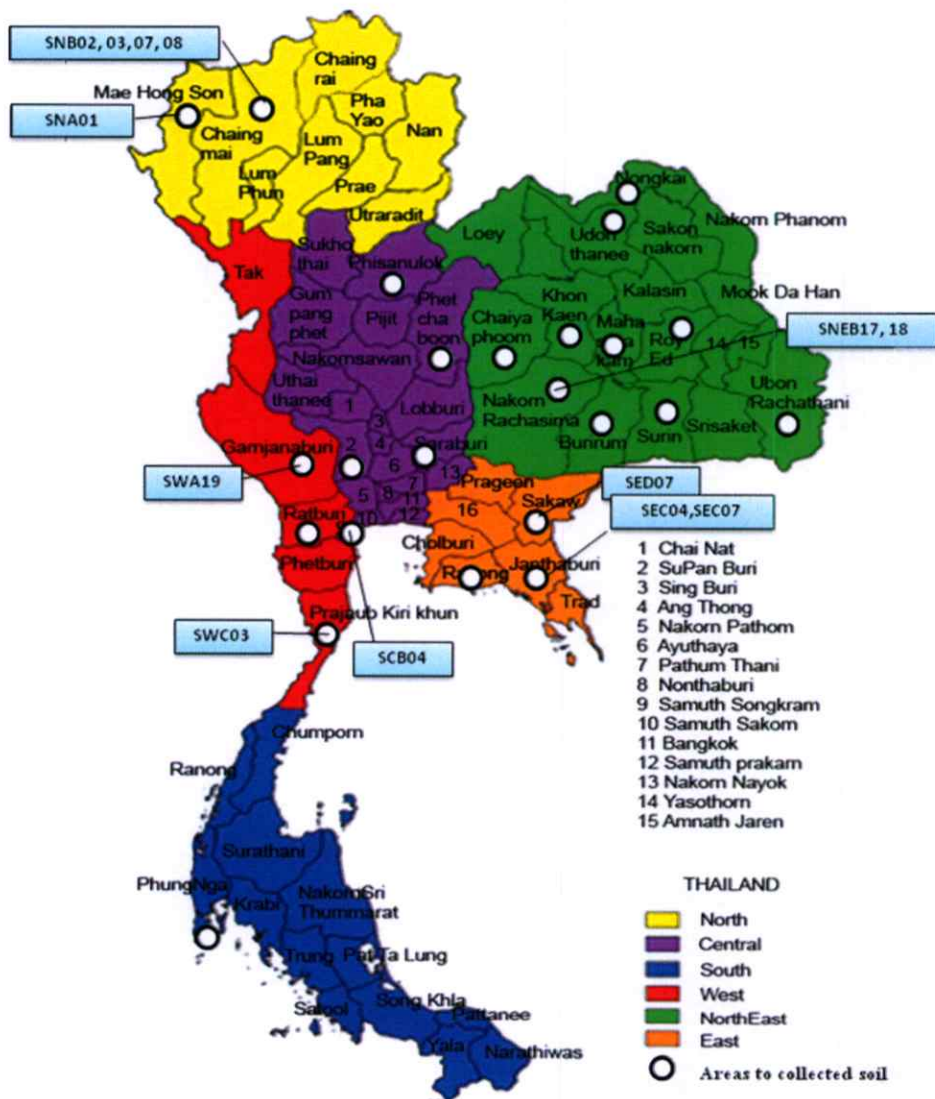
สำหรับการคัดแยกใหม่แบ่งเป็นคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* จำนวน 3 ไอโซเลตจากตัวอย่างแมลงตายได้แก่ MA 018 และ MA 019 ที่คัดแยกได้จากแมลงในระยะดักแด้ และหนอนด้วงในอันดับ Coleoptera ตามลำดับ ที่เก็บจากแปลงไร้อ้อยจังหวัดกาญจนบุรี (รูปที่ 4.1 A-B) และไอโซเลต MA029 จากแมลงอันดับ Diptera ในพื้นที่ป่า จังหวัดนครราชสีมา (รูปที่ 4.1 C) และจากการสุ่มคัดแยกเชื้อราในดินจากพื้นที่เกษตรกรรมปลอดสารเคมีหรือยาฆ่าแมลง และพื้นที่ป่าจาก 24 จังหวัดในประเทศไทยทั้งหมด 150 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.2) พบเชื้อราสกุล *Metarhizium* ทั้งหมดจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03



รูปที่ 4.1 ตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อ *Metarhizium*; A: MA 018; B: MA 019 และ C: MA 029

นอกจากนั้นแล้วยังได้ขอความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่นำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรกรรม และที่ศึกษาทดลองในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในห้องปฏิบัติการจากหน่วยงานรัฐบาล และที่เก็บรักษาเชื้อจาก 3 หน่วยงาน คือ ตัวอย่างที่ความอนุเคราะห์จากศูนย์ชีววินทรีย์แห่งชาติจำนวน 5 ไอโซเลต ซึ่งทุกไอโซเลตคัดแยกเชื้อราได้จากแมลง โดยแบ่งออกเป็นอันดับ Isoptera

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



รูปที่ 4.2 แสดงพื้นที่การสุ่มเก็บตัวอย่างดินจาก 24 จังหวัดในประเทศไทย และรหัสของไอโซเลตที่คัดแยกจากดิน 13 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.1 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและจำนวนไอโซเลตของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่คัดแยกได้

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

จากเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวนทั้งหมด 33 ไอโซเลตแบ่งได้เป็นส่วนที่คัดแยกจากดิน จำนวน 15 ไอโซเลต และจากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลต ดังสรุปรหัส แหล่งที่มา และจังหวัดในตารางที่ 4.2 โดยการแยกเชื้อจากดินจำนวน 150 ตัวอย่างจาก 24 จังหวัดในประเทศไทยคิดเป็นร้อยละของการคัดแยกได้ 8.67 ของจำนวนตัวอย่างดินทั้งหมด ซึ่งพบว่าเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* ร้อยละ 100 โดยส่วนใหญ่พบเชื้อรา *M. anisopliae* ในความลึกไม่เกิน 20 เซนติเมตรจากผิวน้ำดิน (Zimmermann, 2007) ซึ่งชั้นดินนี้อยู่ในชั้น A (A-horizone) ที่เป็นชั้นที่อินทรีย์วัตถุที่สลายตัวแล้ว และมีกิจกรรมของจุลินทรีย์มากที่สุด โดยพบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถกระจายอยู่ในดินต่างๆ ทั่วโลก (Iskandarov และคณะ, 2006) และคัดแยกได้จากที่อยู่อาศัย (habitat) หรือแหล่งที่อยู่ (geographical origin) ที่มีความแตกต่างกัน (St. Leger และคณะ, 1992; Zimmermann, 2007) การแยกเชื้อรา *M. anisopliae* จากดินนี้สอดคล้องกับการรายงานการพบเชื้อรา *M. anisopliae* ได้จำนวนแตกต่างกันจากดินในแหล่งที่อยู่ที่มีความแตกต่างในแต่ละประเทศ เช่น Hughes และคณะ (2004) ใช้เทคนิค plating และเทคนิค baiting โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรังมดกัดใบไม้ (leaf cutting ant) ในป่าแอมบาที่พื้นที่ป่ามีความแตกต่าง คือ ป่าปลูก (secondary forest) ที่มีดินชั้น (ไกลบ่อน้ำ) ป่าปลูกที่มีดินแห้ง และป่าปลูกที่ปลูกขึ้นใหม่ที่มีลักษณะเป็นทุ่งหญ้าและสนามหญ้า ในประเทศปานามา ผลการทดลองพบเฉพาะ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ทั้งหมดจำนวน 58 ไอโซเลตโดยไม่มีการพบสปีชีส์อื่นๆ ในสกุล *Metarhizium* โดยมีความหนาแน่นของเชื้อ *Metarhizium* อยู่ในช่วง 1×10^3 ถึง 5×10^4 CFU ต่อกรัมของดินโดยเทคนิค plating และในตัวอย่างดิน 1 ตัวอย่างนั้นพบเชื้อราที่ก่อให้เกิดในแมลงสปีชีส์อื่น คือ เชื้อรา *B. bassiana* โดยมีความหนาแน่นประมาณ 7.5×10^3 CFU ต่อกรัมของดิน สำหรับการคัดแยกเชื้อรา *Metarhizium* ที่ใช้เทคนิค baiting นั้นชี้ให้เห็นว่าแมลงปีกแข็งชนิด *Tenebrio molitor* ในอันดับ Coleoptera มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ดีกว่าหนอนผีเสื้อใยผึ้ง (*Galleria mellonella*) ในอันดับ Lepidoptera และในการทดลองของ Sun และ Liu (2008) ที่เก็บตัวอย่างดินจำนวน 425 ตัวอย่างจากพื้นที่ป่าบริเวณต่างๆ 10 มณฑลในประเทศจีนตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 ถึง 2005 พบเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงทั้งหมดจำนวน 236 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 55.5 ซึ่งพบเชื้อ *Paecilomyces farinosus* มากที่สุด รองลงมาคือ *B. bassiana* และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* คิดเป็นร้อยละ 19.6, 14.1 และ 10.6 ตามลำดับ ในปี ค.ศ. 2008 Inglis และคณะ เก็บตัวอย่างดินจำนวน 100 ตัวอย่างจากทั้งหมด 83 แหล่งที่มีลักษณะของพื้นที่แตกต่างในบริติชโคลัมเบียตะวันตกเฉียงใต้ โดยเทคนิค baiting พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* var.

anisopliae สามารถกระจายได้อย่างกว้างขวาง โดยพบเชื้อราจาก 46 แหล่งจากพื้นที่ทั้งหมดคิดเป็นร้อยละ 55.4 และสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมดจำนวน 63 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.2 รหัสเชื้อ แหล่งอาศัย และแหล่งที่มาของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่ใช้ในการศึกษา

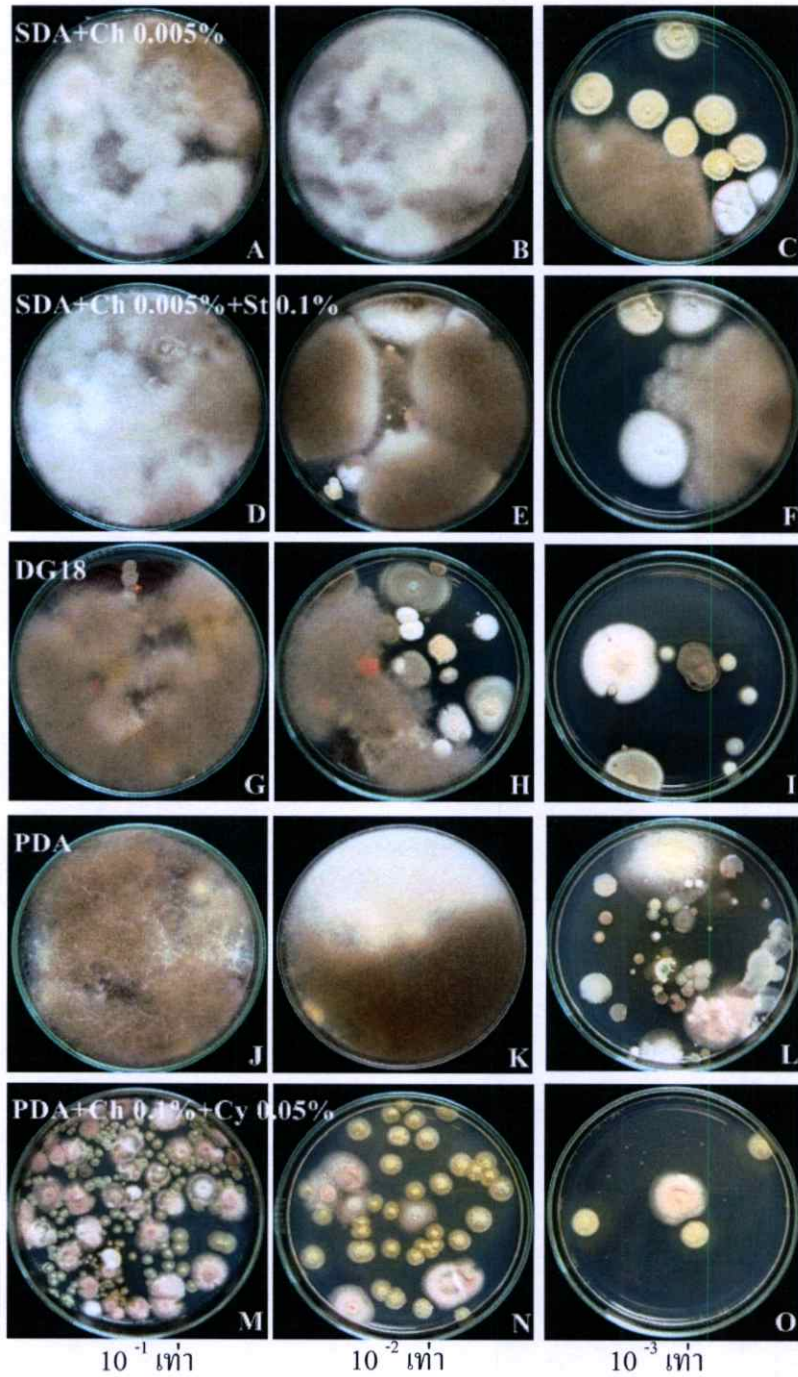
ไอโซเลต	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา	ไอโซเลต	แมลงอาศัย	แหล่งที่มา
MA 001	Coleoptera	นครราชสีมา	MA 029	Diptera	นครราชสีมา
MA 002	Coleoptera	กรุงเทพฯ	TISTR 3158	ดิน	ฟิลิปปินส์
MA 003	Coleoptera	สมุทรปราการ	TISTR 3607	ดิน	ไทย
MA 004	Coleoptera	ปทุมธานี	SCB 04	ดิน	สมุทรสงคราม
MA 007	Coleoptera	นครสวรรค์	SEC 04	ดิน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

ตัวอย่างจากแมลงจำนวน 18 ไอโซเลตที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถคัดแยกได้จากแมลงในอันดับ Coleoptera ได้มากที่สุด คือจำนวน 15 ไอโซเลต นอกจากนั้น คือ แมลงในอันดับ Isoptera, Dermaptera และ Diptera อย่างละ 1 ไอโซเลต ดังรายงานที่กล่าวไว้เช่นเดียวกันว่า *M. anisopliae* นั้นมีความสามารถเข้าอาศัยแมลงได้อย่างกว้างขวางในแมลงหลายอันดับ หลายชนิด (Goettel และคณะ, 1990; Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005) เช่น Coleoptera, Diptera, Hymenoptera, Isoptera, Homoptera, Orthoptera, Hemiptera, Dermaptera, Lepidoptera, Symphyla และ Siphonaptera เป็นต้น โดยในรายงานของ Zimmermann (2007) ที่

รายงานการศึกษาของ Veen (1968) พบว่าเชื้อรา *M. anisopliae* เข้าทำลายแมลงได้มากถึง 7 อันดับ หรือ 204 สปีชีส์ โดยมีความสามารถในการเข้าทำลายมาก 3 ลำดับแรก คือ Coleoptera, Lepidoptera และ Hemiptera ตามลำดับ โดยพบว่าเข้าทำลายอันดับ Coleoptera มากถึง 134 สปีชีส์ แต่ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* ชนิดอื่นๆ นั้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงที่เข้าอาศัยสูงกว่า *M. anisopliae* โดยพบว่า *M. anisopliae* var. *majus* และ *M. flavoviride* var. *flavovirid* มีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Coleoptera เป็นส่วนใหญ่ *M. flavoviride* มีความจำเพาะกับแมลงในอันดับ Orthoptera ในขณะที่ *M. flavoviride* var. *minus* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Homoptera และ *M. album* มีความจำเพาะกับแมลงอันดับ Hemiptera (Rombach และคณะ, 1986 และ Bidochka และ Small, 2005)

4.2 ผลการศึกษาของชนิดอาหารเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ผลจากการสังเกตงานเพาะเลี้ยงภายใน 7 วันของการจำลองคัดแยกเชื้อรา *M. anisopliae* ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่ความเจือจางสารละลายตัวอย่างดินต่างๆ (10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า) พบว่าอาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล (รูปที่ 4.3 A-C) และ SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1 (รูปที่ 4.3 D-F) พบว่ามีการเจริญของเชื้อราหลากหลายชนิด และเชื้อราเหล่านั้นสามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาก แต่ยังพบโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* เช่นเดียวกับกับอาหาร DG18 (รูปที่ 4.3 G-I) และอาหาร PDA (รูปที่ 4.3 J-L) ที่มีการเจริญเชื้อราหลากหลายชนิด และเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วกว่าเชื้อรา *M. anisopliae* ซึ่งเจริญได้ช้ากว่า โดยที่อาหาร PDA เป็นอาหารชนิดเดียวที่พบการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ (แบคทีเรีย และยีสต์) ดังนั้นอาหารทั้ง 4 ชนิด คือ อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล, อาหาร SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล และเพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1, อาหาร DG18 และอาหาร PDA ไม่เหมาะสมต่อการคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ยกเว้นอาหาร PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05 (รูปที่ 4.3 M-O) ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อราชนิดอื่นๆ น้อยชนิด และเจริญเติบโตได้ช้า ซึ่งเชื้อรา *M. anisopliae* สามารถเจริญได้ จึงเหมาะต่อการนำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อราในสกุล *Metarhizium* ต่อไป



รูปที่ 4.3 การเจริญของเชื้อรา *M. anisopliae* ในดินธรรมชาติบนอาหาร 5 ชนิดที่จำลองการเจริญเติบโตของเชื้อที่ระดับความเจือจางของสารละลายดินที่ 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} เท่า; A-C: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอล; D-F: SDA ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลที่เพิ่มยาปฏิชีวนะสเตรปโตไมซิน ซัลเฟตร้อยละ 0.1; G-I: DG18; J-L: PDA และ M-O: PDA ที่เติมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลร้อยละ 0.1 และไซโคลเฮกซาไมด์ร้อยละ 0.05

4.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

4.3.1 ลักษณะของโคโลนี และอัตราการเจริญ

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

กลุ่มที่ 1 ลักษณะของโคโลนีแบนราบ และเจริญเป็นวงซ้อนกัน (zonation) มีเพียงบางไอโซเลตที่บางขั้วมีเส้นใยฟูเล็กน้อยแทรกอยู่ conidia มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียวขี้ม้า โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังงานเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นสีจากเส้นใยที่เจริญแทรกในอาหารมีสีขาว ยกเว้นไอโซเลต MA 007 ที่อาหารด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนๆ เฉพาะบริเวณส่วนกลางรอบขึ้นวันที่เจาะ cock borer แต่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เนื่องจากมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไปใกล้เคียงกับไอโซเลตอื่นๆ มากกว่า ซึ่งเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA007 (รูปที่ 4.4 A), MA 012 (รูปที่ 4.4 B), MA 014 (รูปที่ 4.4 C), MA 019 (รูปที่ 4.4 D) และ SWA 19 (รูปที่ 4.4 E)

กลุ่มที่ 2 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ต่างกันเพียงสีของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ในอาหารซึ่งเมื่อมองด้านหลังงานเพาะเลี้ยงจะมีสีขาว และสีเหลือง โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 011 (รูปที่ 4.5 A), MA 015 (รูปที่ 4.5 B), MA 018 (รูปที่ 4.5 C) และ MA 022 (รูปที่ 4.5 D)

กลุ่มที่ 3 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาล้ำยุคสิ่งกับกลุ่มที่ 1 และ 2 คือ โคโลนีมีลักษณะแบนราบ ต่างกันเพียงสีของเส้นใยที่เจริญแทรกอยู่ในอาหารซึ่งส่วนใหญ่มีสีขาว สีเหลือง และสีส้ม ยกเว้นไอโซเลต TISTR 3158 และ ไอโซเลต SED 07 ที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำแทรก โดย TISTR 3158 เริ่มมีสีดำแทรกจากบริเวณตรงกลางงานเพาะเลี้ยง ต่างจากไอโซเลต SED 07 ที่มีลักษณะสีดำแทรกกระจายเป็นวงกว้าง แต่ต่างจากกลุ่ม 1 และ 2 คือกลุ่มนี้มีการสร้าง conidia ลักษณะค่อนข้างเกาะอัดแน่น แต่ไม่เป็นแผ่นเดียวกันจึงสามารถสังเกตเห็นได้เป็นวงซ้อนกันได้บ้าง โดย conidia ส่วนใหญ่ของกลุ่มนี้มีสีเขียวขี้ม้า แต่มีเพียงบางไอโซเลตเท่านั้นที่มีสีแตกต่างจากไอโซเลตอื่นๆ คือ มีสีเขียวขี้ม้าเข้มมาก ได้แก่ ไอโซเลต TISTR 3607, SCB 04, SED 07, SNB 02 และ ไอโซเลต SNEB 18 ซึ่งเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้มีจำนวนมากที่สุด คือ 14 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001 (รูปที่ 4.6 A), MA 025 (รูปที่ 4.6 B), MA 026 (รูปที่ 4.6 C) และ MA029 (รูปที่ 4.6 D) TISTR 3158 (รูปที่ 4.6 E), TISTR 3607 (รูปที่ 4.6 F), SCB 04 (รูปที่ 4.6 G), SEC 04 (รูปที่ 4.6 H), SEC 07 (รูปที่ 4.6 I), SED 07 (รูปที่ 4.6 J), SNB 02 (รูปที่ 4.6 K) และ SNEB 17 (รูปที่ 4.6 L) SNEB 18 (รูปที่ 4.6 M) และ SWC 03 (รูปที่ 4.6 N)

กลุ่มที่ 4 โคลิโคนีมีลักษณะแบนราบ และลักษณะของ conidia แตกต่างจากกลุ่ม 1-3 คือ มีการสร้าง conidia จำนวนมาก เกาะแน่นเป็นแผ่นเดียวกัน ไม่พบการเจริญเป็นวงซ้อนกัน conidia มีสีเขียวเข้ม ылเว้น ไอโซเลต MA 017 ที่ conidia มีสีเขียวปนเหลือง โดยระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน สีด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว สีเหลือง ถึงสีส้ม โดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004 (รูปที่ 4.7 A), MA 017 (รูปที่ 4.7 B), MA 021 (รูปที่ 4.7 C) และ MA 024 (รูปที่ 4.7 D)

กลุ่มที่ 5 เชื้อราในกลุ่มนี้มีการสร้างเส้นใยที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ คือ เส้นใยเจริญฟูขึ้นบนผิวหน้าอาหารทำให้เห็นลักษณะของโคลิโคนีมีเส้นใยฟู ระยะเวลาในการสร้าง conidia ประมาณ 4-5 วัน เช่นเดียวกันกับกลุ่มอื่นๆ แต่มีการสร้าง conidia ในปริมาณน้อย สีด้านหลังงานเพาะเลี้ยงจะมีสีขาว เหลืองถึงส้ม ылเว้น ไอโซเลต SNB 03 ที่มีสีน้ำตาลเข้มหรือดำแทรกโดยเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มมีจำนวน 6 ไอโซเลต คือ MA 002 (รูปที่ 4.8 A), MA 003 (รูปที่ 4.8 B), SNA 01 (รูปที่ 4.8 C) และ SNB 03 (รูปที่ 4.8 D) SNB 07 (รูปที่ 4.8 E), SNB 08 (รูปที่ 4.8 F)

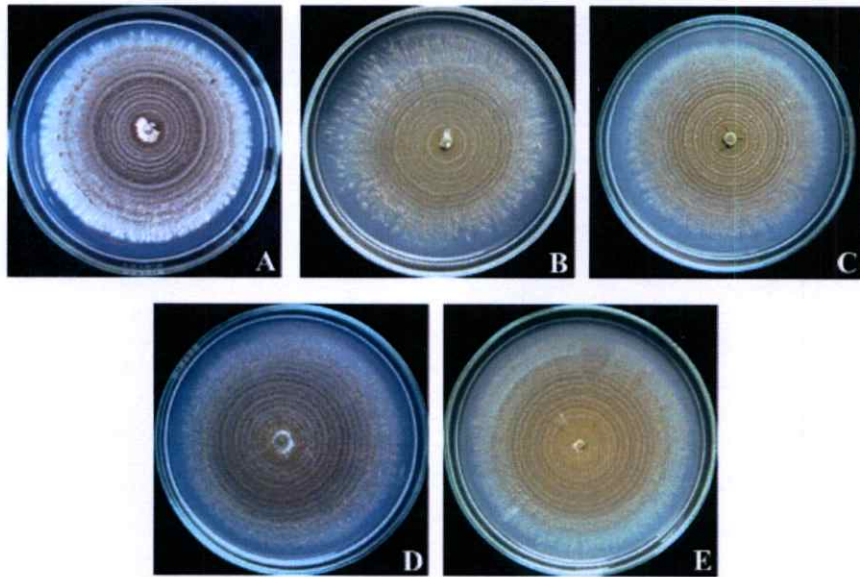
โดยแสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง 5 กลุ่มสรุปโดยรวมในตารางที่ 4.3 ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาบ่งชี้ว่าเป็นเชื้อรา *M. anisopliae* เนื่องจากมีสีของโคลิโคนีในลักษณะสีเขียวค่อนข้างเข้มหรือเขียวเข้ม

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อราสกุล *Metarhizium* บนอาหารเพาะเลี้ยง PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง มีรายละเอียดค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของโคลิโคนีในแต่ละไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าไอโซเลตส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญลดลงหรือไม่มีความแตกต่างในระหว่างวันที่ 24 และ 28 อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดของอาหาร และพื้นที่ในการเจริญที่มีการเจริญเกือบเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ดังนั้นในการเปรียบเทียบอัตราการเจริญจึงนำค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางในวันที่ 20 มาเปรียบเทียบ พบว่าทั้ง 33 ไอโซเลตสามารถเจริญเติบโตได้บนอาหาร PDA ที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญต่ำที่สุดคือ ไอโซเลต MA 025 ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 40.84 ± 0.39 มิลลิเมตร และไอโซเลตที่มีอัตราการเจริญเร็วที่สุดคือ ไอโซเลต SNEB 17 ที่วัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้เท่ากับ 82.95 ± 0.39 มิลลิเมตร และจากข้อมูลสามารถแบ่งกลุ่มอัตราการเจริญได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีอัตราการเจริญช้าที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 60 มิลลิเมตร ซึ่งมีเพียง 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004, MA 024, MA 025 และ SNB 02 ไอโซเลตที่นอกเหนือจากนั้นจัดเป็นกลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 60 มิลลิเมตรจำนวนทั้งหมด 29 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 021, MA 022, MA 026, MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED 07, SNA 01, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว สอดคล้องกับการทดลองของ Luangsa-ard และคณะ (2007) ที่เพาะเลี้ยงเชื้อ *M. anisopliae* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 25

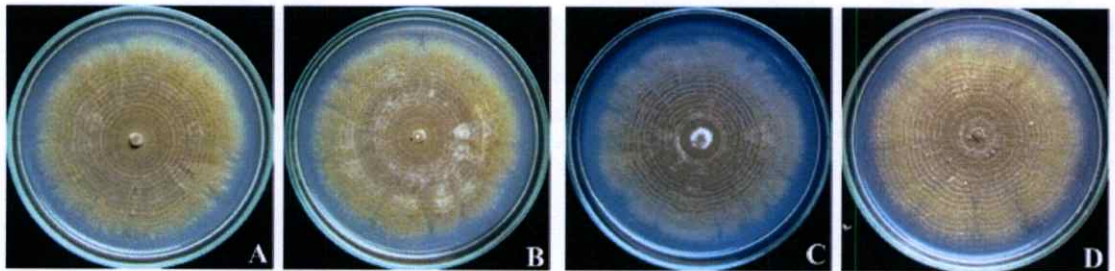
องศาเซลเซียส พบว่าเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วมาก คือมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีระหว่าง 50-60 มิลลิเมตรภายในระยะเวลา 14 วัน ซึ่งเหมาะแก่การนำไปใช้ประโยชน์มากกว่าเชื้อราที่มีการเจริญเติบโตช้า และไอโซเลต TISTR 3607 เคยได้รับการศึกษาการเจริญมาก่อนหน้านี้โดย Maketon และคณะ (2007) ที่คัดแยกเชื้อได้จากดินในประเทศไทย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

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *M. anisopliae* จำนวน และรหัสตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

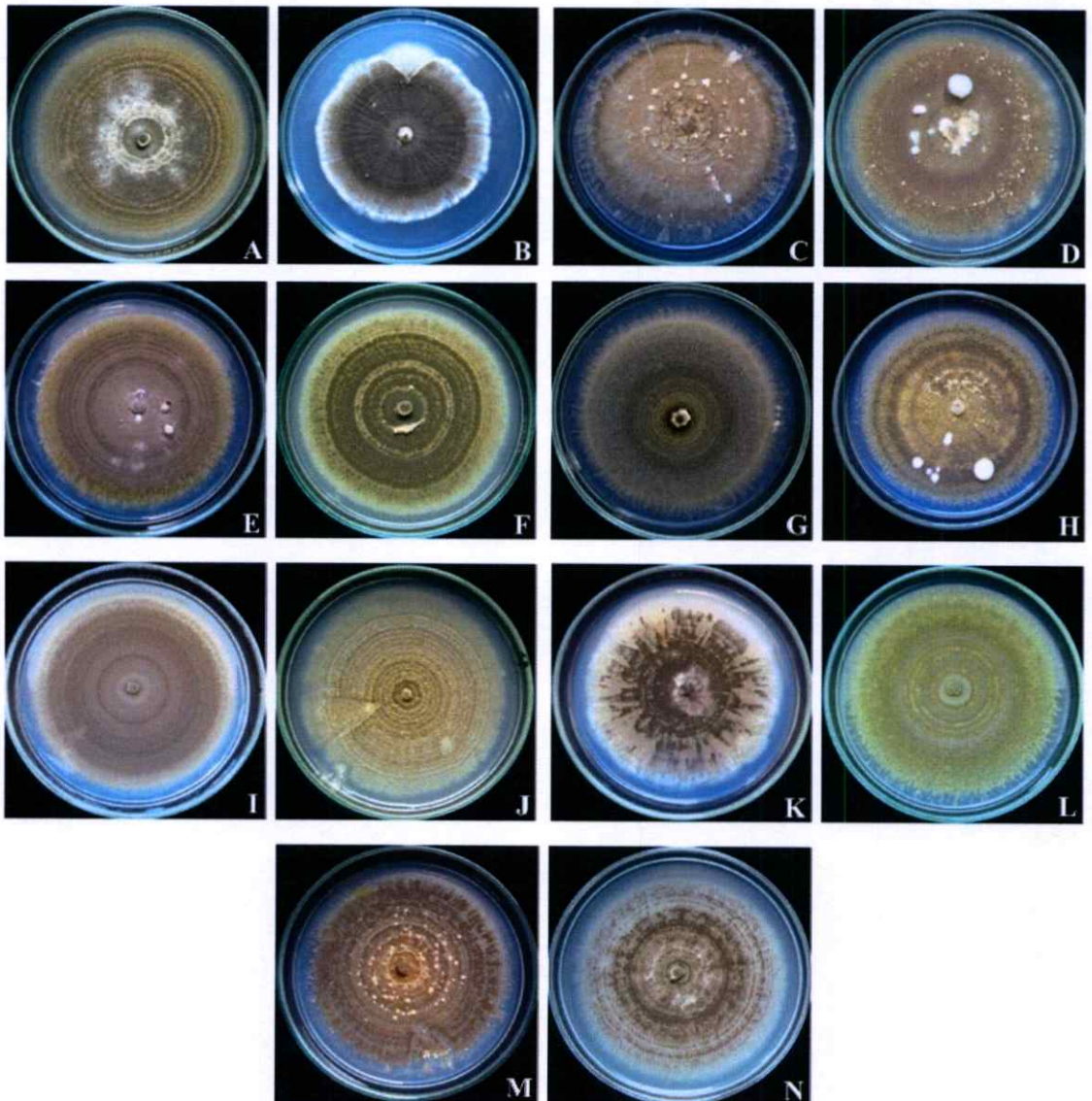
กลุ่มที่/รูปที่	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั่วไป	จำนวน/รหัสไอโซเลต
กลุ่มที่ 1 รูปที่ 4.4	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะการกระจายของ conidia เป็นลักษณะ zonation และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว 	จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ MA007, MA 012, MA 014, MA 019 และ SWA 19
กลุ่มที่ 2 รูปที่ 4.5	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะการกระจายของ conidia เป็นลักษณะ zonation และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลือง 	จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 011, MA 015, MA 018 และ MA 022
กลุ่มที่ 3 รูปที่ 4.6	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● ลักษณะ conidia ค่อนข้างเกาะแน่น แต่ยังเห็นลักษณะ zonation ได้ และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า ● ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงเหลืองเข้มหรือเหลืองอมส้มถึงส้ม 	จำนวน 14 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, MA 025, MA 026, MA029, TISTR 3158, TISTR 3607, SCB 04, SEC 04, SEC 07, SED 07, SNB 02, SNEB 17, SNEB 18 และ SWC 03
กลุ่มที่ 4 รูปที่ 4.7	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีแบนราบ ● มีการสร้าง conidia จำนวนมากทำให้มีลักษณะ conidia เกาะแน่นเป็นแผ่น และ conidia มีสีเขียวขี้ม้า (ยกเว้น MA 017 สีเขียวปนเหลือง) ● ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงส้ม 	จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ MA 004, MA 017, MA 021 และ MA 024
กลุ่มที่ 5 รูปที่ 4.8	<ul style="list-style-type: none"> ● ลักษณะโคโลนีมีเส้นใยฟูถึงฟูมาก ● ส่วนใหญ่มีการสร้าง conidia จำนวนน้อย ถ้ามี อาจเห็นกระจายเป็นวง หรืออัดกันแน่น ● ด้านหลังงานเพาะเลี้ยงมีสีขาว และสีเหลืองถึงส้ม 	จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ MA 002, MA 003, SNA 01, SNB 03, SNB 07 และ SNB 08



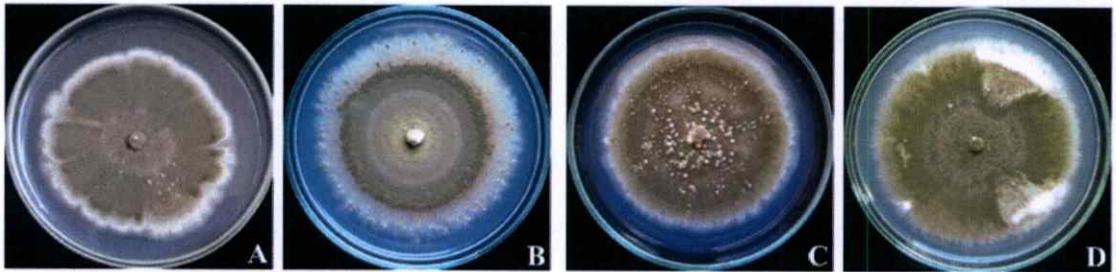
รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 1 จำนวน 5 ไอโซเลต คือ A: MA007; B: MA 012; C: MA014; D: MA 019 และ E: SWA 19



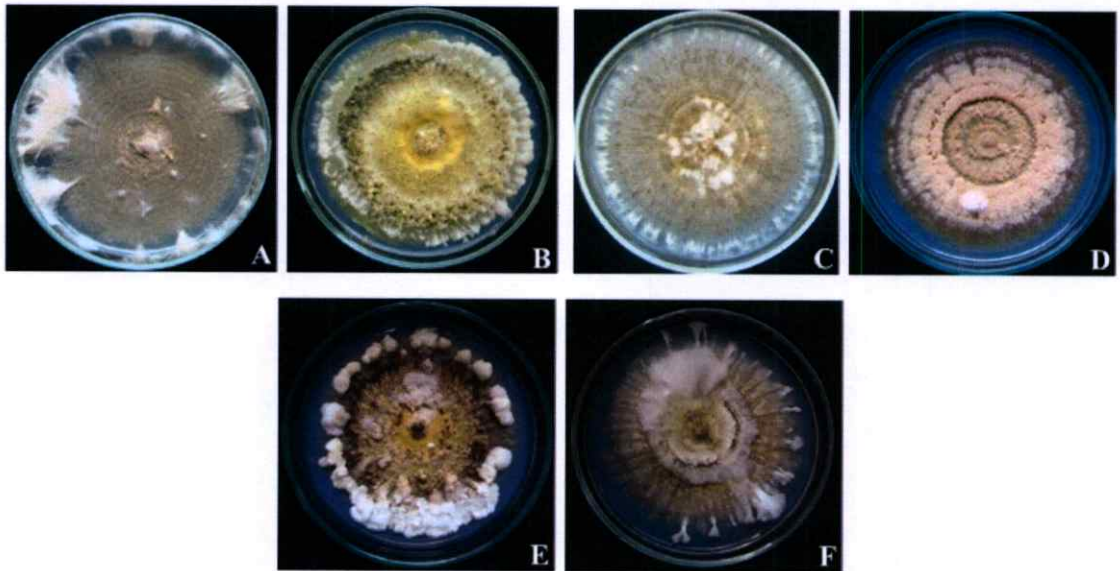
รูปที่ 4.5 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 2 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ A: MA 011; B: MA 015; C: MA 018 และ D: MA022



รูปที่ 4.6 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 3 จำนวน 14 ไอโซเลต คือ
 A: MA 001; B: MA 025; C: MA 026; D: MA 029; E: TISTR 3158; F: TISTR 3607;
 G: SCB 04; H: SEC 04; I: SEC 07; J: SED 07; K: SNB 02; L: SNEB 17;
 M: SNEB 18 และ N: SWC 03



รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 4 จำนวน 4 ไอโซเลต คือ
A: MA 004; B: MA 017; C: MA 021 และ D: MA 024



รูปที่ 4.8 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในกลุ่มที่ 5 จำนวน 6 ไอโซเลต คือ
A: MA 002; B: MA 003; C: SNA 01; D: SNB 03; E: SNB 07 และ F: SNB 08

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เจริญบนอาหารชนิด PDA
เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน

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

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อรา *M. anisopliae* ที่เจริญบนอาหารชนิด PDA เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) ในวันที่ต่างกัน

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

4.3.2 ลักษณะรูปร่าง และขนาดของ conidia

เมื่อดูลักษณะรูปร่าง และวัดขนาดของ conidia ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลักษณะของ conidia มีลักษณะเป็นทรงไข่ขนาดเล็ก 1 ไอโซเลต (SEC 07) ทรงกระบอกยาวแคบ มีการคอดหรือแคบตรงกลางมากจำนวน 3 ไอโซเลต (MA 004, MA 021 และ MA024) และส่วนใหญ่ที่เหลือทั้ง 29 ไอโซเลตเป็นรูปทรงกระบอกตรง และบาง conidia หรือบางไอโซเลตมีการคอดหรือแคบตรงกลางเล็กน้อยสอดคล้องกับรายงานที่กล่าวว่าถ้า conidia เป็นรูปทรงกระบอก ที่อาจมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกที่แคบตรงกลางหรือวงรีแคบจัดกลุ่มเป็น *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* แต่ถ้า conidia เป็นรูปวงรีหรือทรงไข่นั้นจัดเป็น *M. album* และ *M. flavoviride* (Tulloch, 1976; Rombach และคณะ, 1987 และ Yip และคณะ, 1992) และจากการศึกษาพบว่าขนาดของ conidia ที่พบได้ในแต่ละไอโซเลตมีขนาดแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.9-4.11 โดยพบว่าไอโซเลตที่ความกว้างมีค่าน้อยที่สุดคือมีค่าเท่ากับ 1.90 ไมโครเมตร และมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 4.52 ไมโครเมตร ได้แก่ MA 029 และ MA 021 ตามลำดับ

ส่วนไอโซเลตที่มีค่าความยาวของ conidia น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 4.88 ไมโครเมตร และมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 16.87 ไมโครเมตร ได้แก่ SEC 07 และ MA 024 ตามลำดับ

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

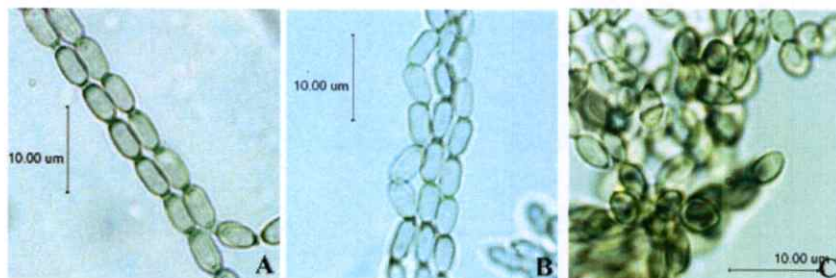
จากการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia น้อย (≤ 2.18) (รูปที่ 4.9 A-C) กลุ่มปานกลางที่มีอัตราส่วนมีค่าอยู่ระหว่าง 2.33-2.87 (รูปที่ 4.10 A-O) และอัตราส่วนมาก (≥ 2.91) (รูปที่ 4.11 A-O) โดยกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia น้อยมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ MA 001, TISTR 3607 และ SEC 07 ซึ่งไอโซเลต SEC 07 นั้นมีขนาดความยาวของ conidia เฉลี่ยสั้นที่สุด ทำให้มีลักษณะคล้ายรูปไข่ขนาดเล็ก (รูปที่ 4.9 C) สำหรับกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมีค่าปานกลาง และมากมีอย่างละ 15 ไอโซเลต โดยกลุ่มที่มีอัตราส่วนปานกลาง ได้แก่ MA 007, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, TISTR 3158, SCB 04, SEC 04, SED 07, SNB 02, SNB 03, SNEB 17 และ SWA 19 นอกนั้นจัดเป็นกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมีค่ามากทั้งหมดดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตาม อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia

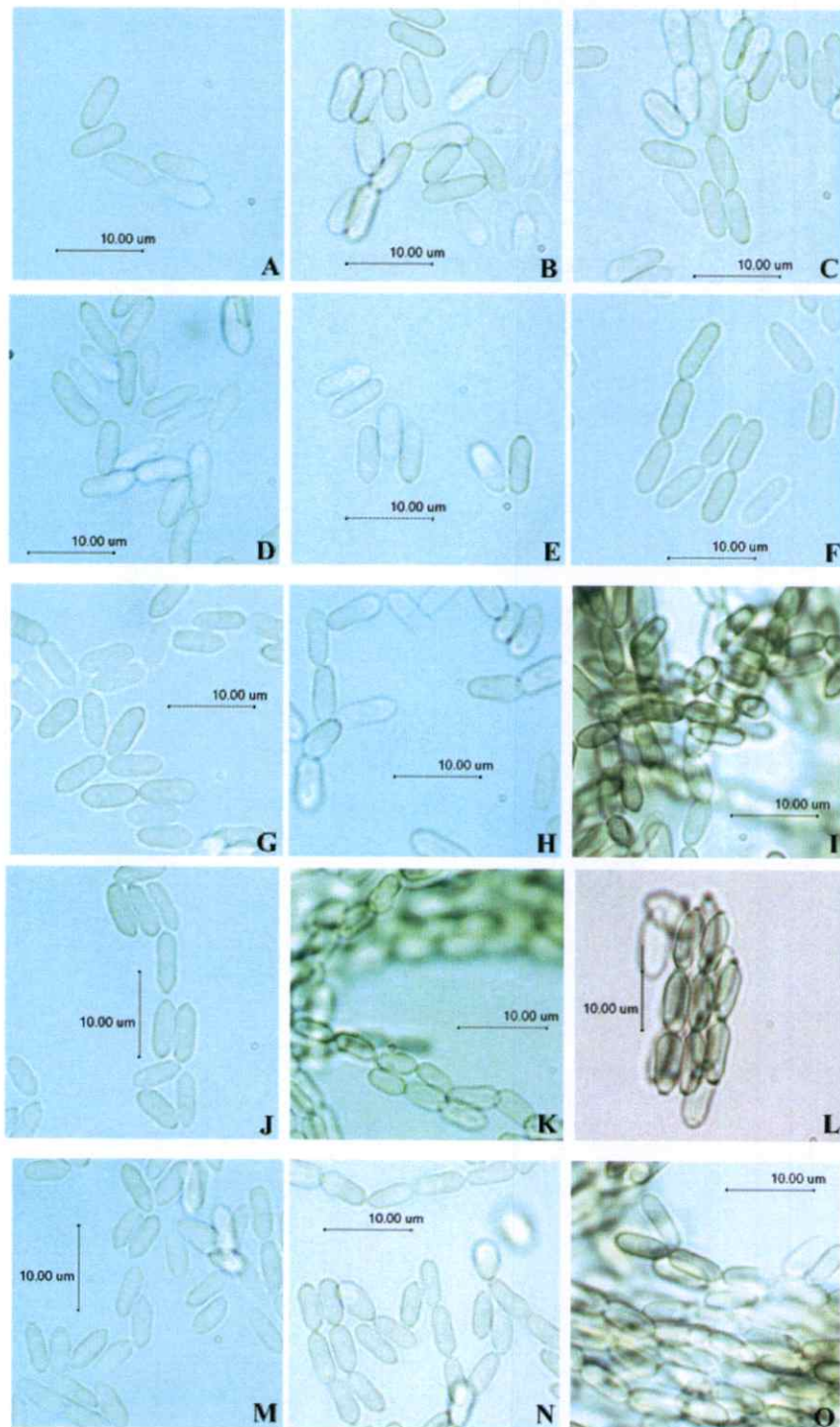
ไอโซเลต	ความกว้างของ conidia (ไมโครเมตร)				ความยาวของ conidia (ไมโครเมตร)				อัตราส่วน ยาว/กว้าง	กลุ่มตาม อัตราส่วน
	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด		
MA 001	3.340	0.072	2.670	4.280	7.289	0.108	5.940	8.880	2.18	น้อย
TISTR 3607	2.354	0.042	1.980	3.080	5.125	0.070	4.100	6.160	2.18	น้อย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

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) ค่าเฉลี่ยความกว้างและความยาว อัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง และการจัดกลุ่มตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia

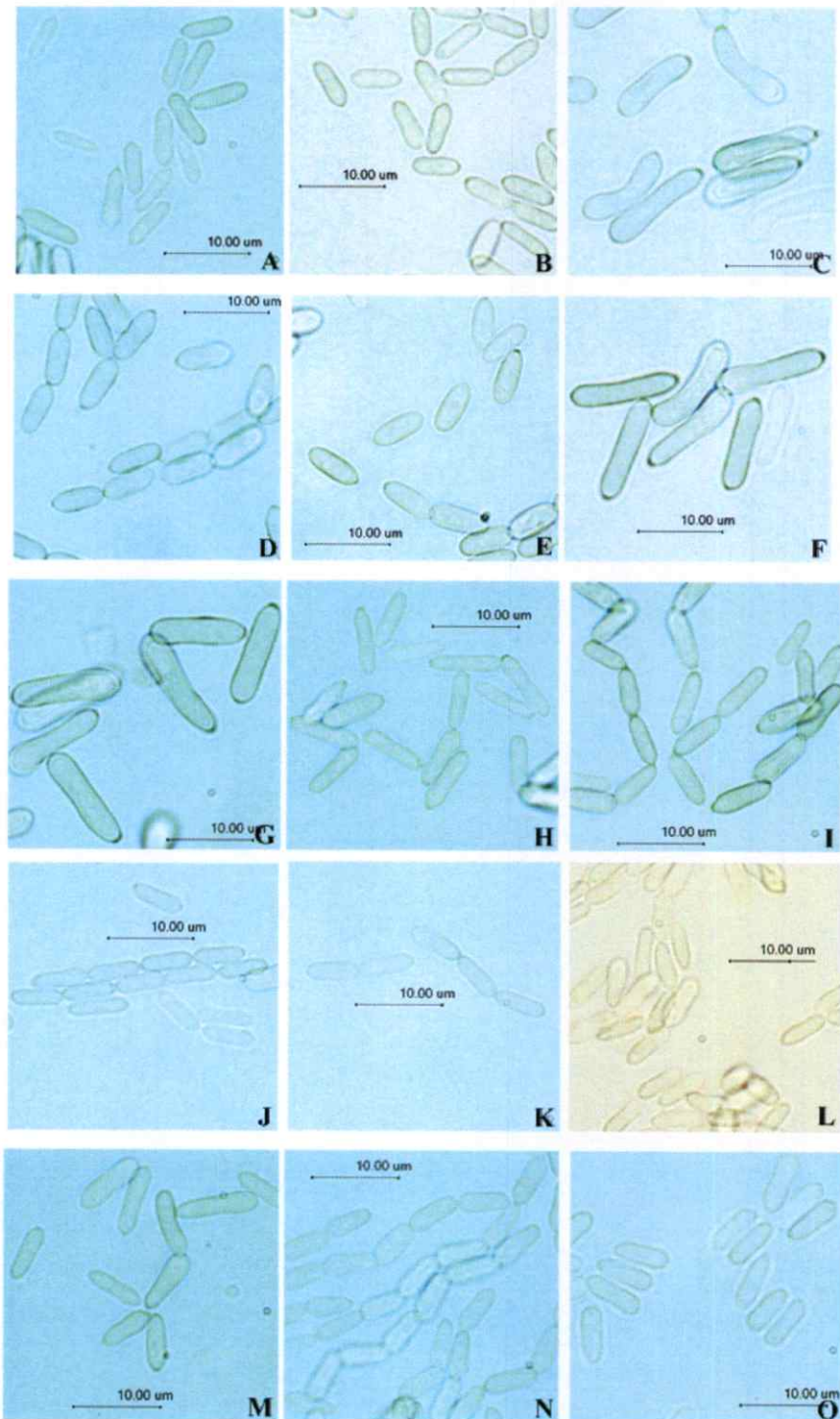
ไอโซเลต	ความกว้างของ conidia (ไมโครเมตร)				ความยาวของ conidia (ไมโครเมตร)				อัตราส่วนยาว/กว้าง	กลุ่มอัตราส่วน
	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด	เฉลี่ย	±SE	ต่ำสุด	สูงสุด		
MA 024	3.952	0.072	2.500	4.860	16.873	0.242	14.250	20.280	4.27	มาก
MA 025	2.918	0.074	2.000	4.380	9.423	0.120	8.070	11.490	3.23	มาก
MA 026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



รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าต่ำ; A: MA 001; B: TISTR 3607 และ C: SEC 07



รูปที่ 4.10 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าปานกลาง; A: MA 007; B: MA 014; C: MA 015; D: MA 017; E: MA 018; F: MA 019; G: MA 022; H: TISTR 3158; I: SCB 04; J: SEC 04; K: SED 07; L: SNB 02; M: SNB 03; N: SNEB 17 และ O: SWA 19



รูปที่ 4.11 แสดงลักษณะของ conidia ที่อยู่ในกลุ่มอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง; A: MA 002; B: MA 003; C: MA 004; D: MA 011; E: MA 012; F: MA 021; G: MA 024; H: MA 025; I: MA 026; J: MA 029; K: SNA 01; L: SNB 07; M: SNB 08; N: SNEB 18 และ O: SWC 03

4.4 ผลการศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

4.4.1 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR

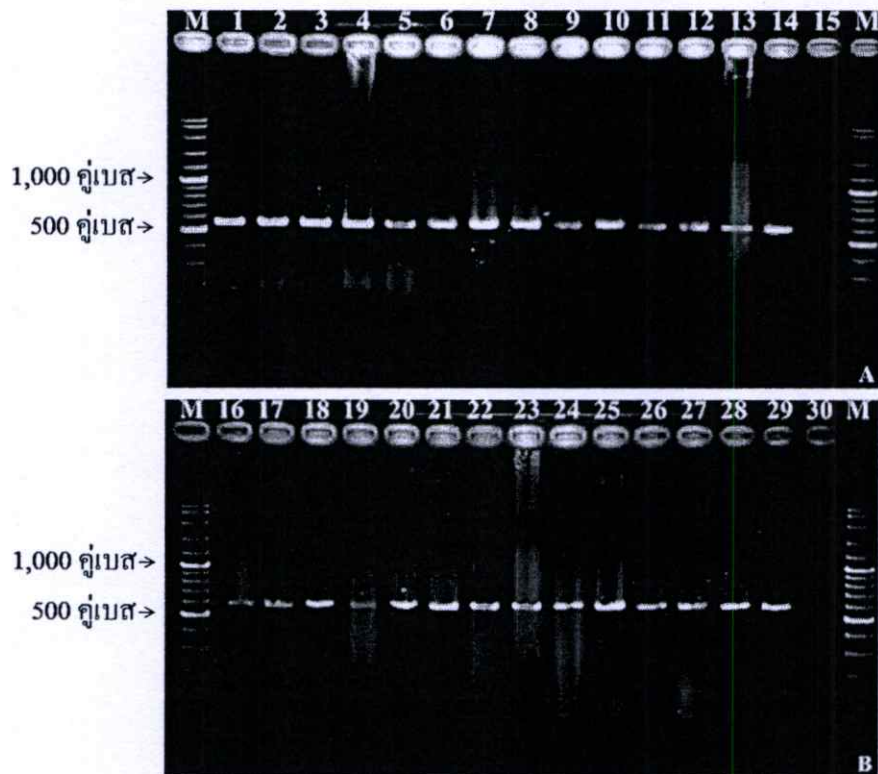
จากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 28 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1/ITS 4 (Internal Transcribed Spacers 1 and 4) สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้ เมื่อนำมาตรวจสอบขนาดโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสที่มีความเข้มข้นอะกาโรสเจลอ้อยละ 1 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอเครื่องหมายขนาด 100 คู่เบส พบว่ามีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 550 คู่เบสทุกไอโซเลต ดังแสดงในรูปที่ 12 A และ 12 B ซึ่งขนาดของ PCR product ที่เท่ากันในทุกไอโซเลตนี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อราแต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ รวมทั้งไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ได้เนื่องจากมีขนาดของ PCR product ไม่มีความแตกต่างกัน โดยขนาดของ PCR product ในงานวิจัยนี้มีขนาดใกล้เคียงกับรายงานของ Destéfano และคณะ (2004) ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกันตรวจสอบ และบ่งชี้สปีชีส์และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้เนื่องจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยพบว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศบราซิล (สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C) มีขนาดที่แตกต่างจากสายพันธุ์ที่มาจากประเทศออสเตรเลีย (สายพันธุ์ 14) คือ มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 540 และ 600 คู่เบสตามลำดับ และยังสามารถบ่งชี้ถึงระดับสปีชีส์ของ *M. flavoviride* และ *M. album* ได้โดยมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 600 และ 650 คู่เบส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามยังไม่ชัดเจนว่าการใช้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์เนื่องจากขนาดของ *M. anisopliae* สายพันธุ์ 14 มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ *M. flavoviride* จึงต้องหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมชนิดอื่นร่วมด้วยทั้งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และเทคนิค RFLP

ปัจจุบันตำแหน่ง ITS เป็นตำแหน่งที่นิยมใช้ในการบ่งชี้สายพันธุ์ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชื้อรา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีความแปรผันหรือความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมากกว่าตำแหน่งอื่นใน rDNA ทำให้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ และภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ (Curran และคณะ, 1994; Rakotonirainy และคณะ, 1994; Mavridou และคณะ, 2000; Pantou และคณะ, 2003; Hughes และคณะ, 2004; Destéfano และคณะ, 2004 และ Bidochka และคณะ, 2005) โดยบริเวณ ITS นี้มีไพรเมอร์หลากหลายชนิดที่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอตำแหน่งต่างๆ และให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ small subunit coding (SSU) และ large subunit coding (LSU) ที่ให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ยาวมากขึ้นจากที่สามารถเพิ่มขนาดในส่วน of 16S rDNA และ 28S rDNA ด้วย โดย

ไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการศึกษา คือ ไพรเมอร์ชนิด ITS 1 และ ITS 4 (Destéfano และคณะ, 2004 และ Bidochka และคณะ, 2005), ไพรเมอร์ชนิด TW 81 (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3') และ AB 28 (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3') (Curran และคณะ, 1994; Driver และคณะ, 2000 และ Entz และคณะ, 2005) และไพรเมอร์ชนิด NS 3 (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') และ NS 6 (5'-GCATCACAGACCTGTTATTGCCTC-3') (ศิริวัลย์ และคณะ, 2551) ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในบริเวณ SSU

โดย Curran และคณะ (1994) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *Metarhizium* จำนวน 31 ไอโซเลต จาก 3 สปีชีส์ คือ *M. anisopliae*, *M. flavoviride* และ *M. album* โดยใช้ ไพรเมอร์ชนิด TW 81 และ AB 28 ที่เพิ่มในส่วนของบริเวณ 16S-ITS1-5.8S-ITS2-28S ได้ขนาดชิ้น ดีเอ็นเอประมาณ 600 คู่เบส สามารถบ่งชี้สปีชีส์ได้อย่างชัดเจน และยังแบ่งเชื้อรา *M. anisopliae* ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae* และอีกกลุ่มหนึ่งที่แตกต่างไป ซึ่งให้ข้อมูลที่ใหม่ที่ต้องทำการศึกษาเพิ่มเติม จากนั้น Driver และคณะ (2000) ใช้ไพรเมอร์ชนิดนี้ในการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อ *Metarhizium* สปีชีส์ต่างๆ ทั้งหมด 123 ไอโซเลต โดยสามารถแยกสปีชีส์ออกได้เป็น 10 กลุ่ม คือ *M. album* (กลุ่ม 1), *M. flavoviride* (กลุ่ม 2-6) และ *M. anisopliae* (กลุ่ม 7-10) และ ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยกลุ่ม *M. album* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 570 คู่เบส กลุ่ม *M. flavoviride* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 530-550 คู่เบส และ *M. anisopliae* var. *anisopliae* FI-1029 มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส ต่อมา Entz และคณะ (2005) ได้พัฒนาไพรเมอร์จากบริเวณดังกล่าวได้เป็น ชนิด Mac-ITS-spF (5'-CTGTCAGTGTGCTTCGGCGGTAC-3') และ Mac-ITS-spR (5'-CCCGT TGCGAGTGAGTTACTACTGC-3') โดยสามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้จำเพาะเจาะจงกับ *M. anisopliae* var. *acridum* และ *M. anisopliae* var. *minus* โดยที่จากการศึกษาของ Driver และคณะ (2000) จัดกลุ่มให้ *M. anisopliae* var. *minus* อยู่ในกลุ่ม *M. anisopliae* var. *acridum* แต่ไม่สามารถเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอได้ใน *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. flavoviride* รวมทั้ง *B. bassiana*, *Isaria fumosorosea*, *I. farinosa*, *Verticillium alboatrum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Emericella nidulans*, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum*, *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, *Penicillium bilaii*, *Hydropisphaera peziza* และ *Rhizopus* sp. จึงเหมาะแก่การนำมาคัดแยกเชื้อ *M. anisopliae* var. *acridum* นอกจากนั้นแล้วบริเวณ ITS ยังสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ระยะของเชื้อราได้ โดยเชื้อราสกุล *Metarhizium* เป็นเชื้อราที่อยู่ในระยะ anamorph หรือระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจะอาศัย conidia เพื่อการขยายพันธุ์ แต่ถ้าเชื้อราสกุลนี้อยู่ในระยะ teleomorph หรือระยะที่มีลักษณะ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะถูกจัดอยู่ในสกุล *Cordyceps* ดังเช่น Liu และคณะ (2001, 2002) ใช้ไพรเมอร์ชนิด ITS 4 และ ITS 5 ในการบ่งชี้ว่า *M. anisopliae* var. *majus* มีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 636 คู่เบส และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับ *C. brittlebankisoides* ที่คัดแยกมาจากเชื้อราในระยะ teleomorph เช่นเดียวกับ Yang และคณะ (2009) ที่บ่งชี้ว่า *M. taii* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันกับ *C. chongqingensis* ในตำแหน่ง ITS และ 26S rDNA บริเวณ D 1-D 2 โดยมีขนาดของชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 553 และ 601 คู่เบสตามลำดับ



รูปที่ 4.12 แสดงขนาดของ PCR product ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยใช้ไพรเมอร์ ITS 1/ITS 4, A: Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส, Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และ Lane 15 และ 30 คือ negative control (ไม่ใช่ดีเอ็นเอต้นแบบ)

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

นอกจากนั้นยังมีตำแหน่งอื่นๆ ที่นำมาใช้ในในการตรวจสอบ บ่งชี้ และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่น Rakotonirainy และคณะ (1994) ทำการศึกษาด้วยเทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 28S rRNA ที่สามารถแยก *M. flavoviride* และ *M. anisopliae* ออกจากกันได้เช่นกัน และสามารถแยก *M. anisopliae* var. *majus* ออกจากสายพันธุ์อื่นได้ หรือ Bidochka และคณะ (2005) ที่ใช้บางส่วนของยีนในบริเวณ ITS, calmodulin (*CAL*), chitin synthase 1 (*CHS*), subtilisin-like protease (*PR1*), neutral trehalase (*NTL*) และ actin (*ACT*) ในการจัดจำแนกกลุ่มของ *M. anisopliae* ที่คัดแยกได้จากประเทศแคนาดา ที่มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (heat-active) และที่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส (cold-active) และ Bischoff และคณะ (2006) ศึกษาในตำแหน่งของ intron และ exon ของ EF-1a intron region และ EF-1a exon, RPB1 และสองบริเวณของ RPB 2a และ RPB 2b โดยมีเพียงบริเวณ EF-1a intron ที่สามารถเพิ่มได้ในทุกไอโซเลต

4.4.2 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ

จากการนำผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อราที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดจำนวน 28 ไอโซเลตด้วยการจำลองบริเวณตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยการใช้โปรแกรม Webcutter 2.0 โดยขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้หลังจากการเปรียบเทียบ และแก้ไขเพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากัน พบว่าเหลือลำดับนิวคลีโอไทด์ก่อนเข้าโปรแกรมเท่ากับ 460 คู่เบส โดยมีเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวนมากที่ไม่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่น *BamH* I, *BstSN* I, *EcoRV*, *FauND* I, *Fok* I, *Hind* III, *Hpa* I, *Mlu* I, *Nhe* I, *Nru*I, *Pst* I, *Pvu* I, *Sfr274* I, *Sac* I, *Sal* I, *Sma* I, *Ssp* I, *Xba* I และ *Xho* I เป็นต้น ในส่วนเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดแล้วผลไม่สามารถแยกความแตกต่างในระหว่างไอโซเลตได้แก่ *Acc* 16 I, *Ban* III, *Bbv* I, *BsrD* I, *BsuR* I, *Dde* I, *Hae* III, *Eco31* I, *Hga* I, *SfaN* I, *Sph* I และ *Hae* III เป็นต้น พร้อมทั้งยังมีเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถตัดดีเอ็นเอแล้วได้ชิ้นส่วนขนาดเล็กซึ่งไม่เหมาะแก่การนำไปใช้จริงได้แก่ *AspLE* I, *MnI* I, *Taq* I และ *Tru9* I เป็นต้น และเอนไซม์ตัด

จำเพาะที่ตัดบริเวณจดจำในแต่ละไอโซเลตแล้วพบความแตกต่าง ได้แก่ *Ase* I, *EcoR* I, *Sfr*303 I และ *Vsp* I ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมแก่การคัดเลือกมาใช้ในการวิเคราะห์ PCR-RFLP ต่อไป โดยยกตัวอย่าง เอนไซม์ตัดจำเพาะ และรายละเอียดขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดจากโปรแกรมได้ดังแสดงตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ชนิด และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0)

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

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ชนิด และขนาดของชิ้นเอ็นที่ได้ออกจากตัดของเอ็น ไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรมชีวสารสนเทศ (Webcutter 2.0)

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

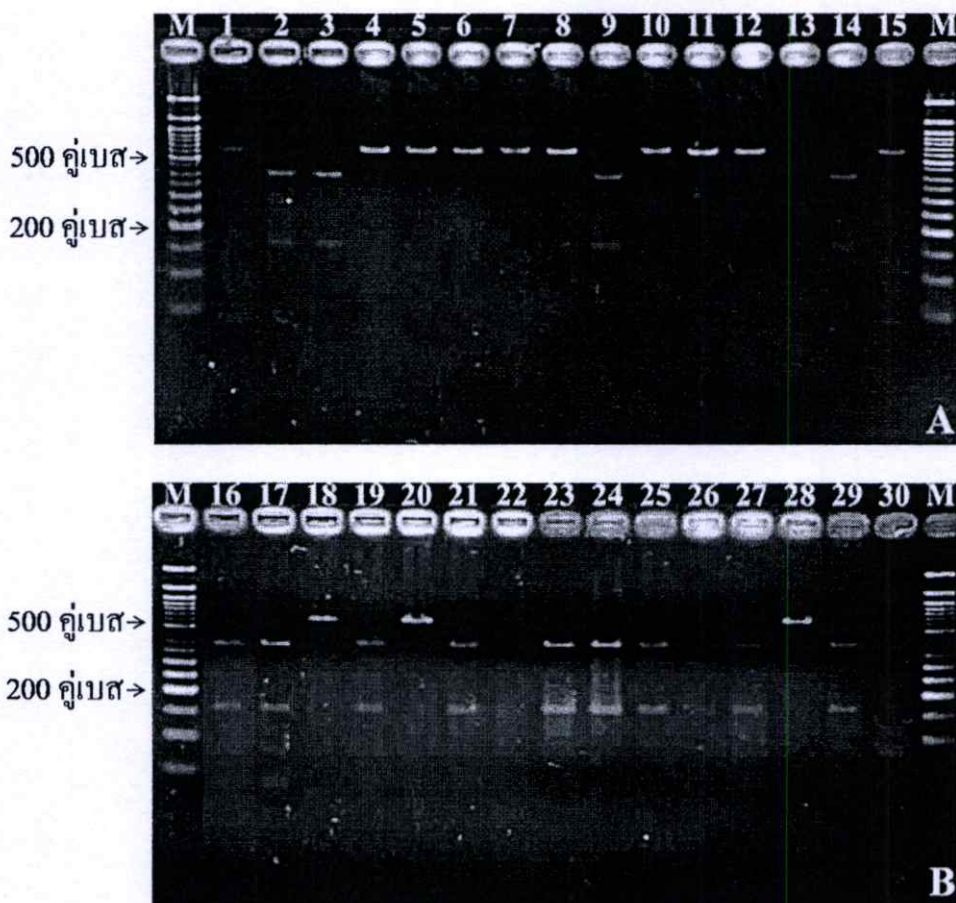
4.4.3 ผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP

เมื่อนำ PCR product บริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของตัวอย่างเชื้อราสกุล *Metarhizium* จำนวน 28 ไอโซเลต มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 15 ชนิด ได้แก่ *Acc I* (*Fbl I*), *Alu I*, *BamH I*, *Bsn I* (*Hae III*), *Dra I* (*Aha III*), *EcoR I*, *EcoR V*, *Eco 31 I* (*Bso 31 I*), *Hind III*, *Hpa II*, *Hph I* (*Asu HP I*), *Pvu II*, *Sfr 274 I* (*Xho I*), *Taq I* และ *Vsp I* เพื่อศึกษาความแตกต่างของตัวอย่างเชื้อราแต่ละไอโซเลต โดยตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ตัด PCR product มี 9 ชนิด ได้แก่ *Acc I* (*Fbl I*), *Alu I*, *BamH I*, *Dra I* (*Aha III*), *EcoR V*, *Hind III*, *Hph I* (*Asu HP I*), *Pvu II* และ *Sfr 274 I* (*Xho I*) โดยชิ้น PCR product มีขนาดเท่าเดิมคือประมาณ 550 คู่เบส จึงไม่สามารถใช้เอนไซม์ที่กล่าวมานั้นแยกความแตกต่างของเชื้อราสกุล *Metarhizium* แต่ละไอโซเลตออกจากกันได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย Pipe และคณะ (1995) และ Mavridou และคณะ (1998) ที่พบว่า *M. anisopliae* ไม่มีตำแหน่งจดจำต่อเอนไซม์ *BamH I* หรือ *Hind III* ทำให้รูปแบบการตัดของ *M. anisopliae* แตกต่างไปจากสปีชีส์อื่นๆ ในเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดยมีเพียง *M. album* เท่านั้นที่สามารถตัดด้วยเอนไซม์ *Hind III* แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Mavridou และคณะ (1998) จะมีเพียง 1 ไอโซเลต (ITALY-12) ที่มีตำแหน่งจดจำต่อเอนไซม์ *BamH I* รวมทั้งสอดคล้องกับการศึกษาของ Velásquez และคณะ (2007) ที่ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* จากประเทศชิลี จำนวน 39 ไอโซเลต และพบว่าในบริเวณ ITS ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Acc I*, *EcoR I*, *EcoR V* และ *Xho I* แต่สำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีตำแหน่งจดจำต่อเอนไซม์ *Eco R I* 1 ตำแหน่งจึงสามารถตัด และได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 และ 300 คู่เบส ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *M. anisopliae* ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน และมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันไป เนื่องจากการศึกษาของ Velásquez และคณะ (2007) นี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของ *M. anisopliae* มากถึง 15 จีโนไทป์จากตัวอย่างจำนวน 39 ไอโซเลต จากตำแหน่ง ITS 2 ที่มีตำแหน่งในการจดจำของเอนไซม์ *Alu I* และ *Hae III*

เอนไซม์ที่สามารถตัดชิ้น PCR product ได้ แต่ไม่แสดงข้อแตกต่างในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบผลการตัดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่ามีจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ *Bsn I* (*Hae III*), *EcoR I*, *Eco 31 I* (*Bso 31 I*), *Hpa II* และ *Taq I* โดยในทุกไอโซเลตมีผลการตัดด้วยเอนไซม์ *BsnI* (*HaeIII*) พบว่าตัดได้ 1 ตำแหน่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 และ 400 คู่เบส เอนไซม์ *EcoR I* พบการตัดได้ 1 ตำแหน่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 และ 300 คู่เบส

เอนไซม์ *Eco* 31 I (*Bso* 31 I) พบการตัดได้ 1 ตำแหน่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 และ 400 คู่เบส เอนไซม์ *Hpa* II พบการตัดได้ 1 ตำแหน่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 และ 400 คู่เบส และเอนไซม์ *Taq* I ที่สามารถตัดได้ 4 ตำแหน่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 50, 50, 100, 150 และ 200 คู่เบส ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Destéfano และคณะ (2004) เฉพาะเอนไซม์ *Hae* III และ *Hpa* II ที่ใช้เทคนิค RFLP ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ตรวจสอบและบ่งชี้สปีชีส์ และสายพันธุ์ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* ที่พบว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Alu* I, *Hae* III และ *Hpa* II ตัดแล้วได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 100-650, 100-450 และ 100-370 คู่เบส ตามลำดับ ยกเว้นเอนไซม์ *Alu* I ที่ไม่สามารถตัด *M. anisopliae* สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C ที่มาจากประเทศบราซิลได้ ซึ่งผลจากการศึกษาสามารถแยกความแตกต่างระหว่าง *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศออสเตรเลีย (สายพันธุ์ 14), *M. anisopliae* สายพันธุ์ที่มาจากประเทศบราซิล (E9, B/Vi, C), *M. flavoviride* และ *M. album* ได้ และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเอนไซม์ *Alu* I ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในทุกไอโซเลต เช่นเดียวกับ *M. anisopliae* สายพันธุ์ E9, B/Vi และ C ที่มาจากประเทศบราซิล จึงอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง *M. anisopliae* มีการกลายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *M. anisopliae* ที่มาจากประเทศบราซิลมากกว่าที่มาจากประเทศออสเตรเลีย

เอนไซม์ที่สามารถตัด PCR product และให้รูปแบบการตัดของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส มี 1 ชนิด คือ *Vsp* I โดยผลจากการตัดด้วยเอนไซม์พบว่ามียังกลุ่มที่เอนไซม์ไม่สามารถตัดได้ ได้แก่ ไอโซเลต MA 002, MA 003, MA 017, MA 025, MA 026, MA 029, TISTR 3158, SNA 01, SNB 03, SNB 07, SNB 08, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03 และกลุ่มที่เอนไซม์ตัดได้ 1 ตำแหน่ง ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 150 และ 400 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลต MA 001, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA 015, MA 022, TISTR 3607 SED 07 และ SNB 02 ผลการตัดแสดงดังรูปที่ 4.13 A และ 4.13 B



รูปที่ 4.13 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Vsp I* ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 A: Lane 1-14 คือ ไอโซเลต MA 001, MA 002, MA 003, MA 007, MA 011, MA 012, MA 014, MA015, MA 017, MA 018, MA 019, MA 022, MA 025 และ MA 026; B: Lane 16-29 คือ ไอโซเลต MA 029, TISTR 3158, TISTR 3607, SEC 04, SED 07, SNA 01, SNB 02, SNB 03, SNB 07, SNEB 17, SNEB 18, SWA 19 และ SWC 03; โดย Lane M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส, Lane 15 และ 30 คือ Uncut (ไม่ใส่เอนไซม์)

4.4.4 การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อราสกุล *Metarhizium*

ผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างจำนวนทั้งหมด 28 ไอโซเลตที่สามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้เนื่องจากตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ MA 004, MA 021, MA 024, SCB 04 และ SEC 07 ที่มีความยาวของ conidia เป็น 15.89, 16.70, 16.87, 6.28 และ 4.88 ตามลำดับ ไม่สามารถนำมาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ เนื่องจากการวิเคราะห์ไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้จากการติด N เป็นจำนวนมาก และเมื่อมีการตรวจสอบข้อมูลแล้วจะมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทุกไอโซเลตเหลือประมาณ 500 คู่เบส และ

นำไป BLAST เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกตัวอย่างเป็นเชื้อราสกุล *Metarhizium* สอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่กล่าวมาก่อนหน้านี้ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไอโซเลตแบบ multiple alignment และสร้าง phylogenetic tree เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับตัวอย่างจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมดจำนวน 21 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อราภายในสกุล *Metarhizium* จำนวน 19 ตัวอย่าง และ outgroup คือ *B. bassiana* จำนวน 2 ตัวอย่าง ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1 และ phylogenetic tree ดังรูปที่ 4.14 สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม A-F โดยกลุ่ม A ประกอบด้วย *B. bassiana* ซึ่งใช้เป็น outgroup และเชื้อราสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ คือ *M. flavoviride* และ *M. album* รวมทั้ง *M. anisopliae* var. *acridum* ที่แยกกลุ่มออกจาก *M. anisopliae* อย่างชัดเจน โดยจากการศึกษาของ Driver และคณะ (2000) และ Brischoff และคณะ (2009) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *M. flavoviride* ที่มี conidia สีเขียวอมเหลือง ลักษณะเป็นรูปทรงรีหรือทรงไข่ขนาดเล็กแตกต่างจาก *M. anisopliae* ที่ conidia มีสีเขียวเข้มหรือเขียวขี้ม้าลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก และเชื้อราสายพันธุ์ *M. anisopliae* var. *acridum* นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจาก *M. anisopliae* มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งความแตกต่างในเรื่องของความจำเพาะต่อการเข้าทำลายแมลงซึ่ง *M. anisopliae* เข้าทำลายแมลงได้หลายอันดับอย่างกว้างขวางดังที่กล่าวมา แต่ *M. anisopliae* var. *acridum* นั้นมีความจำเพาะในการเข้าทำลายแมลงในอันดับ Orthoptera (Bridge และคณะ, 1997 และ Alston และคณะ, 2005) ซึ่งในปัจจุบัน Brischoff และคณะ (2009) ได้จัดแยก *M. anisopliae* var. *acridum* เป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *M. acridum* stat. nov. ซึ่งในการทดลองนี้สนับสนุนให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ตำแหน่ง rDNA สามารถแยกความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในเชื้อราสกุล *Metarhizium* ได้ ดังนั้นจาก phylogenetic tree ซึ่งให้เห็นชัดเจนว่าตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 28 ไอโซเลตที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *M. anisopliae* ซึ่งกระจายอยู่ในกลุ่ม B, C, E และ F และพบว่าในกลุ่ม B, C และ F ที่แยกออกมานั้นมีเฉพาะไอโซเลตจากประเทศไทย ในขณะที่กลุ่ม D และ E ประกอบไปด้วยไอโซเลตที่มาจากที่ต่างๆ ทั่วโลก และในกลุ่ม E ที่ประกอบด้วยไอโซเลต SWC 03, MA 029, SNEB 18, TISTR 3158 และ MA 017 แสดงความใกล้ชิดกับไอโซเลตที่มาจากที่อื่นมากกว่าในประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามค่า Bootstrap ที่ประเมินจากการวิเคราะห์ 1,000 ครั้งนั้นมีผลแสดงใน phylogenetic tree ของกลุ่ม E นั้นมีค่าน้อยกว่า 50 ซึ่งในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 นั้นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Fegan และคณะ (1993) ที่ใช้เทคนิค RAPD ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อรา *M. anisopliae* var. *anisopliae*

การจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราสกุล *Metarhizium* โดย Tulloch (1976) และ Rombach และคณะ (1986) แบ่งออกเป็น 3 สปีชีส์ คือ *M. flavoviride*, *M. album* และ *M. anisopliae* ที่ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ var. *anisopliae* และ var. *majus* ซึ่งการแบ่งกลุ่มสอดคล้องกับผลการศึกษาทั้งทางด้านชีวเคมี (biochemical) และเทคนิคทางโมเลกุล (Fegan และคณะ, 1993; Mavridou และ Typas, 1998 และ Diver และคณะ, 2000) การศึกษาของ Diver และคณะ (2000) ที่จัดอนุกรมวิธานโดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาพร้อมกับเทคนิคการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 และ 28S rDNA D3 และเทคนิค RAPD ได้แบ่ง *Metarhizium* ออกเป็น 10 กลุ่ม ซึ่งสปีชีส์ *M. anisopliae* นั้นกระจายอยู่ทั้งหมด 4 กลุ่ม (Clade 7-10) คือ *M. anisopliae* var. *anisopliae*, var. *majus*, var. *acridum* และ var. *lepidiotum*

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

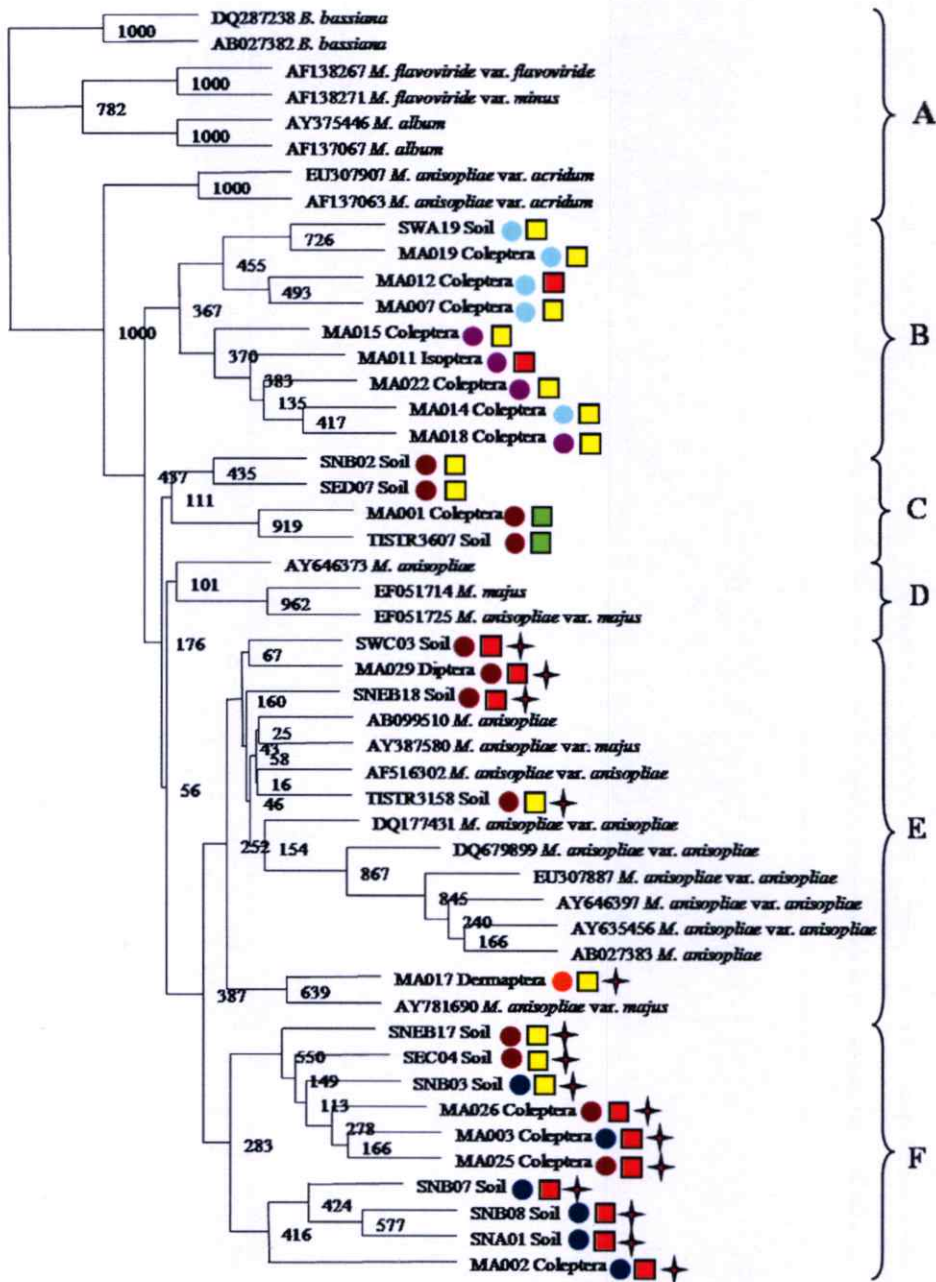
ในกลุ่ม C นั้นประกอบไปด้วยตัวอย่างจำนวน 4 ไอโซเลตที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกลุ่มโคโลนีกลุ่มเดียวกัน คือ อยู่ในกลุ่มที่ 3 และ ไอโซเลต MA 001 ที่แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไอโซเลต TISTR 3607 มากกว่าไอโซเลต SED 07 และ SNB 02 นั้นพบว่าทั้งสองไอโซเลตนั้นมีขนาดอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด conidia น้อย โดยในการศึกษาทางด้านเทคนิคทางโมเลกุลมีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของขนาด conidia น้อย และจาก phylogenetic tree ของกลุ่ม D และ E นั้นไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ได้อย่างชัดเจนระหว่าง *M. anisopliae* var. *anisopliae* และ *M. anisopliae* var. *majus* ซึ่ง var. *majus* ที่มีตัวอย่างจำนวนน้อยกว่านั้นจะแทรกอยู่ในกลุ่มของ *M. anisopliae* var. *anisopliae* ซึ่งให้เห็นว่าไม่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมของทั้งสองสปีชีส์อย่างชัดเจน ซึ่งในการแยกทั้งสองสายพันธุ์นั้นนิยมใช้ความยาวของ conidia ที่พบว่า var. *anisopliae* มีความยาวของ conidia สั้นกว่า var. *majus* ซึ่ง var. *majus* มีความยาว conidia มากกว่า 10 ไมโครเมตรหรือโดยทั่วไปพบความยาว conidia ที่ 12-13 ไมโครเมตร (Rombach และคณะ, 1986 และ Brischhoff และคณะ, 2009) แต่ในปัจจุบัน

จำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลในการคัดแยกระหว่าง *var. anisopliae* และ *var. major* (Yoon และคณะ, 1998 และ Diver และคณะ, 2000) จึงอาจกล่าวได้ว่าการคัดแยกสายพันธุ์ของทั้งสองสายพันธุ์นี้ออกจากกันนั้นอาศัยเพียงความยาวของ conidia นั้นไม่เพียงพอ ต้องอาศัยข้อมูลทางด้านโมเลกุลเข้าสนับสนุนจึงสามารถระบุสายพันธุ์อย่างชัดเจน โดยไอโซเลต MA 017 ที่มีความยาว conidia ระหว่าง 5.99-12.03 ไมโครเมตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า MA 017 มีความยาว conidia หลากหลาย และจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ของไอโซเลต MA 017 จัดให้อยู่ในกลุ่ม E นั้น ซึ่งมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับ *M. anisopliae var. majus* (AY781690) มากกว่า *M. anisopliae var. anisopliae* ที่อยู่ภายในกลุ่ม E ซึ่งเป็นปัญหาที่น่าศึกษาในขั้นหรือตำแหน่งอื่นต่อไปในอนาคต สำหรับไอโซเลต TISTR 3158 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย ฟิลิปปินส์นั้นไม่มีความแตกต่างจากตัวอย่างที่มาจากประเทศไทย หรือจากตัวอย่างที่คัดแยกได้จากที่ต่างๆ ทั่วโลก ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังไม่มี ความชัดเจนในเรื่องของการแยกความสัมพันธ์ระหว่าง พันธุกรรม และแหล่งที่อยู่

ตัวอย่างที่จัดอยู่ในกลุ่ม F เป็นตัวอย่างที่คัดแยกเชื้อได้จากดินเป็นส่วนใหญ่ และเป็นกลุ่มที่มีขนาดอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia มีค่าสูง และเป็นตัวอย่างที่มีลักษณะของโคโลนีอยู่ในกลุ่มที่ 5 คือที่มีเส้นใยฟูทุกตัวอย่าง ซึ่งในกลุ่ม F นี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ *M. anisopliae var. anisopliae* ในกลุ่ม E มากกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งในอนาคตควรจะศึกษาในบริเวณ IGS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ Ma-IGSspF และ Ma-IGSspR (Pantou และคณะ, 2003) ที่เพิ่มปริมาณจีนดีเอ็นเอเฉพาะ *M. anisopliae var. anisopliae* แต่ไม่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในสปีชีส์อื่นๆ ของเชื้อราสกุล *Metarhizium* (Hughes และคณะ, 2004) เพื่อระบุสายพันธุ์ให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบให้ได้มาซึ่ง phylogenetic tree ของสิ่งมีชีวิตชี้ให้เห็นได้ว่าเชื้อ *M. anisopliae* น่าจะประกอบไปด้วยอย่างน้อย 5 สายพันธุ์ (กลุ่ม B-F) และไอโซเลตจากประเทศไทย (กลุ่ม B, C, และ F) มีความแตกต่างจากไอโซเลตประเทศอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS นั้นไม่เพียงพอต่อการระบุความสัมพันธ์ในแต่ละไอโซเลต หรือในระดับสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

นักวิจัยสนใจศึกษาการจัดอนุกรมวิธานของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในแมลงอย่างมาก เนื่องจากมีความสำคัญในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ซึ่งในปัจจุบันนี้การควบคุมโดยชีววิธีที่ใช้เชื้อรา *M. anisopliae* มีความนิยมเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นความต้องการในการระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์จึงต้องมีความถูกต้องแม่นยำสูงขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำไปใช้ในการควบคุมแมลง

ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น จากข้อมูลในการครั้งนี้ทั้งการศึกษาทางฐานวิทยา และการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 ของเชื้อรา *M. anisopliae* ในประเทศไทยพิสูจน์ให้เห็นว่าเชื้อรา *M. anisopliae* นั้นกระจายอยู่ได้โดยทั่วไป และส่วนใหญ่มีความแตกต่างจากไอโซเลตจากประเทศอื่นๆ



รูปที่ 4.14 phylogenetic tree ของเชื้อรา *M. anisopliae* จำนวน 28 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับ ไอโซเลตจากฐานข้อมูล GenBank ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้พารามิเตอร์ Neighbor-joining โดยเลขแสดงค่าที่มาจากค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000; ■ แสดงกลุ่มจากการแบ่งตามอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของ conidia โดย ■ มีค่าอัตราส่วนน้อย, □ มีค่าอัตราส่วนปานกลาง และ ■ มีค่าอัตราส่วนมาก; ● แสดงกลุ่มการแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดย ● 1, ● 2, ● 3, ● 4 และ ● 5 และ + แสดง ไอโซเลตที่เอนไซม์ *Vsp I* ตัดได้

บทที่ 5

สรุป และเสนอแนะ

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

เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคทางโมเลกุลในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS 1 และ ITS 4 พบว่าทุกไอโซเลตมี PCR product ขนาดประมาณ 550 คู่เบส ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่าง และไม่สามารถบ่งชี้ระดับสปีชีส์หรือสายพันธุ์ของเชื้อราแต่ละไอโซเลตด้วยขนาดของชิ้น PCR product ได้ และเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ได้เพียงจำนวน 28 ไอโซเลต จากตัวอย่าง 33 ไอโซเลต เนื่องจาก 5 ไอโซเลตไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้สมบูรณ์ และเมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไป BLAST เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกไอโซเลตเป็นเชื้อราสกุล *Metarhizium* ตามลักษณะจากสัณฐานวิทยา และนำมาหาความสัมพันธ์ในรูปแบบ phylogenetic tree กับเชื้อรา *Metarhizium* จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 19 ตัวอย่าง และเชื้อราในสกุล *Beauveria* จำนวน 2 ตัวอย่างที่ใช้เป็น outgroup ซึ่งมีค่า Bootstrap เท่ากับ 1,000 และใช้วิธี Neighbor-joining โดยจาก phylogenetic tree สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่ม A-F ซึ่งกลุ่ม A ประกอบด้วย *B. bassiana* และเชื้อราสกุล *Metarhizium* สปีชีส์อื่นๆ ที่แยกกลุ่มออกจาก *M. anisopliae* อย่างชัดเจน และพบว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็น *M. anisopliae* ทั้งหมด ซึ่งแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง โดยพบกระจายอยู่ทั้งในกลุ่ม B,

C, E และ F และไม่สามารถแยกความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสปีชีส์ var. *majus* และ var. *anisopliae* ได้ อย่างชัดเจน จึงอาจกล่าวได้ว่าบริเวณ ITS1-5.8S-ITS2 ในตำแหน่งของ rDNA สามารถแยกเชื้อราสกุล *Metarhizium* ในระดับสปีชีส์ได้ แต่ไม่สามารถนำมาใช้แยกระดับสายพันธุ์ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในในยีนหรือตำแหน่งอื่น เพื่อระบุสปีชีส์หรือสายพันธุ์ ได้ อย่างชัดเจน เพื่อการนำไปใช้กับแมลงได้อย่างจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น โดยไอโซเลตที่มาจากประเทศไทยมีความแตกต่างจากไอโซเลตประเทศอื่นๆ และในเทคนิค PCR-RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 15 ชนิด พบว่ามีเพียงเอนไซม์ *Vsp* I สามารถแยกกลุ่ม E และ F ออกจากกลุ่ม B และ C ได้

นอกจากการศึกษาทางด้านสัณฐานวิทยา และเทคนิคทางโมเลกุลแล้วควรมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อรา *M. anisopliae* ทางด้านอื่นเพิ่มเติมไม่ว่าจะเป็นการทดสอบประสิทธิภาพ และหาความหลากหลาย ในการเข้าทำลายแมลง การเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่าง สารทุติยภูมิ รวมทั้งการหาเทคนิคทางโมเลกุลอื่นๆ เพื่อใช้ในการคัดแยก และระบุสายพันธุ์ในแต่ละไอโซเลตให้ได้อย่างชัดเจน แม้ว่าจะเล็งมาจากสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน และถึงแม้ว่าเทคนิคทางโมเลกุลมีความสำคัญมากในปัจจุบัน แต่ในการเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์นั้นควรอาศัยพื้นฐานจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาควบคู่ไปกับเทคนิคทางโมเลกุล เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สังเกตเห็นได้นั้นเป็นการแสดงออกโดยรวมของยีนทั้งจีโนม

บรรณานุกรม

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

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

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

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

- Lomer, C.J., Bateman, R.P., Johnson, D.L., Langewald, J., and Thomas, M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*. 46: 667-702.
- Luz, C., Tigano, M.S., Silva, I.G., Cordeiro, C.M.T. and Aljanabi, S.M. 1998. Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 93: 839-846.
- Luangsa-ard, J.J., Tسانathai, K., Mongkolsamrit, S. and Hywel-Jones, N.L. 2007. Atlas of invertebrate-pathogenic fungi of Thailand. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Thailand. 1: pp. 56-59.
- Maketon, M., Sawangwan, P. and Sawatwarakul, W. 2007. Laboratory study on the efficacy of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) in controlling *Coptotermes gestroi* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Entomol Gener*. 30: 203-218.
- Mavridou, A. and Typas, M.A. 1998. Intraspecific polymorphism in *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* revealed by analysis of rRNA gene complex and mtDNA RFLPs. *Mycological Research*. 102: 1233-1241.
- Mavridou, A., Cannone, J. and Typas, M.A. 2000. Identification of group-I introns at three different positions within the 28S rDNA gene of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae*. *Fungal Genetic and Biology*. 31: 79-90.
- Milner, R. J. 1997. Prospects for biopesticides for aphid control. *Entomophaga* 42: 227-239.
- Milner, R.J, Staples, J.A. and Lutton, G.G. 1998. The selection of an isolate of the Hyphomycete fungus, *Metarhizium anisopliae*, for control of termites in Australia. *Biological Control*. 11: 240-247.
- Mitchell, J.I. and Zuccaro, A. 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist*. 20: 62-74.
- Mnyone, L.L., Russell, T.L., Lyimo, I.N., Lwetoijera, D.W., Kirby, M.J. and Luz, C. 2009. First report of *Metarhizium anisopliae* IP 46 pathogenicity in adult *Anopheles gambiae* s.s. and *An. arabiensis* (Diptera; Culicidae). *Parasites & Vectors*. 2: 1-4.
- Neuvéglise, C., Brygoo, Y., Vercambre, B. and Riba, G. 1994. Comparative analysis of molecular and biological characteristics of strains of *Beauveria brongniartii* isolated from insects. *Mycological Research*. 98: 322-328.
- Pantou, M.P., Mavridou, A. and Typas, M.A. 2003. IGS sequence variation, group-I introns and the complete nuclear ribosomal DNA of the entomopathogenic fungus *Metarhizium*: excellent

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

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

ภาคผนวก

รหัสไอโซเลตที่ขอความอนุเคราะห์

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

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

ตารางภาคผนวกที่ 1 รายละเอียดรหัสเดิมของไอโซเลตที่ขอความอนุเคราะห์

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

อาหารเลี้ยงเชื้อราสกุล *Metarhizium*

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร potato dextrose agar (PDA) สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Potato Dextrose Broth (PDB) สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

potato	4.0	กรัมต่อลิตร
D (+) glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Dichloran-Glycerol (DG18) Agar สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

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

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

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร sabouraud dextrose agar + chloramphenicol สำเร็จรูป

ส่วนประกอบ

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

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

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0)

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

10X TBE buffer

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวนฤมล ตั้งธีระสุนันท์

วัน เดือน ปีเกิด 15 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่กรุงเทพมหานคร

ที่อยู่ 63/1102 ถนนรามคำแหง แขวงสะพานสูง เขตสะพานสูง
กรุงเทพมหานคร 10240

ประวัติการศึกษา 2549 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง